

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**ANÁLISE POPULACIONAL EM *Astyanax aff. fasciatus* (PISCES,
CHARACIDAE) NO ESTADO DA BAHIA UTILIZANDO
MARCADORES CITOGENÉTICOS.**

ALINE SOUZA MEDRADO

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
FEVEREIRO DE 2011**

ALINE SOUZA MEDRADO

**ANÁLISE POPULACIONAL EM *Astyanax aff. fasciatus* (PISCES,
CHARACIDAE) NO ESTADO DA BAHIA UTILIZANDO
MARCADORES CITOGENÉTICOS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz, como
parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Genética e Biologia
molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia
Molecular

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
FEVEREIRO DE 2011**

M492 Medrado, Aline Souza.

Análise populacional em *Astyanax aff. fasciatus* (Pisces, Characidae) no estado da Bahia utilizando marcadores citogenéticos / Aline Souza Medrado. – Ilhéus : UESC, 2011.

Xv, 74f. : il. + anexos.

Orientador : Marco Antônio Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Peixe – Bahia – Classificação. 2. *Astyanax* (Peixe) – Classificação. 3. Characídeo – Classificação. I. Costa, Marco Antônio (orientador). I. Título.

CDD - 597

ALINE SOUZA MEDRADO

ANÁLISE POPULACIONAL EM *Astyanax aff. fasciatus* (PISCES,
CHARACIDAE) NO ESTADO DA BAHIA UTILIZANDO MARCADORES
CITOGENÉTICOS.

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz, como
parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.
Área de concentração: Genética e Biologia
Molecular

APROVADA: 25 de fevereiro de 2011

Dra. Caroline Garcia
(UESB)

Dr. Amauri Arias Wenceslau
(UESC)

Dra. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC)

Dr. Marco Antônio Costa
(UESC –Orientador)

Dedico esta dissertação àquela que com muito amor me proporcionou a oportunidade de conquistar mais essa etapa de minha vida: minha mãe, Norma Medrado, sem ela essa etapa não seria vencida. Minha vitória é sua também. Obrigada pelo apoio incondicional!

“De tudo ficam três coisas. A certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminarmos. Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”.

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

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

Francisco Cândido Xavier

- À Deus, esse Mistério de Amor que se revela, por nos querer como sujeitos da história, nos conceder essa dignidade, e nunca se impor, ao mesmo tempo que nunca nos abandonará. Te agradeço Senhor cada desafio enfrentado, cada descoberta, cada dificuldade, pois tudo isso fará de mim uma pessoa melhor e mais forte.

Agradeço, especialmente no contexto desta dissertação: à todas as pessoas que tornaram possível a minha formação de caráter, integridade e conhecimento:

- À minha família, em especial a minha mãe, pelo amor, educação e dedicação. Obrigada por apoiar, incentivar, viabilizar e investir na minha formação, te digo que valeu o esforço! Mais uma batalha vencida... Espero um dia poder retribuir tudo o que a senhora fez e faz por mim. E a meus irmãos, avô, tios e primos pelo apoio e carinho.

- À Universidade Estadual de Santa Cruz, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do mestrado.

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos, pois sem ela, tudo seria mais difícil.

- À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB ao projeto Semi-árido em colaboração com a Universidade Estadual de Santa Cruz pelo financiamento de combustível para as coletas de meus peixinhos.

- À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, ao Departamento de Ciências Biológicas (Campus de Jequié), especialmente ao laboratório de Genética de Organismos Aquáticos (LAGOA) pela excelente estrutura e condições de realização deste trabalho.

- Aos membros da Banca Examinadora por se disporem a ler este trabalho: Prof.^a DSc. Fernanda Amato Gaiotto, Prof.^o DSc Amauri Arias Wenceslau e Prof.^a DSc. Caroline Garcia pelas valiosas contribuições.

- Ao meu orientador DSc. Marco Antonio Costa pela confiança e aprendizado durante toda a jornada.

- Ao meu Coorientador DSc. Paulo Luiz Souza Carneiro, pelo meu primeiro contato com a tão fascinante citogenética. Obrigada por ter me encaminhado para a pesquisa, pelo gosto do saber científico, pela investigação científica, com princípios calcados na ética e responsabilidade.

- Ao meu Coorientador e amigo DSc. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso, que me fez ficar ainda mais fascinada pela Citogenética de Peixes. Valeu pela confiança, questionamentos e elucidações que possibilitaram um grande avanço em minha formação acadêmica.

- Aos meus amigos do Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos (LAGOA) da UESB – Campus de Jequié pelas incríveis trocas de experiências e por fazer dessa etapa a mais agradável: Josivanda, Jamille, Mavione, Vítor (o químico mais biólogo que já conheci), Isabel, Leandro Aragão, Leandro Argôlo, Cleberson, Milena, (“os peixólogos”), Roque (mamíferos), André, Oziel, Malu (“insetólogos”), Juliana, Lídia, Lívia e Marcele (“os sapólogos”, o qual também me incluo). Somos uma equipe de excelentes pessoas capazes.

- Em especial aos meus amigos Josivanda, Jamille, Mavione, Isabel, Milena, Carol, Vítor e Paulo Roberto pela amizade, pelas contribuições científicas e pelos momentos felizes extra-laboratório que nos deram ânimo para continuar.

- Agradeço aos amigos no auxílio com as coletas: Mavione (pelo apoio moral, rs... me incluo também viu Mave), Paulo Roberto, Vítor, Leandro, Jamille e Josivanda pelas tarrafadas.... rs. Nossa, como foram divertidas as coletas e as quedas, inúmeras..... eu sempre caía.... sandálias, sempre perdíamos! E a seu Gil, meu eterno pescador (*in memorian*) jamais esquecerei as suas piadas, sempre espirituoso.

- Aos professores da área de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Campus de Jequié-BA): DSc Juvenal Cordeiro Silva Júnior, DSc Ana Maria Waldschmidt, DSc Sérgio Siqueira Júnior, DSc Débora Diniz, DSc Caroline Garcia e DSc Ana Karina pelas valiosas contribuições ao trabalho. Obrigada pela ajuda com as fotografias viu Débora.

- A amiga Vanessa Pamponet e família pela estadia em Ilhéus quando fiquei desabrigada.

- Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética da UESC pela amizade: Vanderly, Adriane, Rodolpho, Olívia, Zuzi, Tony, Kátia, Cinthia e Ígor.

- À Fabrícia, secretária do Programa de Genética e Biologia Molecular (PPGGBM), um anjo na verdade, sempre prestativa e atenciosa na resolução dos problemas.

- Aos professores do Programa de Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) da Universidade Estadual de Santa Cruz pelos ensinamentos.

- À todos os colegas do PPGGBM pelo aprendizado e conquistas.

- À todos aqueles que por algum momento estiveram presente em minha vida.

Obrigada a todos, vocês tornaram essa jornada possível!

INDICE

EXTRATO.....	ix
ABSTRACT.....	xii
i	
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Caracterização da bacia hidrográfica do rio de Contas.....	03
2.2 Particularidades do ambiente de cabeceira de riachos.....	06
2.3 Aspectos da ordem Characiformes e família Characidae.....	08
2.4 Cenário geral da citogenética em <i>Astyanax</i>	11
3. CAPÍTULO 1: Análise citogenética de duas espécies simpátricas de <i>Astyanax</i> (Characiformes, Characidae) da bacia do rio de Contas, nordeste do Brasil.....	21
Abstract.....	22
Resumo.....	23
1. Introdução.....	23
2. Material e métodos.....	25
3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	27
5. Agradecimentos.....	31
6. Referências Bibliográficas.....	31
4. CAPÍTULO 2: Divergência alopátrica em <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> (Characiformes, Characidae) de bacias costeiras do nordeste do Brasil baseada em marcadores cromossômicos.....	42
Abstract.....	43

Resumo.....	44
1.Introdução.....	45
2. Material e métodos.....	46
3. Resultados.....	47
4.Discussão.....	49
5. Agradecimentos.....	53
6. Referências Bibliográficas.....	53
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	61
6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	63
7. ANEXOS.....	72

EXTRATO

MEDRADO, Aline Souza. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. **Análise populacional em *Astyanax aff. fasciatus* (Pisces, Characidae) no estado da Bahia utilizando marcadores citogenéticos.** Orientador: Dr. Marco Antônio Costa. Coorientadores: Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e Paulo Luiz Souza Carneiro.

O gênero *Astyanax* é um dos mais numerosos da família Characidae, compreendendo uma centena de espécies, com muitos complexos de espécies e de ampla distribuição que habitam os mais diversos ambientes, como cabeceiras de rios e riachos. As análises cromossômicas no grupo têm demonstrado uma grande diversidade intra e interpopulacional em diversas espécies de bacias hidrográficas brasileiras. *Astyanax fasciatus* está entre o grupo das espécies que abrigam a maior diversidade cariotípica, cujos estudos citogenéticos evidenciam a ocorrência de dois 2n padrão (46 e 48). Com o objetivo de ampliar os dados para este gênero, análises cromossômicas foram realizadas em populações de *Astyanax aff. fasciatus* (Characidae, *Incertae sedis*) ao longo de bacias costeiras da Bahia (três populações na bacia do rio de Contas e uma população no Recôncavo Sul), nordeste do Brasil. Após estimulação mitótica, os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de células do rim anterior e as lâminas tratadas com as técnicas de coloração convencional com Giemsa, bandamento C, fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI e coloração com nitrato de prata. Todos os espécimes compartilharam o mesmo número diplóide de 48 cromossomos, porém, com fórmulas cariotípicas exclusivas para cada localidade. Vale ressaltar que uma segunda espécie de *Astyanax* ainda não identificada foi coletada em um pequeno tributário da bacia do médio rio de Contas (rio Preto do Crisciúma) em simpatria com *A. aff. fasciatus*. Os blocos heterocromáticos foram detectados, de forma discreta, nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos em *Astyanax sp.* e *A. aff. fasciatus*. As regiões organizadoras de

nucléolos impregnadas com nitrato de prata (Ag-RONs) evidenciaram múltiplos sítios, com variabilidade intra e interindividual no número de cromossomos marcados. Em *Astyanax* sp. e *A. aff. fasciatus* do rio Preto do Crisciúma, quatro cromossomos foram marcados com diferenças sutis entre as espécies. Nas outras quatro populações (calha principal do rio de Contas, Preto do Costa, Mutum e Mineiro) até cinco sítios portadores de Ag-RONs foram identificados. A coloração com fluorocromos base-específicos evidenciou diferenças interpopulacionais nas marcações CMA₃ positivas e DAPI negativas, variando a posição, o tipo e o número de cromossomos, sendo as RONS GC ricas. O ambiente particular habitado pelas espécies do gênero *Astyanax* determina o isolamento geográfico dessas populações em cabeceiras de pequenos riachos, onde restrições ao fluxo gênico e pressões seletivas particulares de cada ambiente, combinados a história evolutiva da própria bacia, facilitariam a fixação de distintas formas cariotípicas. Assim, é possível que os cariomorfos analisados neste trabalho representem unidades evolutivas independentes, caracterizando complexos de espécies, onde as inversões pericêntricas e rearranjos microestruturais teriam papel fundamental na diversificação do grupo.

Palavras-chave: bacias do Atlântico Leste, *Astyanax* aff. *fasciatus*, citotaxonomia, Ag-RON, fluorocromos.

ABSTRACT

MEDRADO, Aline Souza. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011, February. **Population analysis in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Pisces, Characidae) in Bahia state using cytogenetic markers.** Advisor: Dr. Marco Antônio Costa. Co-Advisor: Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso and Paulo Luíz Souza Carneiro.

Astyanax is one of the species-richest genera in the family Characidae, comprising a hundred species, including many widely distributed species complexes inhabiting an array of environments, such as headwaters and streams. Chromosomal analyses in this group have shown a remarkable intra and interpopulation diversity in several species from Brazilian hydrographic basins. *Astyanax fasciatus* stands out as a species group encompassing the highest karyotypic diversity, in which cytogenetic studies have reported the occurrence of two standard $2n$ values (46 and 48). In order to increase the data about this genus, chromosomal analyses were carried out in populations of *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characidae, *Incertae sedis*) from coastal basins in Bahia (three populations from Contas river basin and one from Recôncavo Sul), northeastern Brazil. After mitotic stimulation, the metaphasic chromosomes were obtained from anterior kidney cells and the slides were treated by conventional Giemsa staining, C-banding, base-specific CMA₃/DAPI fluorochrome and silver nitrate staining. All specimens shared a diploid number of 48 chromosomes but the karyotypic formulae were exclusive to each collection site. It should be pointed out that a second unidentified *Astyanax* species was collected in a small tributary from Middle Contas basin (Preto do Crisciúma river) in sympatry with *A. fasciatus*. The heterochromatic blocks were detected, faintly, at pericentromeric regions of all chromosomes in *Astyanax* sp. e *A. aff. fasciatus*. The nucleolar organizer regions stained by silver nitrate (Ag-RONs) revealed multiple sites with intra and interindividual variability in the number of NOR-bearing chromosomes. In *Astyanax* sp. and *A. aff. fasciatus* from Preto do Crisciúma river, four chromosomes were

stained with subtle differences among species. In the four remaining populations (main channel of Contas river, Preto do Costa river, Mutum river and Mineiro stream) up to five NOR-bearing chromosomes were identified. The base-specific fluorochrome staining showed interpopulation differences in the CMA₃ positive and DAPI negative signals in relation to position, type and number of chromosomes, being some GC-rich blocks coincident with NORs. The peculiar environment inhabited by *Astyanax* species determines the geographic isolation of these populations in headwaters of small streams, where restrictions to gene flow and particular selective pressures of each habitat, combined with the evolutionary history of the basin itself would favor the fixation of distinct karyotypic forms. Therefore, it is plausible that the analyzed caryomorphs analyzed in the present work represent independent evolutionary units, characterizing species complexes in which pericentric inversions and microstructural rearrangements should have played a major role in the diversification of the group.

Key Words: Eastern Atlantic basin, *Astyanax* aff. *fasciatus*, cytotaxonomy, Ag-NOR, fluorochromes.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	Página
1	– Localização da bacia hidrográfica do rio de Contas, nordeste do Brasil. Fonte: INGÁ, 2008.....	05
	– CAPÍTULO 1: Análise citogenética de duas espécies simpátricas de <i>Astyanax</i> (Characiformes, Characidae) da bacia do rio de Contas, nordeste do Brasil	
1	– Mapa da área de estudo no estado da Bahia mostrando o rio Preto do Crisciúma, microbacia Guariba – Crisciúma, afluente da bacia hidrográfica do Rio de Contas, Nordeste do Brasil (a). Vista parcial mostrando o rio Preto do Crisciúma (b). Exemplar de <i>Astyanax</i> sp.(c) e <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> (d)	38
2	– Cariótipos de <i>Astyanax</i> sp.(a) e <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> do rio Preto do Crisciúma com 2n=48 cromossomos corados com Giemsa. No detalhe, cromossomos portadores das Ag-RONs.....	39
3	– Cariótipos após bandamento C de <i>Astyanax</i> sp.(a) e <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> (b) do rio Preto do Crisciúma.....	40
4	– Metáfases de <i>Astyanax</i> sp.(a, b) e <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> (c, d) do rio Preto do Crisciúma após coloração com os fluorocromos Cromomicina A ₃ (CMA ₃) e DAPI. Os asteriscos indicam os cromossomos portadores de sinais CMA ₃ positivos (a, c) e DAPI negativos (b, d)	41
	– CAPÍTULO 2: Divergência alopátrica baseada em marcadores	

cromossômicos em *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characiformes, Characidae) de bacias costeiras do nordeste do Brasil.

- 1 – Locais de coleta de exemplares de *Astyanax* aff. *fasciatus*. A) Mapa das bacias do nordeste: IV – Bacia do rio de Contas; V – Bacia do Recôncavo Sul. B) a – ribeirão Mineiro. C) a- calha principal do rio de Contas, b- rio Preto do Costa, c- rio Mutum. D) Vista parcial mostrando os locais de coleta de *Astyanax* aff. *fasciatus*: calha principal do rio de Contas (a), rio Preto do Costa (b), rio Mutum (c) e ribeirão Mineiro (d) 58
- 2 – Cariótipos das populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* com $2n=48$ cromossomos corados com Giemsa. (A) calha principal do rio de Contas, (B) rio Preto do Costa, (C) rio Mutum e (D) ribeirão Mineiro. No detalhe, cromossomos portadores das Ag-RONs..... 59
- 3 – Metáfases de *Astyanax* aff. *fasciatus* após coloração com os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI. (A) calha principal do rio de Contas, (B) rio Preto do Costa, (C) rio Mutum e (D) ribeirão Mineiro. Os asteriscos indicam os cromossomos portadores de sinais CMA₃ positivos (a,c,e,g) e DAPI negativos (b, d,f, h)..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados citogenéticos das espécies do gênero *Astyanax*18

Capítulo 2- DIVERGÊNCIA ALOPÁTRICA BASEADA EM MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM *Astyanax* aff. *fasciatus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DE BACIAS COSTEIRAS DO NORDESTE DO BRASIL.

Tabela 2- Lista de espécimes de *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characiformes, Characidae) analisadas no trabalho48

1. INTRODUÇÃO

Os peixes constituem o grupo mais antigo e numeroso de vertebrados e encontram-se amplamente distribuídos, assumindo diferentes formas e ocupando diferentes nichos ecológicos. Grande parcela dessa diversidade de peixes está na região neotropical, ocorrendo 71 famílias e 4.475 espécies descritas. Sua rede hidrográfica é portadora dos mais representativos grupos de espécies de peixes. Dentre estes grupos, a ordem Characiformes se faz presente como um dos grupos dominantes, constituído por 1.674 espécies, 270 gêneros e 18 famílias.

A bacia hidrográfica do rio de Contas está entre as seis mais importantes bacias do estado da Bahia, apresentando uma ictiofauna diversificada, composta por várias espécies de pequeno a médio porte e caracterizada por um elevado grau de endemismo. Dentre as espécies de Caraciformes ocorrentes nessa bacia, as da família Characidae representam o maior número. Estes peixes apresentam hábitos alimentares diversos (herbívoros, carnívoros e onívoros) e exploram uma grande variedade de habitats. Estão presentes em praticamente todos os ambientes de água doce, desde a fronteira México-Estados Unidos até o sul da Argentina.

Dentre os integrantes da família Characidae destacam-se os representantes do gênero *Astyanax*, um dos mais especiosos na área de abrangência da região neotropical, com aproximadamente uma centena de espécies conhecidas e habitantes de diversos ambientes, inclusive as águas de cabeceiras de rios e riachos. O conhecimento das comunidades de peixes destes ambientes se faz necessário devido ao endemismo encontrado em rios tropicais.

Devido a características inerentes ao ambiente aquático, tais como cachoeiras, diferentes bacias hidrográficas ou mesmo as próprias peculiaridades ambientais de cada local por onde banham as águas dos sistemas hídricos, os peixes estão sujeitos a uma possibilidade de isolamentos geográficos. Assim, podemos encontrar nesses animais uma grande

diversidade citogenética. Isso é particularmente verdadeiro para as espécies do gênero *Astyanax*, como *Astyanax fasciatus*.

Os estudos citogenéticos nesse complexo de espécies têm demonstrado uma ampla diversidade cariotípica relacionada aos números diplóides, padrões de distribuição de heterocromatina e das regiões organizadoras de nucléolos em muitos tributários de bacias hidrográficas brasileiras. Assim, estudos cromossômicos em amostras de *A. aff. fasciatus* de bacias costeiras e isoladas da Bahia são importantes, pois o conhecimento dos peixes dessa região permitirá uma melhor compreensão dos aspectos evolutivos e taxonômicos das espécies dessa região biogeográfica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização da bacia hidrográfica do rio de Contas

A bacia hidrográfica do rio de Contas está entre as seis mais importantes bacias do estado da Bahia. Juntamente com os rios Vaza Barris, Itapicuru, Paraguaçu, Pardo e Jequitinhonha, ela integra o conjunto de bacias da região hidrográfica do Atlântico Leste localizadas no estado (MMA, 2006; Severi et al., 2010) (Figura 1). Localiza-se na porção centro-sul do estado, entre as coordenadas 12° 55' e 15° 30' de latitude sul e 39° 00' 42° 35' de longitude oeste. Faz limites ao norte com a bacia do rio Paraguaçu e com as bacias do Leste, a oeste com a bacia do rio São Francisco, a leste com o Oceano Atlântico e ao sul com a bacia do rio Pardo e com o Estado de Minas Gerais (SRHSH, 1993). O rio de Contas é o principal rio dessa bacia, com nascente no município de Piatã na Chapada Diamantina e desaguando no Oceano Atlântico na cidade de Itacaré, litoral da Bahia. Sua área de drenagem perfaz um total de aproximadamente, 55.334 km² (CRA, 2001), 75% da qual inserida no bioma Caatinga. A parte restante atravessa zona de matas litorâneas da região cacauzeira em áreas de Mata Atlântica (Severi et al., 2010).

A bacia do rio de Contas apresenta três regiões com características fisiográficas bem diferenciadas: Alto, Médio e Baixo Contas. O Alto Contas é a parte da bacia compreendida do divisor de águas do rio São Francisco até, aproximadamente, as cidades de Itanhacú e Anagé, com extensão de 183 km, e um desnível de 896 km, onde predominam as características climáticas e fisiográficas do semi-árido baiano. Nesta região localizam-se os principais tributários do rio de Contas: os rios Brumado, do Antônio e Gavião. O Médio Contas é um trecho da bacia compreendido entre a cidade de Contendas do Sincorá e Jequié, onde ocorre a transição do clima semi-árido da caatinga para o clima semi-úmido do Baixo Contas. Nesta região destacam-se os rios Sincorá, Jacaré e Jequezinho, tributários da margem esquerda do

Contas bem como o grande reservatório da Barragem da Pedra, situado a 18 km à montante da cidade de Jequié. O Baixo Contas é a parte da bacia compreendida desde Jequié até a foz no Oceano Atlântico, com clima semi-úmido e predominância da floresta tropical denominada Mata Atlântica, onde destaca-se a grande contribuição hídrica originária do rio Gongogi (SRHSH, 1993).

As principais demandas de água verificadas atualmente na bacia do rio de Contas são para o abastecimento humano, irrigação, geração de energia (usina hidrelétrica da Barragem da Pedra, em Jequié, e Funil, em Ubatã) e mineração. A agricultura irrigada constitui um dos mais importantes vetores para a modernização e para a expansão da atividade agropecuária na bacia, sendo a região da Barragem da Pedra um grande pólo regional de irrigação, no trecho médio do Contas, onde já existe condições de infra-estrutura adequada. De igual modo, a potencialidade dos recursos minerais é uma das mais expressivas do estado, merecendo destaque a exploração de manganês, magnesita, vanádio, ferro e barita. Vale destacar, as atividades turísticas nas regiões de Itacaré e do Alto Contas, entretanto, sua expansão deve ser acompanhada de procedimentos ambientais adequados (SRHSH, 1993).

Essa bacia apresenta uma ictiofauna diversificada e composta por várias espécies de pequeno a médio porte, de importância econômica local e algumas endêmicas. Dentre as espécies ocorrentes nessa bacia, as da família Characidae representam o maior número (Severi et al., 2010).

De fato, as drenagens costeiras do leste do Brasil representam uma importante região de interesse biogeográfico devido ao seu elevado nível de endemismo (Jacobina et al., 2009; Zanata; Camelier, 2010), já que possui uma longa história evolutiva independente de suas bacias componentes (Ribeiro, 2006). Observa-se um grande número de espécies não descritas, demonstrando que estas áreas são insuficientemente conhecidas, mas de extrema importância biológica (Cetra et al., 2010).

Alguns táxons coletados nos tributários da porção média e inferior na bacia do rio de Contas e, na área de influência do reservatório de Funil, carecem de avaliação mais precisa de seu estado taxonômico, o que pode levar à descrição de novas espécies. Isso é particularmente verdadeiro para aqueles grupos de pequeno porte e distribuição restrita aos ambientes da bacia

inseridos no bioma Mata Atlântica. Dentre elas, podem ser citados os gêneros *Asidoras*, *Otocinclus*, *Heptapterus*, *Hypostomus* e *Trichomycterus* dentre os Siluriformes, e *Astyanax*, *Characidium* e alguns Cheirodontinae dentre os Characiformes. Dentre as espécies consideradas endêmicas da bacia do rio de Contas ou de distribuição restrita na bacia do Atlântico leste, destacam-se *Lignobrycon myersi*, *Hemipsilichthys bahianus*, *Apareiodon itapicuruensis* e *Parotocinclus jimi* (Severi et al., 2010).

O crescimento populacional, o desmatamento, a expansão urbana, a poluição e a pressão de uso dos recursos hídricos têm provocado alterações ambientais ainda não adequadamente avaliadas em diversas bacias hidrográficas costeiras do Brasil. O seu efeito sobre as assembléias de peixes necessita ser dimensionado, de modo que possam ser adotadas medidas de manejo que permitam a conservação da ictiodiversidade (Severi et al., 2010).

A bacia do Rio de Contas sofre uma série de problemas relacionados ao uso intensivo dos recursos naturais, sobretudo dos recursos hídricos, como degradações por desmatamento, assoreamento, despejos e esgotos, deposição inadequada de lixo urbano e hospitalar, a exploração de recursos minerais e uso de agrotóxicos nas áreas agrícolas com grandes alterações no ecossistema (CRA, 2001; MMA, 2006; Severi et al., 2010). Por exemplo, a piaba-facão *Lignobrycon myersi*, restrita à bacia do rio de Contas e do rio Almada, já está incluída na Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2005) como vulnerável em função da destruição de habitats, poluição e introdução de espécies exóticas em sua área de ocorrência.

Desta forma, estudos sobre a distribuição ictiofaunística em bacias costeiras do nordeste são importantes, pois o conhecimento dos peixes dessa região permitirá uma melhor compreensão dos aspectos evolutivos e taxonômicos das espécies desse ecossistema.

2.2. Particularidades do ambiente de cabeceira de riachos

Os peixes constituem o grupo mais antigo e numeroso de vertebrados. Eles encontram-se amplamente distribuídos, assumindo diferentes formas e ocupando diferentes nichos ecológicos. Nelson (2006) estimou a existência de 27.977 espécies, divididas em 515 famílias,

onde o número atual de espécies válidas representa mais da metade do número total de vertebrados vivos conhecidos no mundo. Reis (2003), afirma que a fauna de água doce da região neotropical, uma das mais ricas e diversificadas do planeta, apresenta 71 famílias e 4.475 espécies descritas.

Zanata e Camelier (2010) ressaltam que o conhecimento da estrutura e organização das comunidades de peixes de ambientes de riachos e cabeceiras deveria ser considerado prioritário, em vista do elevado grau de endemismo, com relação as numerosas e relativamente desconhecidas espécies de pequeno porte que neles habitam. Dessa forma, os estudos ecológicos e levantamento faunístico em riachos têm aumentado significativamente devido à grande importância deste ecossistema na manutenção da biodiversidade.

A fauna dulcícola encontra-se confinada por barreiras geográficas dentro de cada sistema hidrográfico. Tal confinamento resulta em um estreito relacionamento entre a história das bacias e a história natural-evolutiva destes animais (Avice, 2000). Alterações que porventura ocorram nas bacias ou em seus tributários, sejam por motivos naturais ou pela própria ação antrópica, influenciam todo o ecossistema, tornando peculiar a história natural das populações que o compõem (Pamponet et al., 2008). Em pequenos corpos d'água, como os riachos, as alterações do meio podem ser tão bruscas a ponto de se tornarem fatores limitantes para a vida. No entanto, existem alguns peixes mais aptos à vida em ambientes de cabeceira, pois possuem a capacidade de resistir a uma grande amplitude de fatores impactantes tais como as alterações abióticas (Kavalco, 2003).

Os riachos apresentam condições peculiares, bem como a sua fáunula ictiológica. Situações climáticas interferem muito mais rapidamente nestes ambientes quando comparados com os grandes rios. Por exemplo, as tempestades de verão alteram rapidamente as condições abióticas (temperatura, pH, condutividade oxigênio dissolvido e turbidez). As enxurradas formadas pelo grande volume de água que chega rapidamente nos riachos formam correntezas que podem afetar a comunidades deste ambiente, carreando as larvas, alevinos e até mesmo deslocando as populações de peixes de seu micro habitat. Dependendo da intensidade, as chuvas podem alterar o leito dos riachos, carreando material alóctone para esse local ou, inversamente, retirando material do leito e depositando-os em suas margens. Assim sua ictiofauna está sujeita a este conjunto de modificações ambientais, relativamente comuns na região tropical.

Castro (1999) afirma que as áreas de cabeceira são habitadas primariamente por peixes de pequeno porte, com capacidade de deslocamento relativamente restrita dentro de grandes bacias hidrográficas, com pouco ou nenhum valor comercial, e grandemente dependentes da vegetação ripária para a alimentação, reprodução e abrigo.

Vale ressaltar que as dimensões físicas reduzidas das áreas de cabeceiras permitem que estes ambientes sejam, imediata e negativamente, alterados por intervenções antrópicas em suas bacias de drenagem (Castro; Menezes, 1996). Alguns efeitos negativos são devido aos poluentes (Cetra; Petrere Jr, 2006; Severi et al., 2010), enquanto outros estão associados às mudanças na hidrologia da bacia (Moreira-Filho; Buckup, 2005), modificações no hábitat e alterações das fontes de energia, das quais depende a biota aquática (Araújo, 1998).

A importância biológica do estudo de ambientes de cabeceiras dos rios é ressaltada por Lowe-McConnell (1969) onde o tamanho absoluto de certos sistemas de rios é fator importante, pois pode permitir que muitas espécies evoluam dentro do próprio sistema, desenvolvendo-se em isolamento geográfico nas cabeceiras dos tributários. As barreiras entre as populações podem ser físicas, como a velocidade do fluxo da água ou tipo do leito do rio; químicas, como o tipo de água ou mesmo bióticas e sua existência acaba por dificultar a passagem de uma espécie de uma bacia para a outra, criando algumas das situações necessárias ao isolamento reprodutivo e consequente especiação.

Entre os peixes de pequeno porte habitantes de cabeceiras de riachos verifica-se a presença de representantes do gênero *Astyanax*. Acredita-se que estes animais possam ter evoluído independentemente nas diferentes bacias hidrográficas, ou até dentro de um mesmo sistema hidrográfico a partir de isolados populacionais (Moreira-filho; Bertollo, 1991). Assim, estes peixes confinados a estes ambientes particulares proporcionam um excelente material para estudos genéticos e evolutivos.

2.3. Aspectos da ordem Characiformes e família Characidae

Os Characiformes são, sem dúvida, a ordem mais notavelmente numerosa e diversa da região Neotropical, com 1.674 espécies, 270 gêneros e 18 famílias: Distichodontidae, Citharinidae, Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Chilodontidae,

Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Erythrinidae, Lebiasinidae, Ctenolucidae e Hepsetidae. Representantes desta ordem possuem ampla distribuição em águas continentais do sul dos Estados Unidos, México, Américas Central e do Sul e África, compreendendo o maior número de peixes conhecidos, como as piranhas, os tetras e os lambaris (Reis et al., 2003).

Toda esta diversificação resultou em diferentes modificações das características ao longo da evolução das linhagens no grupo. Assim, torna-se difícil uma caracterização aplicável a todos os caraciformes. Dentre as características morfológicas amplamente distribuídas, pode-se citar: dentes usualmente desenvolvidos (a maioria é carnívora), corpos geralmente pequenos e prateados, comportamento normalmente diurno, a freqüente presença de nadadeira adiposa, linha lateral completa ou incompleta, barbilhões ausentes e a intolerância à água salgada (Nelson, 2006).

Representantes da ordem Characiformes ocorrem desde ambientes lênticos, até lóticos, com um caso registrado de uma espécie (*Characidium tinbuiensis*) subindo quedas de água por pedras (Buckup et al., 2000), ou de espécies transpondo quedas de água através de saltos (*Prochilodus* spp.). Vários grupos de Characiformes possuem grande importância na pesca (por exemplo, *Brycon*, Citharinidae, *Hydrocynus*, *Salminus* e Prochilodontidae) sendo muitas vezes a única fonte de proteína animal de algumas populações ribeirinhas, enquanto outras possuem importância no mercado de aquarofilia (*Paracheirodon* e *Gymnocorymbus* entre outros).

A família Characidae faz parte da ordem Characiformes e engloba a maior parte dos peixes brasileiros de água doce. Ela é representada por cerca de 776 espécies, as quais eram distribuídas em 30 subfamílias e 250 gêneros com características altamente heterogêneas entre si (Britski et al., 1988). Porém, Reis et al. (2003) manteve apenas aquelas subfamílias para as quais existem evidências de origem única e lista uma enorme diversidade de caracídeos como *Incertae sedis* devido à falta de evidências consistentes do monofiletismo entre seus representantes. Diante disso, a família passou então a ser composta por apenas 12 subfamílias (Lima et al., 2003) e 620 espécies distribuídas em 88 gêneros da antiga subfamília Tetragonopterinae que são, atualmente, consideradas *Incertae sedis*, incluindo grupos ricos em espécies como os gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e *Bryconops* (Reis et al., 2003). Consequentemente, somente as espécies do

gênero *Tetragonopterus* permaneceram dentro dos Tetragonopterinae (Weitzman; Malabarba, 1988; Reis et al., 2003, Lima et al., 2003).

De modo geral, os Characidae incluem peixes com hábitos alimentares diversos (herbívoros, carnívoros e onívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats, sendo coletados com relativa facilidade nos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes encontrados. Seus integrantes são vulgarmente conhecidos como lambaris, dourados, pacus, matrinchãs, peixe-cachorro, entre muitos outros. Estão presentes em praticamente todos os ambientes de água doce, desde a fronteira México-Estados Unidos até o sul da Argentina (Britski et al., 1988).

Como consequência do grande número de espécies e da imensa variedade de formas, o reconhecimento das relações de parentesco entre Characidae e as demais famílias da ordem Characiformes tem sido muito prejudicado devido às dúvidas sobre o monofiletismo da família, dificultando, assim proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro da mesma (Lucena, 1993).

Igualmente, os estudos citogenéticos na família Characidae evidenciam uma extensa variabilidade cromossômica, compreendida entre $2n=28$ para *Hemigrammus* (Scheel, 1973) e $2n=64$ para *Serrasalmus holandi* (Muramoto et al., 1968), porém com predominância de cariótipos com $2n=48$ a $2n=54$ cromossomos (Oliveira et al., 1988). Essa família apresenta uma variabilidade de número e forma cariotípica tanto em espécies de um mesmo gênero (Morelli et al., 1983; Falcão et al., 1984), como entre populações da mesma espécie (Moreira-Filho; Bertollo, 1991). Apesar da grande plasticidade cariotípica dessa família, ela apresenta uma característica ao qual é compartilhada pela maioria de seus representantes, a presença de um par metacêntrico maior do complemento, o que é considerado um traço simplesiomórfico dos Characiade (Scheel, 1973; Morelli et al., 1983; Portela et al., 1988; Daniel-Silva; Almeida-Toledo, 2001; 2005).

Nessa família, podem ser encontrados gêneros com números cromossômicos constantes e pouca variabilidade cariotípica, tais como *Salminus* (Souza et al., 2008), *Brycon* (Wasko; Galetti-Júnior, 2000) e *Oligosarcus* (Rubert; Margarido, 2007). Porém, a maioria apresenta variabilidade cariotípica como, por exemplo, *Bryconamericus* (Painter-Marques et al., 2003; Portela-Castro et al., 2008), *Serrasalmus* (Nakayama et al., 2000) e *Astyanax*

(Moreira-filho; Bertollo, 1991; Fernandes; Martins-santos, 2004; Pazza et al., 2006; Vicari et al., 2008; Medrado et al., 2008).

O gênero *Astyanax* (*Incertae sedis*) é o mais especioso e diversificado da família Characidae na área de abrangência da região neotropical. As espécies desse gênero são vulgarmente conhecidas como lambaris ou piabas e habitam diversos ambientes, inclusive as águas de cabeceiras de rios e riachos. O gênero congrega, aproximadamente, uma centena de espécies abundantes nas bacias hidrográficas brasileiras (Garutti; Britski, 2000; Lima et al., 2003; Pazza; Kavalco, 2007). No entanto, esse número é subestimado, uma vez que novas espécies vêm sendo descritas anualmente, a maior parte delas provindas de pequenos rios e córregos de diversos sistemas hidrográficos sul-americanos (Castro; Vari, 2004; Lima; Zauanon, 2004; Bertaco; Lucinda, 2005; Haluch; Abilhoa, 2005; Bertaco; Lucena, 2006; Bertaco; Garutti, 2007; Vari; Castro, 2007; Garutti; Venere, 2009; Zanata; Camelier, 2009; Marinho; Lima, 2009).

Em geral, as espécies de *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil (Melo, 2001). Portanto, trabalhos de revisão de espécies já descritas são importantes para elucidar possíveis redundâncias, contribuindo para entendimento da história evolutiva do grupo (Garutti; Langeani, 2009; Bertaco; Lucena, 2010).

2.4. Cenário geral da citogenética em *Astyanax*

Os estudos citogenéticos fornecem informações que contribuem para uma melhor identificação das diferentes espécies, contribuindo para o conhecimento da estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos (Nirchio; Oliveira, 2006).

As análises do cariótipo possuem importantes aplicações e contribuem para o entendimento da evolução e filogenia cromossômica, possibilitando a realização de estudos citotaxonômicos. Essas análises, se estendidas a vários exemplares coletados em diferentes localidades e, com o emprego de diferentes técnicas de marcação cromossômica, podem caracterizar espécies de forma mais completa, possibilitando entender a ocorrência de casos

de polimorfismos cromossômicos e diferentes cariomorfos restritos a uma dada população (Kasahara, 2009).

No gênero *Astyanax*, os estudos citogenéticos evidenciam uma diversidade cariotípica acentuada, compreendida entre $2n=36$ em *Astyanax schubarti* (Morelli et al., 1983; Daniel-Silva; Almeida Toledo, 2001, 2005) a $2n=50$ em *Astyanax scabripinis*, *A. bockmani*, *A. altiparanae* e *A. fasciatus* (Oliveira et al., 1988; Souza; Moreira-Filho, 1995; Artoni et al., 2006; Kavalco et al., 2009a; Ferreira Neto et al., 2009) (ver tabela 1). A grande variabilidade cariotípica observada nesse gênero torna difícil quaisquer inferências sobre a evolução cromossômica do grupo, sobretudo nas espécies com alto grau de polimorfismos (Pazza; Kavalco, 2007).

Baseados em características cromossômicas e morfológicas, são reconhecidos atualmente, pelo menos, três complexos de espécies para o gênero: *Astyanax fasciatus*, *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax altiparanae* (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; Fernandes; Martins-Santos, 2005; Pazza et al., 2006; Pazza; Kavalco, 2007; Medrado et al., 2008).

Astyanax scabripinnis, a espécie mais estudada no gênero, apresenta um alto grau de variação citogenética, mostrando uma grande diversidade cromossômica. Análises cariotípicas em populações dessa espécie, pertencentes a diferentes córregos de uma mesma bacia hidrográfica, ou mesmo a diferentes bacias hidrográficas podem apresentar números diplóides específicos ($2n= 46, 48$ e 50 cromossomos), bem como padrões particulares de bandamento C (Mantovani et al., 2000; Moreira-Filho et al., 2004; Vicari et al., 2008b), variações no número de regiões organizadoras de nucléolos (Mantovani et al., 2005; Vicari et al., 2008b), além de diversas formas de polimorfismos relacionados a cromossomos Bs (Maistro et al., 1992; Mestriner, et al., 2000; Néó et al., 2000a; Néó et al., 2000b; Moreira-Filho et al., 2004; Fernandes; Martins-Santos, 2005) e casos de triploidia natural (Fauaz; Moreira-Filho, 1994; Malacrida et al., 2003), além de variações no número e na morfologia cromossômica (Moreira-Filho; Bertollo, 1991). Esses dados, associados a estudos morfológicos utilizando a análise de variáveis canônicas, sugerem que *A. scabripinnis* é um complexo de espécies na maioria das vezes representadas por populações isoladas nas cabeceiras de pequenos tributários de grandes bacias hidrográficas (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; Kavalco; Moreira-Filho, 2003; Moreira-Filho et al., 2004; Fernandes; Martins-Santos, 2005; Mantovani, et al., 2000; Vicari et al., 2008b).

No complexo *Astyanax altiparanae*, os estudos citogenéticos têm mostrado grandes variações como diferença em suas fórmulas cariotípicas e no número de cromossomos marcados pela prata (Ag-RONs) que não afetam o número diplóide de $2n=50$ (Fernandes; Martins-Santos, 2004; Domingues et al., 2007; Pamponet et al., 2008). *A. altiparanae* é uma designação recente, 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. A localidade tipo, América Meridional, é incerta, como também sua distribuição geográfica. Hashimoto et al. (2008) relatou a ocorrência de um microcromossomo B em populações de *A. altiparanae* na bacia do rio Tiête no sudeste do Brasil, polimorfismo não muito freqüente para esta espécie.

As primeiras análises citogenéticas em *Astyanax fasciatus* foram realizadas nos 70 por Jim e Toledo, e desde esta época este grupo tem sido amplamente estudado. Esta espécie foi descrita por Cuvier (1819), embora não se conheça com precisão, a localidade de origem do exemplar tipo, a qual é mencionada como “rios do Brasil” (Pazza; Kavalco, 2007).

As populações já analisadas de *A. fasciatus*, pequeno caracídeo de cauda-vermelha, caracterizam-se por um cariótipo variável, no qual é possível identificar dois números diplóides padrão com base no pareamento dos cromossomos homólogos, sendo $2n=46$ e 48 , com pequenas diferenças cariotípicas dentro de cada cariomorfo. O cariomorfo $2n=46$ ocorre em vários afluentes da bacia do alto rio Paraná, especialmente no rio Araguari (Torres-Mariano; Morelli, 2006), no trecho médio do rio Tietê (Abel et al., 2006), na bacia do rio Paranapanema (Pazza et al., 2008) e no rio Mogi-Guaçu (Pazza et al., 2006). O cariomorfo $2n=48$ é o de maior distribuição e observado nas bacias do rio Grande (Centofante et al., 2003) e Mogi-Guaçu (Pazza et al., 2006; Pazza et al., 2008), pertencentes ao alto rio Paraná, bem como no rio Tibagi (afluente do rio Paranapanema) (Artoni et al., 2006), em drenagens costeiras na bacia do rio Ribeira do Iguape (Morelli et al., 1983) e no rio de Contas e riachos costeiros do estado da Bahia (Brasil) (Medrado et al., 2008). No entanto, Artoni et al. (2006) encontrou no rio Tibagi um cariomorfo com $2n=50$ cromossomos.

Diferentemente de *A. scabripinnis*, além dos diferentes $2n$ padrão, cariomorfos variantes e não relacionados com cromossomos B também já foram identificados em *A. fasciatus*, apresentando $2n=45$, 46 , 47 em simpatria no rio Mogi-Guaçu, bacia do rio Paraná (Pazza et al., 2006) e 49 cromossomos no rio Tibagi, bacia do rio Paraná (Artoni et al., 2006).

Além dos cariomorfos diferenciados pelo número diplóide, podem ser caracterizados outros quando comparados à fórmula cariotípica e aos padrões de distribuição e composição de heterocromatina e das regiões organizadoras de nucléolos (Peres et al., 2009).

Vale ressaltar em espécies do complexo *fasciatus*, a ocorrência de tamanho bem maior dos primeiros pares de cromossomos submetacêntricos e subteloacêntricos em relação aos demais do complemento. Este fato é facilmente observado em *A. aff. fasciatus* com $2n=48$ (Medrado et al., 2008). Já no cariomorfo $2n=46$ esta ocorrência não é tão marcante, sendo que o tamanho dos cromossomos decresce de maneira mais gradual (Abel et al., 2006).

Cromossomos Bs já foram reportados para a espécie *Astyanax fasciatus* (Moreira-Filho et al., 2001) em exemplares coletados no rio São Francisco, onde foi descrito um cromossomo B metacêntrico grande similar em tamanho ao primeiro par do complemento. Casos de triploidia natural também têm sido identificados no complexo *A. fasciatus* como documentado por Peres et al. (2009) em exemplares do rio Piumhi, afluente da bacia do Rio Grande, região centro oeste do estado de Minas Gerais, Brasil.

A análise da variabilidade cariotípica em *Astyanax* pode ser complementada pela quantidade e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Os peixes neotropicais podem apresentar dois padrões de distribuição de Ag-RONs: em alguns grupos como Curimatidae, Anostomidae, Parodontidae e Prochilodontidae esses sítios estão localizados em um único par de cromossomos (Ag-RONs simples), enquanto que em outros grupos, o que prevalece é a ocorrência em vários cromossomos do cariótipo (Ag-RONs múltiplas), como em Callichthyidae, Characidae e Erythrinidae (Moreira-Filho, 1983). Nos *Astyanax*, a presença de RONs múltiplas representa a condição mais frequente (Pazza; Kavalco, 2007).

Kavalco e Moreira-Filho (2003), analisando quatro espécies de lambari (*A. scabripinnis*, *A. giton*, *A. parahybae* e *A. intermedius*) pertencentes à bacia do rio Paraíba do Sul, região sul do Brasil, apresentaram após impregnação pela prata, duas marcações em um par de cromossomos acrocêntricos em *A. scabripinnis*. Em *A. parahybae* a impregnação pela prata revelou múltiplas RONs em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, com número modal de duas marcas sobre o par metacêntrico. Em *A. intermedius*, os autores encontraram mais de seis marcações, evidenciadas pela prata, tanto nos braços curtos como nos braços

longos de cromossomos acrocêntricos. Os exemplares de *Astyanax giton* apresentaram também acima das seis marcas, com valor modal igual a duas marcações em pares de cromossomos acrocêntricos.

Em *A. fasciatus*, as RONS são múltiplas com até dez cromossomos marcados, embora algumas populações apresentem RON simples (Medrado et al., 2008; Torres-Mariano; Morelli, 2006; Pazza et al., 2006). Em *A. altiparanae* do rio dos Índios, bacia do rio Ivaí, região sul do Brasil, 10 cromossomos portadores de Ag-RONS foi descrito para esta espécie (Fernandes; Martins-Santos, 2004). Em *A. bockmanni* da bacia do rio Paranapanema e na população da bacia do rio Araguari, região sudeste do Brasil, a Ag-RON é múltipla com até seis cromossomos marcados (Kavalco et al., 2009a; Torres-Mariano; Morelli, 2008). No complexo *A. scabripinnis* já foram encontradas populações com o número de Ag-RONS variando de um a quinze (Rocon-Stange; Almeida-Toledo, 1993; Mantovani et al., 2000; Maistro et al., 2001; Araújo; Morelli, 2006; Vicari et al., 2008b).

Da mesma forma que as Ag-RONS, as análises de heterocromatina através de técnicas de bandamento C, são de grande importância para o estudo da diversificação cariotípica nos peixes neotropicais. Nos *Astyanax*, vários trabalhos relatam que as marcações de heterocromatina foram utilizadas para estudos de evolução, polimorfismo, diversificação das espécies, dimorfismo sexual e caracterização populacional (Artoni et al., 2006; Domingues et al., 2007; Kantek et al., 2007; Kavalco et al., 2007; Vicari et al., 2008).

Neste grupo de peixes, blocos heterocromáticos são frequentemente observados em regiões centroméricas e/ou pericentroméricas de todos os pares cromossômicos, como em *Astyanax giton* (Kavalco et al., 2007) e *A. jacuhiensis* (Pacheco et al., 2010), em regiões terminais de alguns cromossomos, sendo eles coincidentes com Ag-RONS, como relatado por Rosa et al. (2009) em populações de *A. laticeps* ou ainda grandes blocos terminais como em *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2000), blocos intersticiais como em *A. altiparanae* (Hashimoto et al., 2008). No caso de *A. scabripinnis*, o padrão de distribuição da heterocromatina tem se mostrado como uma característica eficaz para discriminar as populações (Souza, 1996; Mantovani et al., 2000). Em *A. fasciatus*, Pazza et al. (2008) observou pequenos blocos heterocromáticos centroméricos e blocos maiores localizados na região terminal de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos e na

região organizadora nucleolar. Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2001) estudando *A. fasciatus* da bacia do Paraná, no rio Mogi-Guaçu (Pirassununga, SP), observaram blocos heterocromáticos na região terminal do braço longo de seis cromossomos, pares oito, dez, onze, dezoito, dezenove e vinte e dois.

Os fluorocromos são corantes fluorescentes ligantes de DNA, geralmente utilizados associados com um contracorante. Existem duas categorias destes corantes, com especificidade para as bases AT ou com afinidade para as bases GC, e em geral, esses podem ser o DAPI e o CMA₃, respectivamente (Kasahara, 2009). Em peixes, os fluorocromos GC-específicos apresentam uma considerável correspondência com as regiões organizadoras de nucléolos. A coincidência de localização entre as marcações obtidas com o uso dos fluorocromos GC-específicos e as resultantes da impregnação por nitrato de prata, seria possível, segundo Pendás et al. (1993), devido a ocorrência de altos conteúdos de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre sequências de DNA repetitivos adjacentes. Assim, a coloração com fluorocromos GC-específicos permitiria identificar as RONS independentemente de sua atividade durante o ciclo celular anterior. E os fluorocromos AT-específicos em *Astyanax*, resultam em bandas negativas coincidentes com as bandas CMA₃ positivas.

Fernandes e Martins-Santos (2004) estudaram duas populações de *Astyanax altiparanae*, do rio dos Índios (bacia do rio Ivaí) e do rio Paraná (bacia Paraná), ambas pertencentes à região sul do Brasil. Os autores observaram a existência de marcações fluorescentes CMA₃⁺ correspondentes as RONS na população do rio Ivaí e na população do rio Paraná, além do par nucleolar, outras marcações positivas foram detectadas em outros cromossomos, as quais provavelmente correspondem a regiões de heterocromatina.

A aplicação de CMA₃ em duas populações de *A. altiparanae*, do rio Tibagi e Iguaçu, bacia do Paraná, sul do Brasil, realizado por Domingues et al. (2007), revelou que as regiões das RONS respondia positivamente à coloração sendo, portanto, rica em bases GC. Duas outras regiões GC-ricas foram detectadas em *A. altiparanae* do rio Tibagi, na posição telomérica de um cromossomo metacêntrico e na posição terminal do braço longo de um cromossomo subtelo-cêntrico.

Estudos realizados em duas populações de *Astyanax scabripinnis* por Biavati e Maistro (2007), do rio Machado e córrego Pedra Branca, bacia do Rio São Francisco, região sudeste do Brasil, observaram que o tratamento com cromomicina A_3 na população do rio Machado revelou sinais fluorescentes terminais em dois cromossomos não homólogos e nas amostras de Pedra Branca quatro cromossomos com marcações CMA_3^+ terminais foram observados, sendo alguns destes coincidentes com os cromossomos portadores da região organizadora nucleolar.

Kavalco et al. (2007) estudando quatro espécies de lambari, *Astyanax scabripinnis*, *A. parahybae*, *A. intermedius* e *A. giton*, encontraram diferentes padrões de coloração com os fluorocromos base-específicos. Em *A. scabripinnis*, a aplicação de cromomicina A_3 revelou três sinais fluorescentes CMA_3^+ no braço curto de um par cromossômico subtelocêntrico e no braço longo de um cromossomo submetacêntrico, ambos na região terminal. Marcações GC-positivas foram detectadas na região terminal do braço curto de um cromossomo metacêntrico grande e em um par metacêntrico de tamanho médio em *A. parahybae*. Em *A. intermedius* e *A. giton*, o tratamento com o fluorocromo CMA_3 não mostrou sinal fluorescente.

Em *A. jacuhiensis*, Pacheco et al. (2010) encontrou até quatro marcações CMA_3 positivas, onde o par oito da RON mostrou-se corado e um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos também foi detectado. Portanto, *A. jacuhiensis* contém uma classe de heterocromatina GC-rica em alguns pares de cromossomos e os cístrons ribossomais parecem ser intercalados com este tipo de heterocromatina.

Observa-se assim que o gênero *Astyanax* apresenta uma extensa variabilidade em suas fórmulas cariotípicas as quais acompanham sua diversidade biológica sendo, desta forma, um grupo de organismos bastante interessante para estudos de biologia evolutiva. Desse modo, o estudo desse grupo é muito importante devido a sua complexidade citogenética e taxonômica e pela carência de dados em algumas regiões do Brasil, como o Nordeste. Esse é caso da Bacia Hidrográfica do rio de Contas, onde muitas de suas espécies e/ou populações de peixes são ainda desconhecidas do ponto de vista citogenético.

Tabela 01. Dados citogenéticos das espécies do gênero *Astyanax*.

Espécie	Localidade	Sistema Hidrográfico	2n	Fórmula Cromossômica	Referência
<i>Astyanax</i>					
<i>A.schubarti</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	Paraná	36	12m+16sm+4st+4a	Daniel-Silva; Almeida Toledo, 2001.
<i>A.altiparanae</i>	Córrego Pântano (SP)	Tietê	50	6m+28sm+4st+12a	Neto et al., 2009.
<i>A.altiparanae</i>	Córrego Fieirão (SP)	Paraná	50	6m+30sm+8st+6a	Neto et al., 2009.
<i>A. altiparanae</i>	Rio Jordão	Iguaçu	50	6m+28sm+8st+8a	Neto et al., 2009.
<i>A.aff.bimaculatus</i>	Rio de Contas (BA)	Médio Contas	50	6m+28sm+12st+4a	Pamponet et al., 2008.
<i>A.aff.bimaculatus</i>	Ribeirão Mineiro (BA)	Recôncavo Sul	50	6m+28sm+12st+4a	Pamponet et al., 2008
<i>A.bockmanni</i>	São Miguel Arcanjo e Pilar do Sul (SP)	Paranapanema	50	10m+12sm+12st+16a	Kavalco et al., 2009a.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Piracicaba - Piracicaba (SP)	Médio Tietê	46	12m+20sm+10st+4a	Abel et al., 2006.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Araguari (MG)	Paraná	46	14m+16sm+10st+6a	Torres-Mariano; Morelli , 2006.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Mogi-Guaçu – Cachoeira das Emas (SP)	Paraná	45	2n=48(8m+22sm+12st+6a)	Pazza et al., 2008.
			46	2n=46(12m+20sm+10st+4a)	
			47	2n=45, 2n=46 variante e	
			48	quatro citótipos de 2n=47	
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Mogi-Guaçu – Ouro Fino (MG)	Paraná	46	2n=46(12m+20sm+10st+4a)	Pazza et al., 2008.
			48	2n=48(8m+22sm+12st+6a)	

Espécie	Localidade	Sistema Hidrográfico	2n	Fórmula Cromossômica	Referência
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Pardo (SP)	Paraná	46 48	2n=46(12m+20sm+10st+4a) 2n=48(8m+22sm+12st+6a)	Pazza et al., 2008.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Grande – Represa de Furnas (MG)	Paraná	48	8m+20sm+16st+4a	Peres et al., 2009.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Córrego Minhoca – Rio Piumhi (MG)	São Francisco	48	8m+20sm+16st+4a	Peres et al., 2009.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio São Francisco – Foz Rio Piumhi (MG)	São Francisco	48	8m+20sm+16st+4a	Peres et al., 2009.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Paiol Grande	Paraná	48	8m+22sm+12st+6a	Centofante et al., 2003.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Sapucaí– Represa de Furnas (MG)	Paraná	48	8m+18sm+14st+8a	Swerts et al., 1998.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio de Contas (BA)	Médio Contas	48	8m+24sm+12st+4a	Medrado et al., 2008.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Preto do Costa (BA)	Médio Contas	48	8m+24sm+10st+6a	Medrado et al., 2008.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Ribeirão Mineiro (BA)	Recôncavo Sul	48	8m+18sm+16st+6a	Medrado et al., 2008.
<i>A.aff.fasciatus</i>	Rio Tibagi (PR)	Paraná	50	8m+18sm+14st+10a	Artoni et al., 2006.
<i>A.giton</i>	Córrego Jacuí e Rio Paraitinga – Cunha (SP)	Paraíba do Sul	50	6m+8sm+8st+28a	Kavalco; Moreira-Filho, 2003.
<i>A.hastatus</i>	Distrito Ipiranga (RJ)	Rios Costeiros	50	4m+8sm+10st+28a	Kavalco et al., 2009b.
<i>A.hastatus</i>	Santana do Japuiba (RJ)	Rios Costeiros	50	8m+24sm+12st+6a	Kavalco et al., 2009b.

Espécie	Localidade	Sistema Hidrográfico	2n	Fórmula Cromossômica	Referência
<i>A.hastatus</i>	Cachoeiras de Macau (RJ)	Rios Costeiros	50	6m+8sm+4st+32a	Kavalco et al., 2009b.
<i>A.intermedius</i>	Rio Paraitinga – Cunha (SP)	Paraíba do Sul	50	6m+8sm+4st+32a	Kavalco; Moreira-Filho, 2003.
<i>A.janeiroensis</i>	Castro e São Luíz do Purunã (PR)	Ribeira de Iguape	50	6m+14sm+14st+16a	Vicari et al., 2008.
<i>A.jacuhiensis</i>	Lago Guaíba (RS)	Rio Grande do Sul	50	8m+30sm+4st+8a	Pacheco et al., 2010.
<i>A.laticeps</i>	Rio Forquentina (RS)	Laguna dos Patos	50	6m+16sm+16st+12a	Rosa et al., 2009.
<i>A.mexicanus</i>	Piscicultura - México	América Central	50	8m+18sm+12st+12a	Kavalco; Almeida-Toledo, 2007.
<i>A.parahybae</i>	Rio Paraitinga – Cunha (SP)	Paraíba do Sul	48	8m+18sm+12st+10a	Kavalco; Moreira-Filho, 2003.
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Centenário – Maringá (PR)	Paranapanema	50	6m+20sm+8st+16a	Mantovani et al., 2000; Abel et al., 2006.
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Marrecas – Londrina (PR)	Paranapanema	48	8m+20sm+12st+10a	Mantovani et al., 2000; Abel et al., 2006.
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Viveiro de Mudas – Três Marias (MG)	São Francisco	50	6m+30sm+8st+6a	Abel et al., 2006.
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Curral das Éguas – São Gonçalo do Abaeté (MG)	São Francisco	46	6m+22sm+8st+14a	Abel et al., 2006.
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego dos Macacos – Cunha (SP)	Paraíba do Sul	50	8m+20sm+8st+14a	Kavalco; Moreira-Filho, 2003.

3. CAPÍTULO 1

Análise citogenética de duas espécies simpátricas de *Astyanax*
(Characiformes, Characidae) da bacia do rio de Contas, nordeste do Brasil.

* Este artigo será submetido à publicação na revista Journal of Genetics.

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *Astyanax* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DA BACIA DO RIO DE CONTAS, NORDESTE DO BRASIL.

Aline Souza Medrado¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA.

Autor para correspondência: A. S. Medrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Dep. Ciências Biológicas. Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-000, Ilhéus, BA, Brasil. Tel: 55 73 36805431, email: alinesmedrado@yahoo.com.br

Abstract

Cytogenetic studies in *Astyanax*, one of the most species-rich genera from order Characiformes, have been revealing a wide intra and interspecific diversity, with characterization of species complexes. The present work reports new data about the karyotypic structure of two *Astyanax* species collected in sympatry and syntopy in a small tributary from Middle Contas river basin, Bahia, northeastern Brazil: *Astyanax* sp. and *Astyanax* aff. *fasciatus*. A diploid number of 48 chromosomes was found in both species but the karyotype formula observed in *Astyanax* sp. was equal to 10m+18sm+8st+12a (FN=84) while *Astyanax* aff. *fasciatus* presented 8m+28sm+8st+4a (FN=92). Small heterochromatic blocks were detected in pericentromeric regions of all chromosomes in both species. The analysis of nucleolar organizer regions showed a multiple NOR system comprising four chromosomes with subtle differences between the species. Base-specific fluorochrome staining revealed terminal CMA₃⁺/DAPI signals in eight chromosomes of *Astyanax* sp. and in five chromosomes in *A. aff. fasciatus*, mostly coincident to NORs. The establishment of the analyzed species as independent evolutionary units might have been favored by historic events related to the origin and evolution of the sampled microbasin, including putative periods of geographic separation and headwaters capture. The results from the present work reinforce the remarkable chromosomal diversity in *Astyanax*, characterized by non-conserved and highly differentiated karyotypes among populations/species from other Brazilian basins.

Key-words: basins of the eastern Atlantic, cytotaxonomy, Ag-NOR, fluorochromes, fish.

Resumo

Estudos citogenéticos no gênero *Astyanax*, um dos mais especiosos da ordem Characiformes, têm revelado uma grande diversidade intra e interespecífica, com caracterização de complexos de espécies. O presente trabalho revela novos dados sobre a estrutura cariotípica de duas espécies de *Astyanax* coletadas em simpatria e sintopia em um tributário da bacia do médio rio de Contas, Bahia, nordeste do Brasil: *Astyanax* sp. e *Astyanax* aff. *fasciatus*. Um número diplóide de 48 cromossomos foi encontrado para ambas as espécies, mas a fórmula cariotípica observada em *Astyanax* sp. foi de 10m+18sm+8st+12a (FN=84) enquanto *Astyanax* aff. *fasciatus* apresentou 8m+28sm+8st+4a (NF=92). Pequenos blocos heterocromáticos foram detectados nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos nas duas espécies estudadas. A análise da região organizadora de nucléolos evidenciou um sistema de RONS múltiplas envolvendo quatro cromossomos com diferenças sutis entre as espécies. A coloração com fluorocromos base-específicos revelou marcações terminais CMA₃⁺/DAPI em oito cromossomos de *Astyanax* sp. e cinco cromossomos em *A. aff. fasciatus*, muitas das quais coincidentes com as RONS. O estabelecimento das espécies analisadas como unidades evolutivas independentes pode ter sido favorecido por eventos históricos da origem da microbacia estudada com possíveis períodos de separação geográfica e captura de cabeceiras. Os resultados do presente trabalho reforçam a grande diversidade cromossômica em *Astyanax*, com cariótipos não conservados e altamente diferenciados entre as populações/espécies de outras bacias do Brasil.

Palavras-chave: bacias do Atlântico Leste, citotaxonomia, Ag-RON, fluorocromos, peixes.

Introdução

A bacia do rio de Contas, inteiramente localizada no estado da Bahia, apresenta uma ictiofauna diversificada e composta por várias espécies de pequeno a médio porte, muitas endêmicas e com importância econômica local. Dentre as espécies ocorrentes nessa bacia, as da família Characidae, representam o maior número (Severi et al., 2010).

De fato, as drenagens costeiras do leste do Brasil representam uma importante região de interesse biogeográfico devido ao seu elevado nível de endemismo (Jacobina et al., 2009), já que possui uma longa história evolutiva independente de suas bacias componentes. De

acordo com informações disponíveis sobre a biota aquática destas áreas, observa-se um grande número de espécies de peixes não descritas, revelando assim, o insuficiente conhecimento acerca desse ecossistema (Cetra et al., 2010).

Zanata e Camelier (2010) consideram que a maior parte da ictiofauna de cabeceiras de riachos ainda esteja por ser descrita na região neotropical. Neste estudo, as autoras descrevem uma nova espécie de caracídeo, *Hyphessobrycon brumado* em afluentes do alto rio de Contas, Bahia, Brasil. O estudo dos peixes de cabeceira é interessante a partir de um ponto de vista evolutivo, devido a ocorrência de isolados populacionais das espécies que habitam esses nichos ecológicos (Kavalco; Moreira-Filho, 2003). Esses ambientes são característicos dos pequenos caracídeos como os *Astyanax*.

O gênero *Astyanax* (Characidae, *Incertae sedis*) é um dos mais especiosos da ordem Characiformes, com cerca de 100 espécies distribuídas por praticamente toda a região Neotropical (Garutti; Britski, 2000; Lima et al., 2003; Pazza; Kavalco, 2007). No entanto, esse número é subestimado, uma vez que novas espécies vêm sendo descritas anualmente, especialmente em pequenos rios e córregos de diversos sistemas hidrográficos sul-americanos (Castro; Vari, 2004; Lima; Zauanon, 2004; Bertaco; Lucinda, 2005; Haluch; Abilhoa, 2005; Bertaco; Lucena, 2006; Bertaco; Garutti, 2007; Vari; Castro, 2007; Garutti; Venere, 2009; Zanata; Camelier, 2009; Marinho; Lima, 2009).

Em geral, as espécies de *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação têm sido historicamente difícil (Melo, 2001). Portanto, trabalhos de revisão de espécies já descritas são importantes para elucidar possíveis redundâncias, contribuindo para o entendimento da história evolutiva do grupo (Garutti; Langeani, 2009; Bertaco; Lucena, 2010).

Baseados em características cromossômicas e morfológicas, são reconhecidos atualmente, pelo menos, três complexos de espécies para o gênero: *Astyanax fasciatus*, *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax altiparanae*, (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; Fernandes; Martins-Santos, 2005; Pazza et al., 2006; Pazza; Kavalco, 2007; Medrado et al., 2008).

Os números cromossômicos desses pequenos caracídeos variam de $2n=36$ em *Astyanax schubarti* (Morelli et al., 1983; Daniel-Silva; Almeida- Toledo, 2001, 2005) a $2n=50$

em *Astyanax scabripinis*, *A. bockmani*, *A. altiparanae* e *A. fasciatus* (Oliveira et al., 1988; Souza; Moreira-Filho, 1995; Artoni et al., 2006; Kavalco et al., 2009; Ferreira Neto et al., 2009), polimorfismos relacionados aos padrões de distribuição da heterocromatina (Mantovani et al., 2000; Kavalco et al., 2007; Pazza et al., 2008; Hashimoto et al., 2008) e quantidade e posição das regiões organizadoras de nucléolo (Kavalco; Moreira-Filho, 2003; Mantovani et al., 2000; Pazza; Kavalco, 2007; Medrado et al., 2008; Torres-Mariano; Morelli, 2008). Destaca-se ainda, a ocorrência de triploidias naturais (Fauaz; Moreira-Filho, 1994; Malacrida et al., 2003) e a presença de cromossomos Bs (Maistro et al., 1992; Mestriner et al., 2000; Néó et al., 2000a; Néó et al., 2000b; Moreira-Filho et al., 2004; Fernandes; Martins-Santos, 2005).

Apesar do potencial citotaxonômico das análises cromossômicas em *Astyanax*, são poucos os estudos genéticos que procuram caracterizar as muitas espécies e populações do gênero na região nordeste do Brasil (Medrado et al., 2008). Assim, este trabalho traz novos dados sobre a estrutura cariotípica de duas espécies do gênero *Astyanax* na bacia do rio de Contas, importante sistema hidrográfico da Bahia, nordeste brasileiro e, constantemente ameaçado pela introdução de espécies alóctones e exóticas, represamento e poluição.

Material e métodos

Foram analisados 18 espécimes de *Astyanax* sp. (12 fêmeas, 4 machos, 2 imaturos) e 26 indivíduos de *Astyanax* aff. *fasciatus* (10 fêmeas, 14 machos e 2 imaturos), todos coletados em simpatria e sintopia no rio Preto do Crisciúma, afluente da bacia do Rio de Contas-BA, Brasil, entre as coordenadas 13°47'46"S e 39°50'44"W (Figura 1).

Após estimulação mitótica (Lee; Elder, 1980; Molina, 2001), os cromossomos metafásicos foram obtidos de células do rim anterior segundo a metodologia proposta por Bertollo et al. (1978). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram localizadas através da impregnação por nitrato de prata, conforme Howell e Black (1980). O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado a partir do bandamento C, seguindo a técnica de Summer (1972). Os sítios cromossômicos ricos em pares de bases GC e AT foram analisados com os fluorocromos base-específicos, cromomicina A₃ e DAPI, respectivamente

(Schmid, 1980). A morfologia cromossômica foi determinada segundo a relação de braços proposta por Levan et al. (1964) e arranjados em ordem decrescente de tamanho no cariótipo. O número fundamental foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico.

Resultados

Astyanax sp. e *Astyanax* aff. *fasciatus* apresentaram um número $2n=48$, independentemente do sexo (figura 2). Apesar do número diplóide se manter constante nas duas espécies, foi possível observar diferenças na morfologia cromossômica. Os espécimes de *Astyanax* sp. apresentaram 10 cromossomos metacêntricos, 18 submetacêntricos, 08 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos com número fundamental (NF) igual a 84 (figura 2a), enquanto *Astyanax* aff. *fasciatus* apresentou 08 metacêntricos, 28 submetacêntricos, 08 subtelocêntricos e 04 acrocêntricos e NF igual a 92 (figura 2b).

Outra característica que permitiu diferenciar citogeneticamente as espécies analisadas é a grande diferença de tamanho entre o maior par submetacêntrico e o maior par subtelocêntrico em relação aos demais dentro de cada categoria morfológica, observada apenas em *A. aff. fasciatus*.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) reveladas pelo nitrato de prata mostraram-se múltiplas para as amostras analisadas. Os indivíduos de *Astyanax* sp. apresentaram quatro marcações, incluindo três cromossomos subtelocêntricos, sendo dois marcados no braço curto e um no braço longo, e um cromossomo acrocêntrico marcado na região terminal do braço longo (figura 2a - detalhe). Em *Astyanax* aff. *fasciatus* também foram observado quatro cromossomos marcados pela prata, incluindo um par de cromossomos submetacêntricos com sítio ribossômico na região terminal do braço curto, o braço longo de um cromossomo subtelocêntrico e um acrocêntrico com marcação terminal (figura 2b - detalhe).

Pequenos blocos heterocromáticos foram detectados nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos nas duas espécies estudadas. Em *Astyanax* aff. *fasciatus* foi observado

também um bloco conspícuo no braço longo de um acrocêntrico grande (par 23) e um bloco bem menor no braço longo de um acrocêntrico pequeno (par 24), ambos em posição terminal (Figura 3).

A coloração com fluorocromos base-específicos revelou sítios ricos em GC (CMA₃⁺ e DAPI) diferenciados entre as duas espécies de *Astyanax*. *Astyanax* sp. revelou oito marcações CMA₃⁺/DAPI, envolvendo a porção terminal dos braços curtos de dois metacêntricos não homólogos e de cinco subtelocêntricos e na região terminal de um acrocêntrico. Já em *A. aff. fasciatus*, essas marcações foram observadas na região terminal de cinco cromossomos, sendo um metacêntrico grande no braço curto, um par submetacêntrico no braço curto e um par subtelocêntrico no braço longo (Figura 4).

Discussão

Com relação à ictiofauna neotropical, o gênero *Astyanax* constitui um dos grupos mais documentados do ponto de vista citogenético, possuindo uma marcante diversidade cariotípica (Pazza; Kavalco, 2007). A grande diversidade que ocorre no grupo é também compartilhada com outros grupos de Characiformes que se caracterizam por ampla distribuição, como os peixes do gênero *Hoplias* e *Erythrinus*, ambos da família Erythrinidae (Bertollo et al., 2000; Bertollo et al., 2004).

Além das semelhanças morfológicas externas e de nicho, as espécies analisadas nesse trabalho apresentaram 2n=48 e cariótipo assimétrico, composto predominantemente por cromossomos com dois braços. Em *A. scabripinnis*, por exemplo, a proporção de cromossomos de dois braços pode variar entre 28% (Rocon-Stange; Almeida-Toledo, 1993) e 96% em algumas populações de *A. fasciatus* (Morelli et al., 1983).

Possivelmente, o cariótipo ancestral de *Astyanax* tenha sido constituído por 50 cromossomos. Contrastando dados cariotípicos com análises filogenéticas de diferentes espécies/populações do gênero, Pazza e Kavalco (2007) revelaram o caráter plesiomórfico desse valor diplóide. Tal plesiomorfia é ainda fortemente apoiada pela presença de 2n=50 em outros gêneros de Characidae (Portela et al., 1988). Desta forma, *Astyanax aff. fasciatus* e *Astyanax* sp. parecem compor um grupo derivado dentro da família, onde o número diplóide

de 48 cromossomos provavelmente foi estabelecido por rearranjos do tipo fusões cromossômicas, reduzindo o $2n$ ancestral.

As amostras analisadas também compartilham o primeiro par metacêntrico de tamanho pronunciado em relação ao restante do complemento. Essa característica é encontrada entre a maioria dos pequenos caracídeos já estudados, sendo assim considerado um traço simplesiomórfico (Scheel, 1973; Morelli et al., 1983; Portela et al., 1988; Daniel-Silva; Almeida-Toledo, 2001; 2005).

Contudo, vale salientar que o tamanho do primeiro par de cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos em *Astyanax* aff. *fasciatus* diferiu daquele observado em *Astyanax* sp., onde o primeiro seguiu o mesmo observado por Pazza et al. (2006) em populações de *A. fasciatus* do sudeste do Brasil com cariomorfo $2n=48$. De fato, além dessa divergência cariotípica em relação ao grupo “*fasciatus*” (popularmente conhecidos como lambaris de cauda vermelha), os indivíduos de *Astyanax* sp. podiam ser levemente diferenciados logo após a coleta em campo por apresentarem nadadeiras amareladas e faixa longitudinal menos evidente.

Ainda, diferenças na fórmula cromossômica associadas com números diplóides constantes, como observadas nas espécies aqui analisadas, indicam que inversões pericêntricas parecem ter desempenhado um papel importante na evolução cromossômica (Cestari; Galetti Jr., 1992). Vale salientar que formas intermediárias ou variantes não foram encontradas, conforme esperado para indivíduos da mesma espécie e já descrito em populações de *A. fasciatus* de outras bacias (Pazza et al., 2006; Peres et al., 2009). Para confirmar tal suposição, análises morfológicas e merísticas detalhadas são ainda necessárias para avaliar o grau de divergência fenotípica entre as amostras analisadas.

Além das características macroestruturais, o número e a localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) auxiliam na diferenciação de gêneros, espécies ou populações de vários grupos de peixes neotropicais. Por exemplo, o mapeamento das RONs permitiu distinguir varias espécies do gênero *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae), apesar do acentuado conservacionismo do número diplóide e fórmula cariotípica na família (Galetti Jr. et al., 1984). Similarmente, a distribuição dos sítios ativos de DNA ribossômico

em peixes da família Parodontidae foi um dos caracteres que auxiliou na identificação de uma nova espécie (Jesus; Moreira-Filho, 2000).

Neste estudo, um sistema de RONS múltiplas foi encontrado em todos os indivíduos, com até quatro cromossomos marcados pelo nitrato de prata. Padrões similares são comumente descritos para *Astyanax*, incluindo outras populações de *A. fasciatus* (Medrado et al., 2008) e de *A. sp. aff. bimaculatus* (Pamponet et al., 2008) da bacia do rio de Contas, revelando uma evolução dinâmica dos cístrons ribossômicos no gênero. Apesar da semelhança no número de RONS nas amostras estudadas, novamente as espécies foram diferenciadas em relação aos pares portadores de DNAr.

Seguindo a tendência de várias espécies de *Astyanax*, como *A. giton*, *A. intermedius* (Kavalco et al., 2007), *A. mexicanus* (Kavalco; Almeida-Toledo, 2007) e *A. jacuhiensis* (Pacheco et al., 2010), a heterocromatina constitutiva nas amostras de *Astyanax* do rio Preto do Crisciúma foi restrita às regiões pericentroméricas. Apesar da importância do bandamento C para o entendimento da evolução cromossômica em peixes (Jacobina et al., 2009), esse é o primeiro registro da distribuição da heterocromatina em *Astyanax* de bacias costeiras do nordeste do Brasil e poderá servir de base para futuros estudos comparativos.

Nesse sentido, análises prévias usando bandamento C em algumas populações e espécies de *Astyanax* realizadas por Pazza e Kavalco (2007) indicaram que aquelas oriundas de bacias hidrográficas do Atlântico Leste tendem a apresentar pouca quantidade de heterocromatina localizada próxima aos centrômeros e RONS. Os dados deste estudo corroboram a escassez de segmentos heterocromáticos nas bacias costeiras do nordeste, ampliando assim a extensão desse padrão de bandas C além do sudeste do Brasil. Por outro lado, é possível observar grande quantidade de heterocromatina terminal em algumas populações/espécies de *Astyanax* localizadas em cabeceiras de rios em bacias mais ao sul da distribuição do gênero (Pazza et al., 2008), podendo inclusive resultar em polimorfismos inter e intraindividuais (Mantovani et al., 2000). Porém, praticamente todas elas ainda mantêm pequenas bandas nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, além das relacionadas às RONS, assim como ocorre em *A. parahybae* (Centofante et al., 2003) e *A. laticeps* (Rosa et al., 2009).

O tratamento com fluorocromos base-específicos nas preparações cromossômicas das espécies estudadas mostrou sinais CMA₃⁺ e DAPI coincidentes com alguns sítios de RONS marcados pela prata, sendo: *Astyanax* sp. apresentou um cromossomo subtelocêntrico marcado no braço curto e um cromossomo acrocêntrico marcado na região terminal do braço longo e *Astyanax fasciatus* apresentou uma par de cromossomos submetacêntricos marcados no braço curto, evidenciando também certo heteromorfismo de tamanho entre os homólogos. A correspondência entre regiões organizadoras de nucléolos e blocos ricos em GC é frequentemente relatada em peixes, embora os fluorocromos GC-específicos não possam ser considerados um método para a determinação direta dos genes ribossomais (Artoni et al., 1999).

Desse modo, o uso de fluorocromos não se restringe apenas na identificação das RONS e, muitas vezes, podem ser empregados na caracterização e diferenciação de regiões heterocromáticas. Um bom exemplo consiste na identificação de dois tipos de heterocromatina constitutiva através do uso conjunto de mitramicina, cromomicina A₃, distamicina e DAPI em duas populações de *Astyanax scabripinnis* por Mantovani et al. (2004) que permitiram os autores traçarem uma hipótese sobre a possível origem dos blocos heterocromáticos distais presentes em alguns cromossomos. Neste trabalho, a localização dos sítios ricos em GC evidenciou uma marcante diferenciação entre as amostras estudadas, reforçando a separação evolutiva entre elas com o estabelecimento de padrões de distribuição espécie-específicos. Adicionalmente, a identificação de sinais fluorescentes em heterozigose constitui outra peculiaridade do grupo e parece refletir diferenças quantitativas das bases ricas em GC entre homólogos com ausência ou pouca quantidade dessas repetições em um dos cromossomos do par (Kavalco et al., 2007).

Acredita-se que a variabilidade cariotípica encontrada em *Astyanax* em relação a outros grupos de peixes neotropicais parece estar relacionada às próprias características biológicas do gênero. O isolamento populacional em pequenos riachos da maioria das espécies já descritas favorece a fixação de diferenças interpopulacionais, o que apóia a proposição de complexos de espécies (Moreira-Filho; Bertollo, 1991). Já o fato de formarem populações pequenas, usualmente restritas à cabeceiras de córregos e rios de pequeno porte (Britski, 1972) facilitaria os efeitos de eventos de deriva, ocasionando os polimorfismos intraespecíficos. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram essa observação, revelando

diferenças cromossômicas nas espécies estudadas, as quais foram encontradas próximas às cabeceiras da micro-bacia dos rios Crisciúma-Guariba, uma pequena área do médio rio de Contas entrecortada por pequenos córregos em trecho de Mata Atlântica, ainda relativamente preservados.

As análises realizadas nesse trabalho reúnem dados citogenéticos inéditos e revelam unidades evolutivas únicas para o gênero *Astyanax* da bacia hidrográfica do rio de Contas, a qual faz parte do sistema de bacias costeiras e isoladas da Bahia, ainda pouco estudadas e constantemente ameaçadas pela exploração desordenada. São mostrados também os primeiros resultados de coloração com fluorocromos base-específicos em populações de *Astyanax* do nordeste do Brasil, contribuindo para o entendimento da história evolutiva do gênero em bacias hidrográficas do nordeste do Brasil.

Agradecimentos

A autora agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, Universidade Estadual de Santa Cruz e Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

ARTONI, R.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 1-6, 1999.

BERTACO, V. A.; LUCINDA, P. H. F. *Astyanax elachylepis*, a new characidae fish from the rio Tocantins drainage, Brazil (Teleostei, Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 389-394, 2005.

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

BERTACO, V. A.; GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.5, p. 25-30, 2007.

- BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.8, p. 7-20, 2010.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal Genetic**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BERTOLLO, L. A. C.; BORN, G. G.; DERGAN, J. A.; FENOCHIO, A. S.; MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, p. 603-613, 2000.
- BERTOLLO, L. A. C.; OLIVEIRA, C.; MOLINA, W. F.; MARGARIDO, V. P.; FONTES, M. S.; PASTORI, M. C.; FALCÃO, J. N.; FENOCCHIO, A. S. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity**, v. 93, p. 228–233, 2004.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**, p.79-108. Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C. P. R. N. da Secretaria de Agricultura. São Paulo, 1972.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. *Astyanax biotae*, a new species of stream fish from the rio Paranapanema basin, upper Rio Paraná system, southeastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes:Characidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 117: 330-338, 2004.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; JUSTI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 14, p. 361-368, 2003.
- CESTARI, M. M.; GALETTI JR., P. M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from de Paraná-Paraguai rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, v. 1, p. 108-112, 1992.
- CETRA, M.; SARMENTO-SOARES, L. M.; MARTINS-PINHEIRO, R. F. Peixes de riachos e novas Unidades de Conservação no sul da Bahia. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, p. 11-21, 2010.
- DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, p. 209-215, 2001.
- DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 497-501, 2005.

- FAUAZ, G; Vicente, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal Genetics**, v. 17, p. 157-163, 1994.
- FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B-chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**, v. 124, p. 301-306, 2005.
- FERREIRA NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F. and MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 792-796, 2009.
- GALETTI, JR, P. M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. **Caryologia**, v. 37 (4), p. 401-406, 1984.
- GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia**, v. 13, p. 65-88, 2000.
- GARUTTI, V.; LANGEANI, F. Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 7(3), p. 371-376, 2009.
- GARUTTI, V.; VENERE, P. C. *Astyanax xavante*, a new species of characid from middle rio Araguaia in the Cerrado region, Central Brazil (Characiformes, Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 7(3), p. 377-383, 2009.
- HALUCH, C. F.; ABILHOA, V. *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei, Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 383-388, 2005.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions a protective colloidal developer a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- JACOBINA, U. P.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S.; DERGAM, J. A. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7(4), p. 617-622, 2009.
- JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 11(1), p. 75-80, 2000.

- KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Parafba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56 (4), p. 453-461, 2003.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 329-335, 2007.
- KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Molecular cytogenetics of blind Mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 4(2), p. 103-111, 2007.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, v. p. 136:135–139, 2009.
- LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 52, p. 36-40, 1980.
- LEVAN, A.; FREDGA, K and SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.
- LIMA, F.T.C.; MALABRABA, L. R.; BUCKP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and America**. Reis, R. E; Kullander, S.O; Ferraris, Jr. C. J. (eds). EDIPCURS: Porto Alegre- RS, Brazil, p. 729, 2003.
- LIMA, F. T. C.; ZAUANON, J. A new species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the rapids of the lower rio Xingu, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, p. 117-122, 2004.
- MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae) **Genetica**, v. 87, p. 101-106, 1992.
- MALACRIDA, A. C. P.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. Natural triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi River bay- PR **Cytologia**, v. 68, p. 267-270, 2003.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two

populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27(4), p. 536-542, 2004.

MARINHO, M. M. F.; LIMA, F. C. T. *Astyanax ajuricaba*: a new species from the Amazon basin in Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 7(2), p. 169-174, 2009.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 208-214, 2008.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MESTRINER, C. A.; GALETTI Jr., P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

MOLINA, W. F. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. **Chromosome Science**, v. 5, p. 149-152, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14(2), p. 331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR, P. M.; BERTOLLO, L.A.C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 230-234, 2004.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O TOLEDO-FILHO, A. S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36 (3), p. 235-244, 1983.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) **Genetica**, v. 108, p. 211-215, 2000a.

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p. 136-141, 2000b.

OLIVEIRA, C., L. F.; ALMEIDA-TOLEDO, F.; FORESTI, H. A.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A.. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 577-624, 1988.

PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; HORÁCIO, F. J. Jr.; DIAS, A. L. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8(3), p. 667-671, 2010.

PAMPONET, V. C. C.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; MIRANDA, V. S.; SILVA JUNIOR, J. C.; OLIVEIRA, C. G.; GAIOTTO, F. A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6 (4), p. 621-630, 2008.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, p. 313-319, 2006.

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

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2. Gene mapping satellite DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 61-66, 2008.

PERES, W. A. M.; BUCKUP, P. A.; KANTEK, D. L. Z.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, v. 137, p. 305-311, 2009.

PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 307-313, 1988.

ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supranumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 601-615, 1993.

ROSA, R.; RUBERT, M.; MALABARBA, L. R.; MARTINS-SANTOS, I. C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, v. 7 (4), p. 601-605, 2009.

SEVERI, W.; EL-DEIR, A. C. A.; FELIX, R. T. S.; ARAÚJO, I. M. S.; LUZ, S. C. S.; CALADO NETO, A. V.; COSTA, B. D. F.; CHAGAS, R. J.; BARRETTO, M. G. Composição e abundância da ictiofauna na área de influência dos reservatórios da Pedra e Funil, Bacia do Rio de Contas, Bahia. In: Moura, A. N.; Araújo, S. E. L.; Bittencourt-Oliveira, M. C.; Pimentel, R. M. M.; Albuquerque, U. P. Reservatórios do Nordeste do Brasil: Biodiversidade, ecologia e manejo. Bauru. **NUPPEA**: p. 541-572, 2010.

SCHEEL, J. J. Fish chromosomes and their evolution. **Internal Report of Danmarks Akvarium**. Charlottenlund (Denmark). p. 22, 1973.

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

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

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper Rio Paraná System, Brazil. **Copeia**, v. 2007(1), p. 150-162, 2007.

ZANATA, A. M.; CAMELIER, P. *Astyanax vermillion* and *Astyanax burgerai*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7 (2), p. 175-184, 2009.

ZANATA, A. M.; CAMELIER, P. *Hyphessobrycon brumado*: a new characid fish (Ostariophysi: Characiformes) from the upper rio de Contas drainage, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.8 (4), p. 771-777, 2010.

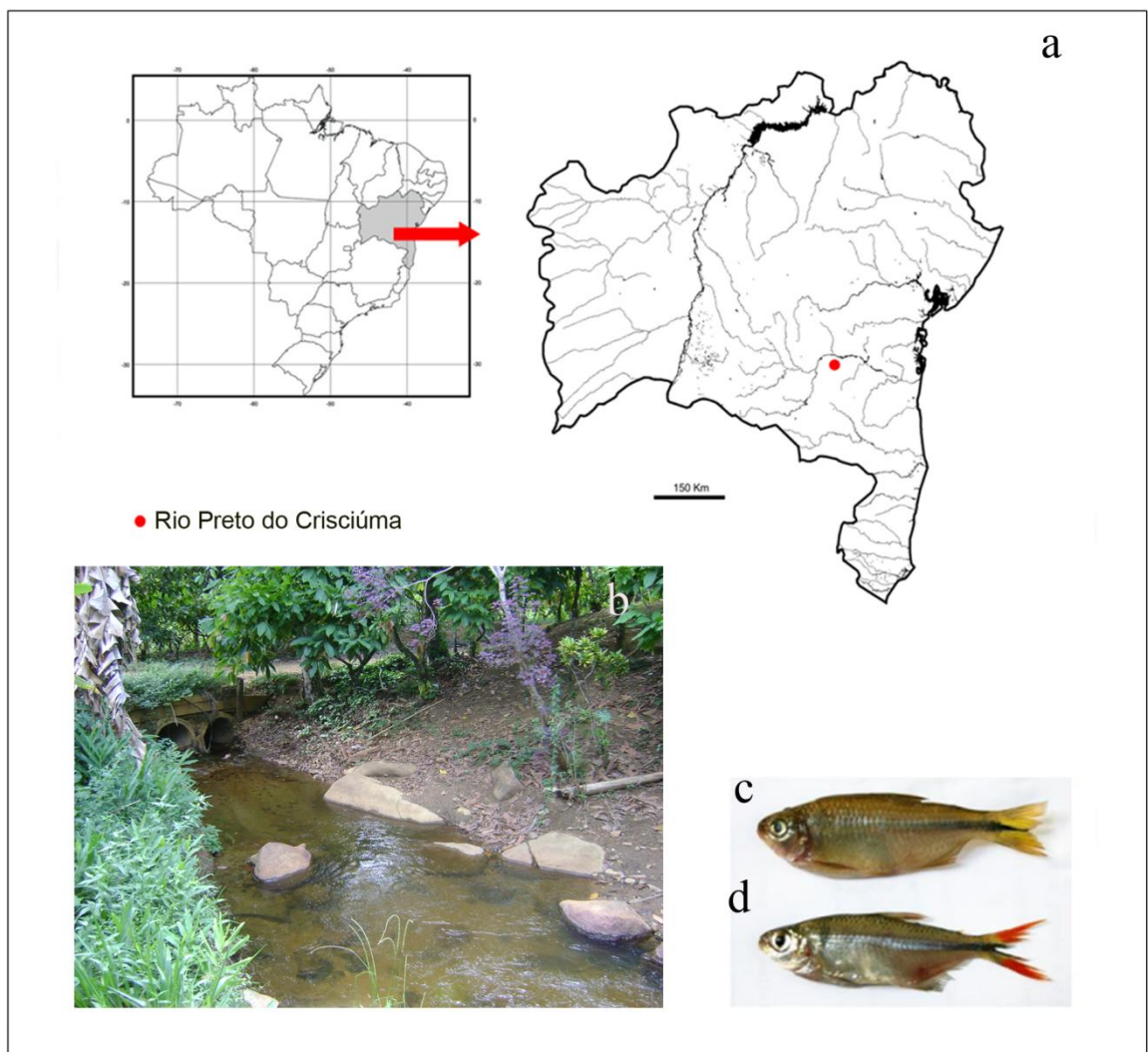


Figura 1- Mapa da área de estudo no estado da Bahia, mostrando o rio Preto do Crisciúma, microbacia Guariba-Crisciúma, afluente da bacia hidrográfica do rio de Contas, nordeste do Brasil (a). Vista parcial mostrando o rio Preto do Crisciúma (b). Exemplar de *Astyanax* sp. (c) e *Astyanax* aff. *fasciatus* (d).

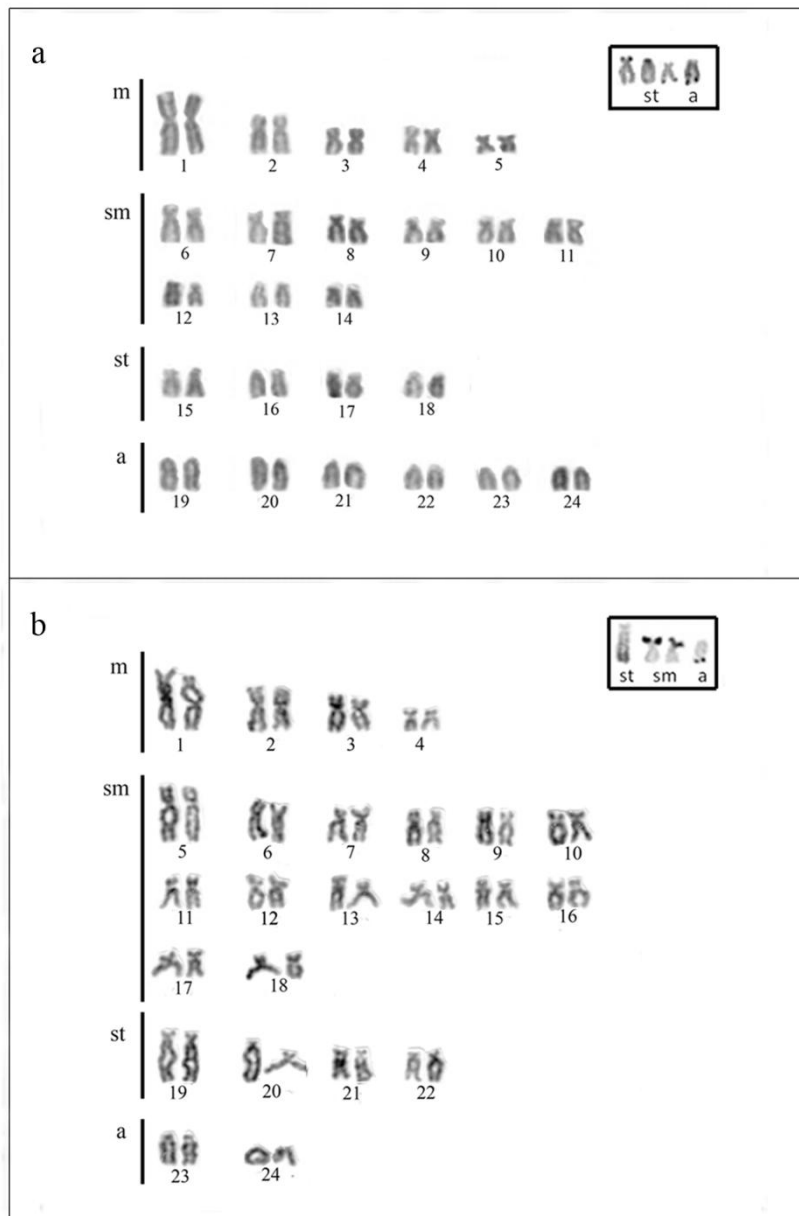


Figura 2- Cariótipos de *Atyanax* sp. (a) e *Astyanax* aff. *fasciatus* (b) do rio Preto do Crisciúma com $2n=48$ cromossomos corados com Giemsa. No detalhe, cromossomos portadores das Ag-RONs.

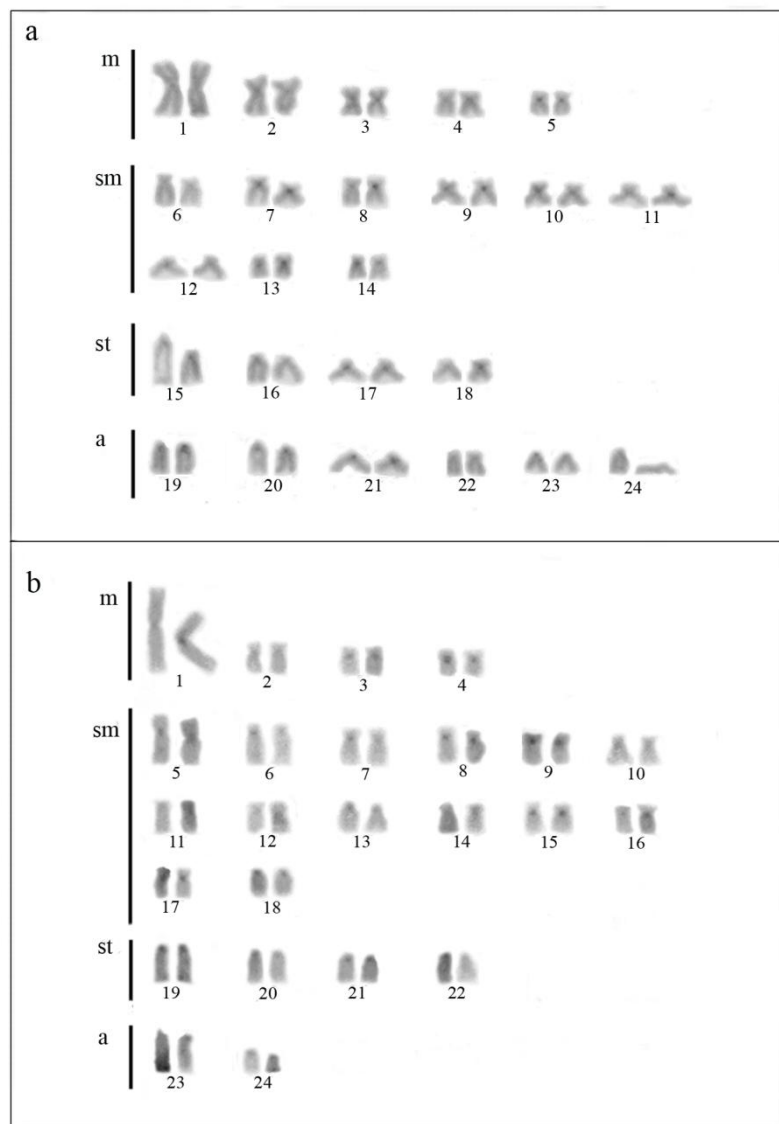


Figura 3- Cariótipos após bandamento C de *Astyanax* sp. (a) e *Astyanax* aff. *fasciatus* (b) do rio Preto do Crisciúma.

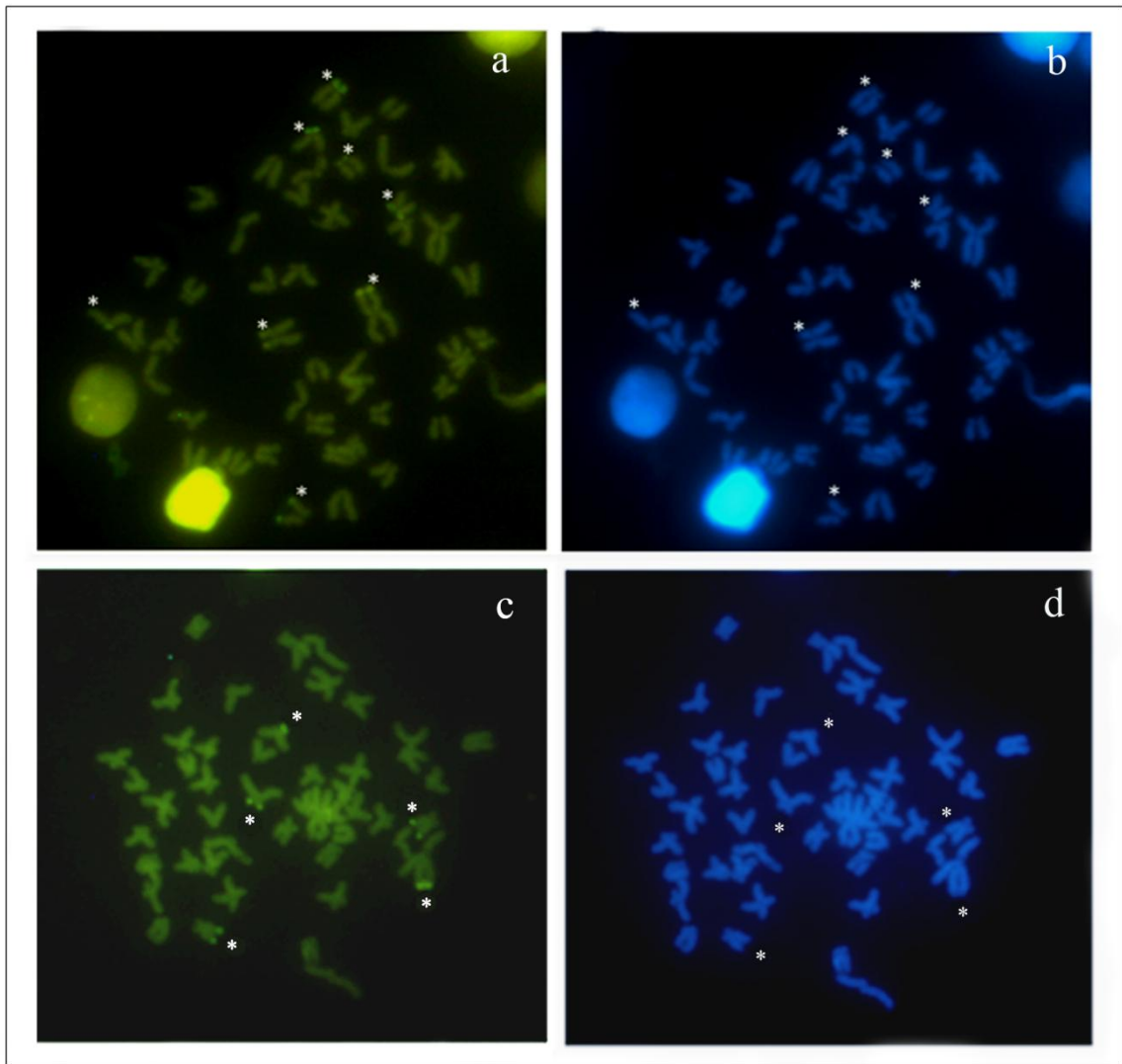


Figura 4- Metáfases de *Astyanax* sp. (a, b) e *Astyanax* aff. *fasciatus* (c, d) do rio Preto do Crisciúma após coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI. Os asteriscos indicam os cromossomos portadores de sinais CMA₃ positivos (a,c) e DAPI negativos (b,d)

4. CAPÍTULO 2

Divergência alopátrica baseada em marcadores cromossômicos em *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characiformes, Characidae) de bacias costeiras do nordeste do Brasil.

* Este artigo será submetido à publicação na revista Genetica.

DIVERGÊNCIA ALOPÁTRICA BASEADA EM MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM *Astyanax* aff. *fasciatus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DE BACIAS COSTEIRAS DO NORDESTE DO BRASIL.

Aline Souza Medrado¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA.

Autor para correspondência: A. S. Medrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Dep. Ciências Biológicas. Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-000, Ilhéus, BA, Brasil. Tel: 55 73 36805431, email: alinesmedrado@yahoo.com.br

Abstract

The genus *Astyanax* comprises a hundred species of small characins inhabiting headwaters and streams, being abundant in Brazilian hydrographic basins. Karyotype analyses in this group have demonstrated a remarkable intra and interpopulation diversity in several species of different tributaries. In the present work, four populations of *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characidae, *Incertae sedis*) from coastal basins in northeastern Brazil, Bahia state, were cytogenetically analyzed. All populations shared the same diploid number of 48 chromosomes but exclusive karyotype formulae were observed in each locality, as follows: 8m+24sm+12st+4a (FN=92) in main channel of Contas river, 8m+22sm+10st+8a (FN=88) in Preto do Costa river, 8m+18sm+12st+10a (FN=86) in Mutum river and 8m+18sm+16st+6a (FN=90) in Mineiro stream. The silver stained nucleolar organizer regions (Ag-NORs) were multiple with intra and interindividual variability in the number of marks, totalizing up to five NOR-bearing chromosomes. The base-specific fluorochrome staining revealed interpopulation differences in position, chromosomal type and number of chromosomes bearing positive CMA₃ and negative DAPI signals, being mostly coincident to NORs. The chromosomal diversity observed in the studied samples of *A.* aff. *fasciatus* from coastal rivers in Bahia might be related to their geographic isolation in headwaters of small streams, where restrictions of gene flow and particular selective pressures of each environment, combined to the evolutionary history of the basin itself, would facilitate the fixation of distinct karyotypic forms. Therefore, it is plausible that the karyomorphs analyzed in the present work actually represent independent evolutionary units, characterizing a species complex in which

pericentric inversions and microstructural rearrangements might have played a major role in the diversification of the group.

Key-words: Eastern basins, *Astyanax* aff. *fasciatus*, cytotaxonomy, Ag-NOR, fluorochromes.

Resumo

O gênero *Astyanax* integra uma centena de espécies de pequenos caracídeos conhecidos como lambaris ou piabas, habitantes de cabeceiras de rios e riachos, sendo abundantes nas bacias hidrográficas brasileiras. As análises cariotípicas no grupo têm demonstrado uma grande diversidade intra e interpopulacional em diversas espécies de diferentes tributários. Neste trabalho, foram analisadas citogeneticamente quatro populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characidae, *Incertae sedis*) ao longo de bacias costeiras no estado da Bahia, nordeste do Brasil. Todas as populações compartilharam o mesmo número diplóide de 48 cromossomos, porém com fórmulas cariotípicas exclusivas para cada localidade, sendo: $8m+24sm+12st+4a$ (NF= 92) do canal principal do rio de Contas, $8m+22sm+10st+8a$ (NF= 88) do rio Preto do Costa, $8m+18sm+12st+10a$ (NF = 86) do rio Mutum e $8m+18sm+16st+6a$ (NF = 90) do ribeirão Mineiro. As regiões organizadoras de nucléolos impregnadas com nitrato de prata (Ag-RONs) evidenciaram múltiplos sítios, com variabilidade intra e interindividual no número de cromossomos marcados, totalizando até cinco marcações. A coloração com fluorocromos base-específicos evidenciou diferenças interpopulacionais nas marcações CMA₃ positivas e DAPI negativas, variando a posição, o tipo e o número de cromossomos, sendo as RONS evidenciadas pela prata CMA₃⁺. A diversidade cromossômica encontrada nas amostras de *A.* aff. *fasciatus* de rios costeiros da Bahia pode ser correlacionada ao grau de isolamento geográfico das populações em cabeceiras de pequenos riachos, onde restrições ao fluxo gênico e pressões seletivas particulares de cada ambiente, combinados a história evolutiva da própria bacia, facilitam a fixação de distintas formas cariotípicas. Assim, é possível que os cariomorfos analisados representem unidades evolutivas independentes, caracterizando complexos de espécies onde as inversões pericêntricas e rearranjos microestruturais teriam papel fundamental na diversificação do grupo.

Palavras-chave: bacias do Atlântico Leste, *Astyanax* aff. *fasciatus*, citotaxonomia, Ag-RON, fluorocromos.

Introdução

A família Characidae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de peixes de água doce da região neotropical, compreendendo 12 subfamílias (Nelson, 2006) e aproximadamente, 597 espécies (Buckup et al., 2007). Dentre elas, destacam-se as espécies do gênero *Astyanax*, integrando uma centena de espécies de pequeno porte e abundantes nas bacias hidrográficas brasileiras (Garutti; Britski, 2000; Lima et al., 2003; Pazza; Kavalco, 2007). Formalmente, este gênero era considerado como pertencente à subfamília Tetragonopterinae. Porém, devido à ausência de evidências para o monofiletismo dentro da família, ele passou a compor um grupo de pequenos Characidae com relações filogenéticas incertas (*Incertae sedis*) juntamente com os gêneros *Moenkhausia*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e *Bryconops* (Lima et al., 2003).

A citogenética representa uma ferramenta extremamente útil para caracterizar populações e diferenciar espécies do gênero *Astyanax*. Há numerosos exemplos entre os *Astyanax*, principalmente a partir dos grupos "*A. fasciatus*", "*A. scabripinnis*" e "*A. altiparanae*", em que as variações citogenéticas intraespecíficas ou interpopulacionais mostraram ser muito maiores do que a detectada por análises morfológicas, formando vários complexos de espécies (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; Artoni et al., 2006; Vicari et al., 2008b). Estes complexos são caracterizados por grande variação tanto numérica quanto estrutural a depender do grupo analisado.

As populações do grupo *Astyanax fasciatus*, conhecidas como lambari de cauda vermelha, apresentam a maior diversidade cariotípica já registrada para o gênero, incluindo três números diplóides padrão ($2n=46$, 48 e 50) com diferenças cariotípicas dentro de cada citótipo (Abel et al., 2006; Artoni et al., 2006; Pazza et al., 2006, 2008; Pazza; Kavalco, 2007; Medrado et al., 2008). Além da ocorrência das formas padrão, ocorrem ainda cariótipos variantes com números ímpares de cromossomos, tais como $2n=45$ e vários tipos com $2n=47$, coexistindo em simpatria e sintopia (Pazza et al., 2006). Já foi observado que essas formas cariotípicas exibem algum fluxo gênico com formação de híbridos, indicando a divergência incipiente do grupo (Pazza et al., 2007).

Enquanto as bacias do sudeste e sul do Brasil apresentam vasta informação citogenética sobre a ictiofauna, os estudos cariotípicos em peixes de rios costeiros da região

nordeste do Brasil são incipientes apesar do seu alto endemismo e constante ameaça pela degradação ambiental (Pamponet et al., 2008; Jacobina et al., 2009; Zanata; Camelier, 2010). No caso de *Astyanax*, dados cromossômicos estão restritos às análises básicas (coloração convencional e identificação das regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação com nitrato de prata - Ag-RON) em algumas populações de *A. aff. bimaculatus* (Pamponet et al., 2008) e *A. aff. fasciatus*, citado como *A. fasciatus* (Medrado et al., 2008), da bacia do rio de Contas e circunvizinhanças.

Com o intuito de fornecer dados citogenéticos complementares e refinar as análises cromossômicas já descritas para o grupo, análises cariotípicas comparativas foram realizadas em quatro populações de *Astyanax aff. fasciatus* em bacias costeiras do estado da Bahia, utilizando-se metodologias de coloração convencional, Ag-RONs e fluorocromos base-específicos.

Material e métodos

Os espécimes de *Astyanax aff. fasciatus* (Characiformes, Characidae) foram coletados em quatro rios costeiros da Bahia, nordeste do Brasil, distribuídos em duas bacias hidrográficas e perfazendo 137 indivíduos analisados (Tabela 2).

Após estimulação mitótica *in vivo* por 24-48h (Lee; Elder, 1980; Molina, 2001), os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior segundo a metodologia proposta por Bertollo et al. (1978). A coloração por nitrato de prata (Ag-RON) foi efetuada conforme Howell e Black (1980). Os sítios cromossômicos ricos em pares de bases GC e AT foram localizados com a coloração com os fluorocromos base-específicos, Cromomicina A₃ e DAPI, respectivamente (Schmid, 1980). A morfologia cromossômica foi determinada segundo a relação de braços proposta por Levan et al. (1964) e arranjados em ordem decrescente de tamanho no cariótipo. O número fundamental foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico.

Resultados

Todas as populações apresentaram $2n=48$, independentemente do sexo. Contudo, diferenças estruturais foram identificadas entre as populações, com o estabelecimento de quatro fórmulas cariotípicas de acordo com a localidade amostrada (Tabela 2). A detecção das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RONs) revelou um sistema múltiplo com variabilidade interpopulacional no número de cromossomos marcados, observando-se até cinco marcações terminais de Ag-RONs, caracterizadas por heteromorfismos de tamanho entre homólogos (Tabela 2; Figuras 2a, 2b, 2c, 2d, em detalhe). A coloração com fluorocromos base-específicos revelou diferenças interpopulacionais nos sítios CMA_3^+ e DAPI, variando a posição, o tipo e o número de cromossomos marcados, muitos dos quais equivalentes às RONS (Tabela 2; Figuras 3a, 3b, 3c, 3d).

Tabela 2: Lista de espécimes de *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characiformes, Characidae) analisadas no trabalho com dados dos locais de coleta, número cromossômico (2n), fórmula cariotípica, número de braços (FN), localização de Ag-RONs e de sítios CMA₃⁺/DAPI.

N amostral (sexo)	Local de coleta (bacia hidrográfica)	Coordenadas geográficas	2n	Fórmula cariotípica	NF	Ag-RON	CMA ₃ ⁺ /DAPI
44 (7♂, 35♀, 2?)	Rio de Contas (Bacia do Rio de Contas)	13°51'51"S e 40°04'54"W	48	8m+24sm+12st+4a	92	Tbc 1 par sm; Tbl 1 par st; T 1m.	Tbl 1sm e 1a; Tbc 1 par sm (coincidente às RONS).
34 (4♂, 24♀, 6?)	Rio Preto do Costa (Bacia do Rio de Contas)	13°45'08"S/39°56'47"W	48	8m+22sm+10st+8a	88	Tbl 1 par st grande; Tbc 1 par st.	Tbl 1 par st (coincidentes às RONS).
38 (10♂, 20♀, 8?)	Rio Mutum (Bacia do Rio de Contas)	13°43'18"S e 39°51'20"W	48	8m+18sm+12st+10a	86	Tbc 1st e 1sm.	Tbc 1st e 1sm (coincidentes às RONS).
21 (7♂, 11♀, 3?)	Rio Mineiro (Bacia do Recôncavo Sul)	13°50'52"S/39°41'55"W	48	8m+18sm+16st+6a	90	Tbl 1 par st; Tbl 1sm.	Tbc 2st e 1sm (coincidentes às RONS); Bt 1st.

Legenda: 2n = número diplóide; ♂ = machos; ♀ = fêmeas; ? = sexo indeterminado (imaturos); m = metacêntricos; sm = submetacêntricos; st = subtelocêntricos; a = acrocêntricos; NF = número fundamental; RONS = regiões organizadoras de nucléolo; Tbc = marcação terminal no braço curto; Tbl = marcação terminal no braço longo; T = marcação terminal; Bt = marcação biterminal.

Discussão

Variações morfológicas e citogenéticas são comuns no gênero *Astyanax* ao longo de sua ampla distribuição geográfica (Melo, 2001; Artoni et al., 2006), o que compromete a precisa identificação das espécies. A variabilidade cariotípica encontrada no gênero *Astyanax*, com números diplóides variando de 36 a 50 cromossomos (Morelli et al., 1983; Oliveira et al., 1988; Souza; Moreira-Filho, 1995; Daniel-Silva; Almeida-Toledo, 2001, 2005; Kavalco et al., 2009a) dificulta as inferências evolutivas no grupo, sobretudo nas espécies com alto grau de polimorfismo como *A. fasciatus*. Assim, estudos envolvendo as espécies desse gênero de diferentes localidades em abordagens comparativas são importantes para identificar corretamente cada população e delimitar as unidades evolutivas dentro do grupo.

Nas quatro populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* estudadas foram observados espécimes com 48 cromossomos que compartilham o primeiro par metacêntrico grande em relação ao restante do complemento, característica comum entre os Characidae (Morelli et al., 1983; Daniel-Silva; Almeida-Toledo, 2005). Os cariótipos apresentaram-se assimétricos, sendo compostos por vários cromossomos sm, como comumente observado no cariomorfo padrão de $2n=48$ (Pazza et al., 2006). Apesar dessas semelhanças, as fórmulas cariotípicas e os padrões de distribuição de RONS e regiões ricas em GC foram diferenciados entre as localidades amostradas.

A ocorrência de diferenças na morfologia cromossômica e a conservação do número diplóide sugerem a participação de rearranjos estruturais como inversões pericêntricas. De fato, as inversões são consideradas o principal mecanismo de diversificação cariotípica em *Astyanax* (Pazza; Kavalco, 2007; Domingues et al., 2007 entre outros), algumas vezes determinando variações intrapopulacionais como detectado em *A. bockmanni* da bacia do rio Tietê, sudeste do Brasil (Hashimoto e Porto-Foresti, 2010.)

Em *Astyanax*, as RONS usualmente são múltiplas, com variações de localização, posição e tamanho (Kavalco; Moreira-Filho, 2003; Pazza et al., 2006; Hashimoto; Porto-Foresti, 2010) constituindo marcadores adicionais entre as populações. Seguindo essa tendência, as populações analisadas exibiram variações interpopulacionais dos sítios Ag-RONS. Além da posição terminal e variações de tamanho entre homólogos, as RONS foram

preferencialmente detectadas no braço longo de um par st, com exceção das amostras do rio Mutum.

Por outro lado, Pazza et al. (2006) analisando populações de *Astyanax aff. fasciatus* do rio Mogi-Guaçu, sudeste do Brasil, registrou a ocorrência preferencial de Ag-RONs no braço curto de um par sm em todas as formas cariotípicas. Desse modo, as populações estudadas parecem divergir tanto na macroestrutura quanto microestrutura cromossômica do grupo *A. fasciatus* de outras bacias, reforçando a separação evolutiva entre elas.

Tal variação numérica, posicional e de tamanho das marcações entre os cromossomos portadores de RONS pode ser resultante de ativação diferencial ou eventos de transposição e trocas desiguais destes sítios, dispersando-os para diferentes cromossomos (Mantovani et al., 2000; Vicari et al., 2008a; Ferreira Neto et al., 2009; Fernandes; Martins-Santos, 2004).

Ainda, a ocorrência de Ag-RONs múltiplas com sítios principais mais conspícuos e sempre ativos ao lado de sítios secundários e com atividade variável parece ser uma característica comum ao gênero *Astyanax* (Mantovani et al., 2000; Ferro et al., 2001; Kavalco; Moreira-Filho, 2003; Pazza et al., 2006). Um modelo de ativação em cascata foi proposto por Zurita et al. (1998) para explicar esse comportamento das RONS. Neste modelo, os fatores de transcrição se ligariam aleatoriamente aos promotores ribossômicos de modo que RONS com maior número de unidades transcricionais de genes são mais prováveis de serem transcritas. Posteriormente, os fatores de transcrição restantes seriam recrutados para completar a ativação dessa região organizadora nucleolar antes da ativação do próximo sítio, resultando na impregnação por nitrato de prata mais frequente de alguns sítios ricos em cópias de DNAr como observado neste trabalho.

Em relação aos fluorocromos base-específicos, esse é o primeiro trabalho a apresentar dados utilizando essa metodologia em espécies de peixes das bacias costeiras do nordeste do Brasil. Muitas das regiões ricas em GC (CMA₃⁺/DAPI) observadas nas populações analisadas eram coincidentes com sítios de Ag-RONs (Tabela 2). Essa é uma característica comum aos peixes, onde essa classe de heterocromatina parece estar intercalada com as regiões organizadoras de nucléolos (Pendás et al., 1993). Porém, há casos em que as marcações por CMA₃ não são correspondentes às RONS, como detectado em *Astyanax* (Souza et al., 1996, presente trabalho) e em outros grupos de peixes (Affonso; Galetti, 2005), indicando sua

aplicação para estudos de heterogeneidade na composição da heterocromatina. Por exemplo, a população do ribeirão Mineiro apresentou um cromossomo st com marcações ricas em GC biterminais e não coincidentes com as Ag-RONs. De fato, RONS biterminais têm sido identificadas no gênero *Astyanax*, ocorrendo em algumas espécies e/ou populações, como *A. hastatus* (Kavalco et al., 2009b), *A. scabripinnis* (Mantovani et al., 2005), *Astyanax janeiroensis* (Vicari et al., 2008a) e *Astyanax paranae* (Vicari et al., 2008b). Adicionalmente, foram identificados sítios GC-ricos restritos a apenas um dos homólogos nas populações estudadas. Esses sinais fluorescentes em heterozigose foram também documentados por Kavalco et al. (2007) em populações de *Astyanax scabripinnis* e *A. parahybae* do rio Paraíba do Sul, sudeste do Brasil. Esses achados podem ser explicados por trocas desiguais entre os homólogos durante a meiose que originam diferenças na quantidade de heterocromatina entre eles, resultando em sinais discretos (não detectáveis) ou ausentes em um dos homólogos (Kavalco et al., 2007).

A acentuada diversidade encontrada em pequenos caracídeos, como aquela detectada neste trabalho, parece estar relacionada com a ampla distribuição geográfica desse grupo de peixes. A capacidade de explorar grande variedade de microhabitats, formando pequenas populações com dispersão relativamente restrita, levou Garutti e Britski (2000) a sugerirem que estes peixes não formam um grupo uniforme, com variações interpopulacionais significativas do ponto de vista morfológico. O mesmo parece ocorrer com as populações de *A. aff. fasciatus* tanto em relação à estrutura cromossômica como também na morfologia externa (ver Medrado et al., 2008).

A bacia hidrográfica do rio de Contas é dividida em três regiões fisiográficas (Alto, Médio e Baixo) que engloba paisagens distintas: bioma semi-árido, zonas de transição e floresta Atlântica (SRHSH, 1993). Todos os locais de amostragem referem-se ao trecho do Médio Contas, exceto o ribeirão Mineiro pertencente à bacia do Recôncavo Sul. O canal principal do rio de Contas no município de Jequié, à jusante da Barragem da Pedra é altamente degradado pelo despejo de esgotos industriais e domésticos (CRA, 2001), enquanto as populações dos rios Preto do Costa e Mutum estão localizadas em uma zona de transição entre os climas semi-árido e tropical com pequenas cachoeiras. O ribeirão Mineiro, bacia do Recôncavo Sul, constitui um pequeno corpo d'água localizado na Mata Atlântica a cerca de 60 km de distância do rio de Contas, separado por uma pequena região montanhosa.

Curiosamente, a macroestrutura cariotípica da população do rio Mutum se mostrou mais diferenciada das demais localidades na bacia do rio de Contas e da população da bacia do Recôncavo Sul por não apresentar o par st marcador portador de RONS. Resultados similares foram encontrados por Pamponet et al. (2008) a partir de análises moleculares em populações de *A. aff. bimaculatus* do rio de Contas e da bacia Recôncavo Sul. Por outro lado, os exemplares do ribeirão Mineiro (bacia do Recôncavo Sul) apresentaram um cromossomo subteloentrico marcador com sinais biterminais de CMA₃, reforçando a separação entre as populações de cada sistema hidrográfico, assim como previamente sugerido por análises citogenéticas e morfométricas realizadas por Medrado et al. (2008). O conjunto desses resultados mostra a intrincada história evolutiva das bacias costeiras do leste brasileiro, cuja história biogeográfica parece ter sido marcada por eventos de conectividade e evolução independente (Saadi et al., 2002; Ribeiro, 2006; Pamponet et al., 2008).

Desse modo, as diferenças citogenéticas encontradas em *A. aff. fasciatus* não podem ser explicadas pelo modelo de isolamento por distância e podem ser reflexo das características biológicas do grupo, uma vez que são considerados típicos de ambientes de cabeceiras, formando populações fechadas e sujeitas a pressões seletivas locais. Outro aspecto que deve ser considerado é o fato desses pequenos caracídeos apresentarem notável capacidade de adaptação e um ciclo de vida curto (Garutti, 1989). Esses fatores combinados contribuiriam para as rápidas taxas evolutivas e fixação de diferenças genéticas entre as populações.

Embora seja difícil propor que mecanismos evolutivos possam estar atuando de forma independente em cada população de *Astyanax aff. fasciatus*, é evidente o grau de divergência entre as mesmas pelos estudos citogenéticos. Portanto, os cariomorfos aqui descritos podem corresponder a unidades evolutivas únicas, constituindo um complexo de espécies já que as diferenças em cada cariomorfo são contrastantes e formas intermediárias não foram encontradas. Esses dados reforçam o grau de endemismo da ictiofauna de bacias costeiras e isoladas do nordeste do Brasil (Jacobina et al., 2009; Zanata; Camelier, 2010), revelando padrões cariotípicos peculiares para as populações de *A. aff. fasciatus* até então analisadas em comparação com outras regiões da América do Sul. A investigação de marcadores cromossômicos adicionais, com diferentes classes de DNAs repetitivos, poderá contribuir para o melhor entendimento deste processo de diferenciação entre as populações de *Astyanax*,

bem como fornecer novos subsídios para uma definição do status taxonômico dos representantes desse diversificado gênero de peixes.

Agradecimentos

A autora agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, Universidade Estadual de Santa Cruz e Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

ABEL, L. D. S.; MANTOVANI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 (3), p. 448-452, 2006.

AFFONSO, P. R. A. M.; P. M. GALETTI Jr. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropomus* (Perciformes, Pomacanthidae). **Genetica**, v. 123, p. 227-233, 2005.

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

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal Genetic**, v. 1, p. 103-120, 1978.

CRA – CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS. 2001. Recursos Hídricos. In: Avaliação da Qualidade das Águas. Relatório Técnico/Avaliação Ambiental. Salvador, Centro de Recursos Ambientais, 389p.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, p. 209-215, 2001.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 497-501, 2005.

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

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 328-332, 2004.

FERREIRA NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32(4), p. 792-796, 2009.

FERRO, D. A. M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v. 110, p. 55-62, 2001.

GARUTTI, V. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* em cursos de água da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49(2), p. 489-495, 1989.

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

HASHIMOTO, D. T.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 8(4), p. 861-866, 2010.

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

JACOBINA, U. P.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S.; DERGAM, J. A. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7(4), p. 617-622, 2009.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56 (4), p. 453-461, 2003.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 329-335, 2007.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, v. 136 p. 136:135–139, 2009a.

KAVALCO, K. F.; BRANDÃO, K. O.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 32(3), p. 477-483, 2009b.

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 52, p. 36-40, 1980.

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

LIMA, F.T.C.; MALABRABA, L. R.; BUCKP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and America**. Reis, R. E; Kullander, S.O; Ferraris, Jr. C. J. (eds). EDIPCURS: Porto Alegre- RS, Brazil, p. 729, 2003.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools understanding karyotypic evolution. **Genetica** v. 109, 161-168, 2000.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S DNAr chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** v. 123, p. 211-216, 2005.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 208-214, 2008.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MOLINA, W. F. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. **Chromosome Science**, v. 5, p. 149-152, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14(2), p. 331-357, 1991.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O TOLEDO-FILHO, A. S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36 (3), p. 235-244, 1983.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 4th Edition. New York, John Wiley & Sons. Inc. 601p, 2006.

OLIVEIRA, C., L. F.; ALMEIDA-TOLEDO, F.; FORESTI, H. A.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A.. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 577-624, 1988.

PAMPONET, V. C. C.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; MIRANDA, V. S.; SILVA JUNIOR, J. C.; OLIVEIRA, C. G.; GAIOTTO, F. A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6 (4), p. 621-630, 2008.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, p. 313-319, 2006.

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

PAZZA, R.; KAVALCO, K.; PRIOLI, S.; PRIOLI, A.; BERTOLLO, L. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 843-851, 2007.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2. Gene mapping satellite DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 61-66, 2008.

PENDÁS, A. M., MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 63, p.128-130, 1993.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225-246, 2006.

SAADI, A.; MACHETTE, M. N.; HALLER, K. M.; DART, R. L.; BRADLEY, L.; SOUZA, A. M. P. D. Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil. U.S. Geological Survey, Open-File Report 02-230, 2002. disponível em: <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230>. Acessado em dezembro de 2010.

SECRETARIA DOS RECURSOS HÍDRICOS SANEAMENTO E HABITAÇÃO. **Plano Diretor de Recursos Hídricos Bacia do rio de Contas: Diagnóstico do sistema físico.** Relatório Técnico. Salvador: (SRHSH). Governo do Estado da Bahia, 160p, 1993.

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

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

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 405-410, 1996.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janae*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 67-72, 2008a.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p.173-179, 2008b.

ZANATA, A. M.; CAMELIER, P. *Hyphessobrycon brumado*: a new characid fish (Ostariophysi: Characiformes) from the upper rio de Contas drainage, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.8 (4), p. 771-777, 2010.

ZURITA, F.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M. GUARDIA, R. D. Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 1433-1439, 1998.

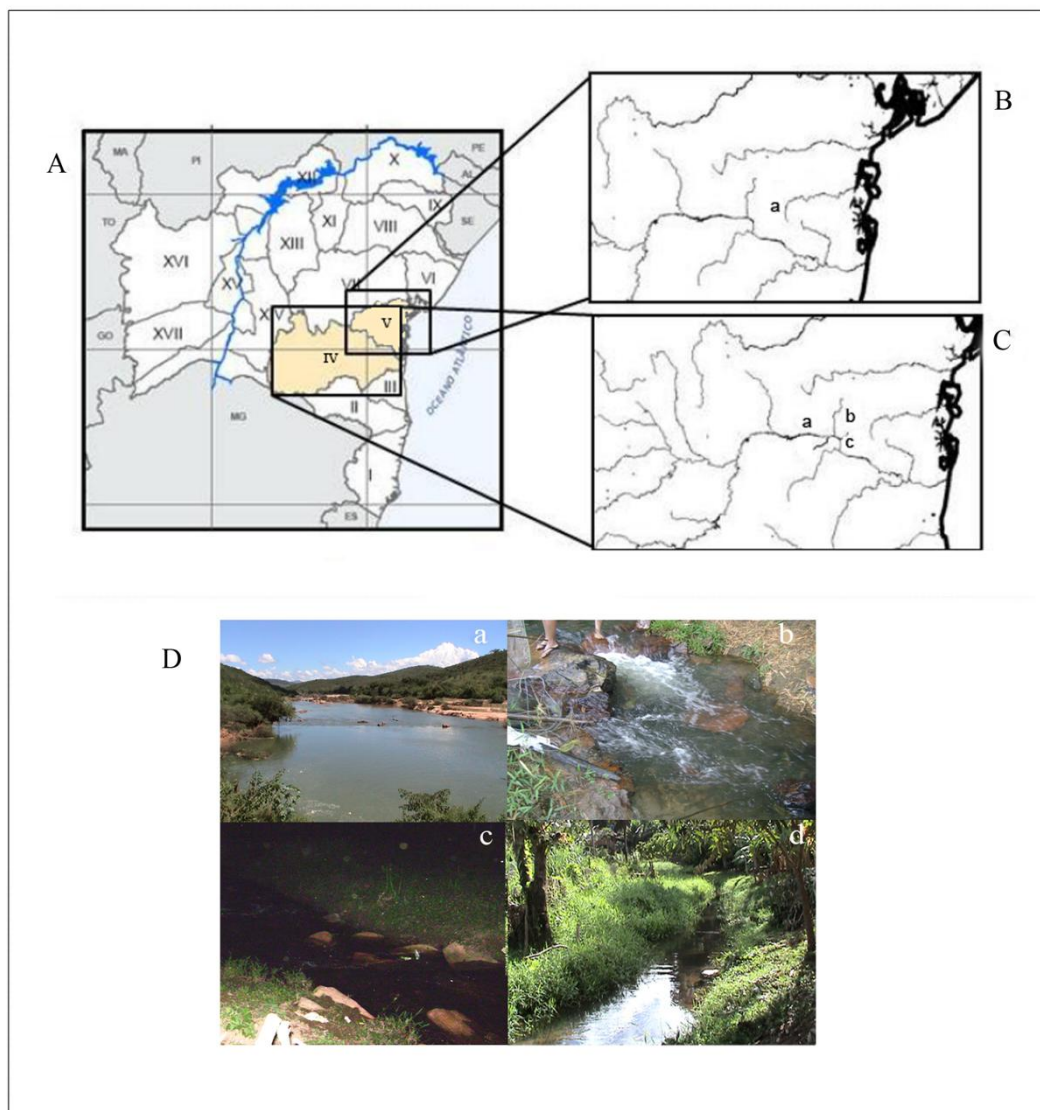


Figura 1- Locais de coleta de exemplares de *Astyanax* aff. *fasciatus*. A) Mapa das bacias do Nordeste: IV – Bacia do rio de Contas; V- Bacia do Recôncavo Sul. B) a- ribeirão Mineiro. C) a- calha principal do rio de Contas, b- rio Preto do Costa, c- rio Mutum. D- Vista parcial mostrando os locais de coleta de *Astyanax* aff. *fasciatus*: calha principal do rio de Contas (a), rio Preto do Costa (b), rio Mutum (c) e ribeirão Mineiro (d).

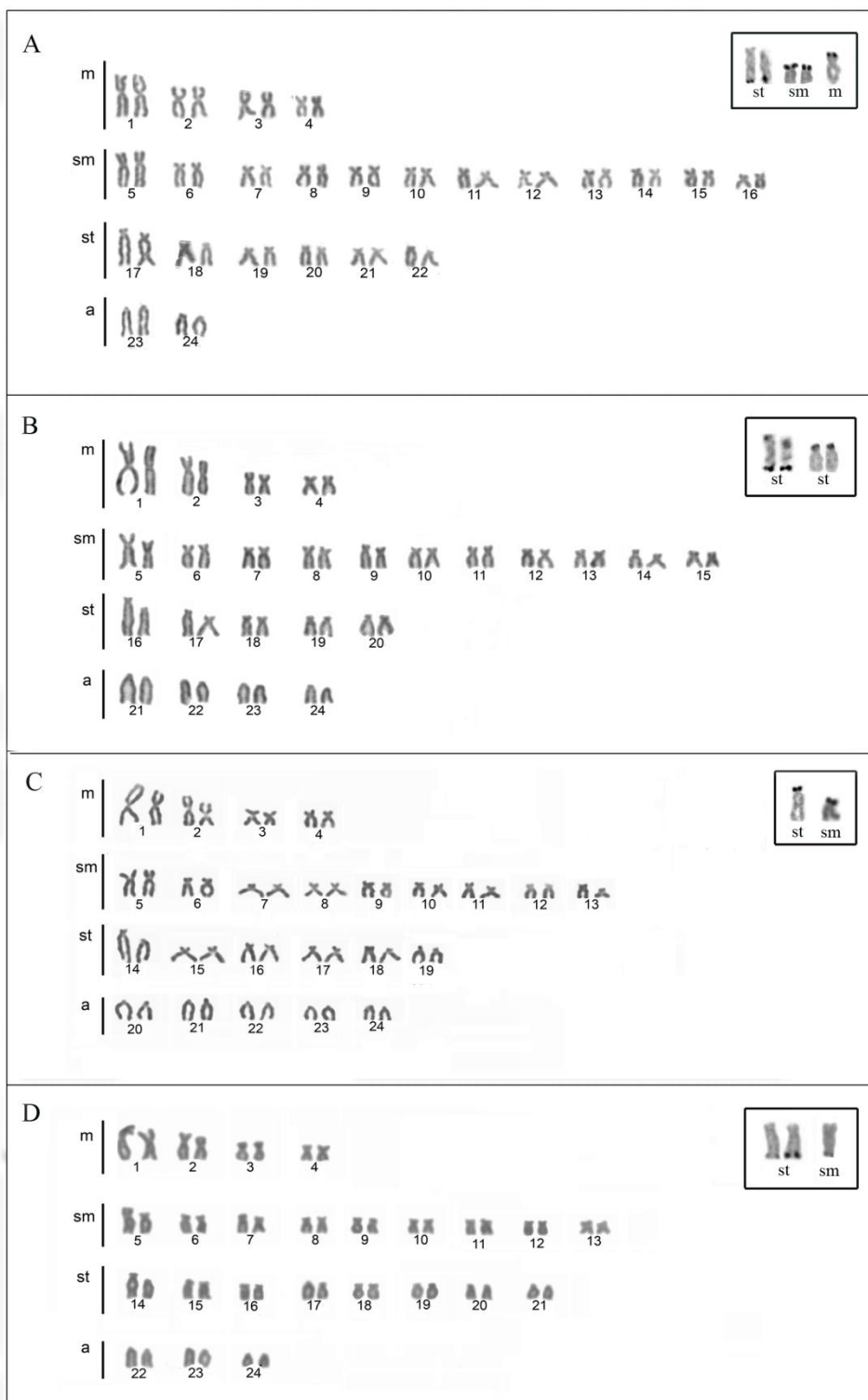


Figura 2- Cariótipos das populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* com $2n=48$ cromossomos corados com Giemsa. (A) calha principal do rio de Contas, (B) rio Preto do Costa, (C) rio Mutum e (D) ribeirão Mineiro. No detalhe, cromossomos portadores das Ag-RONs.

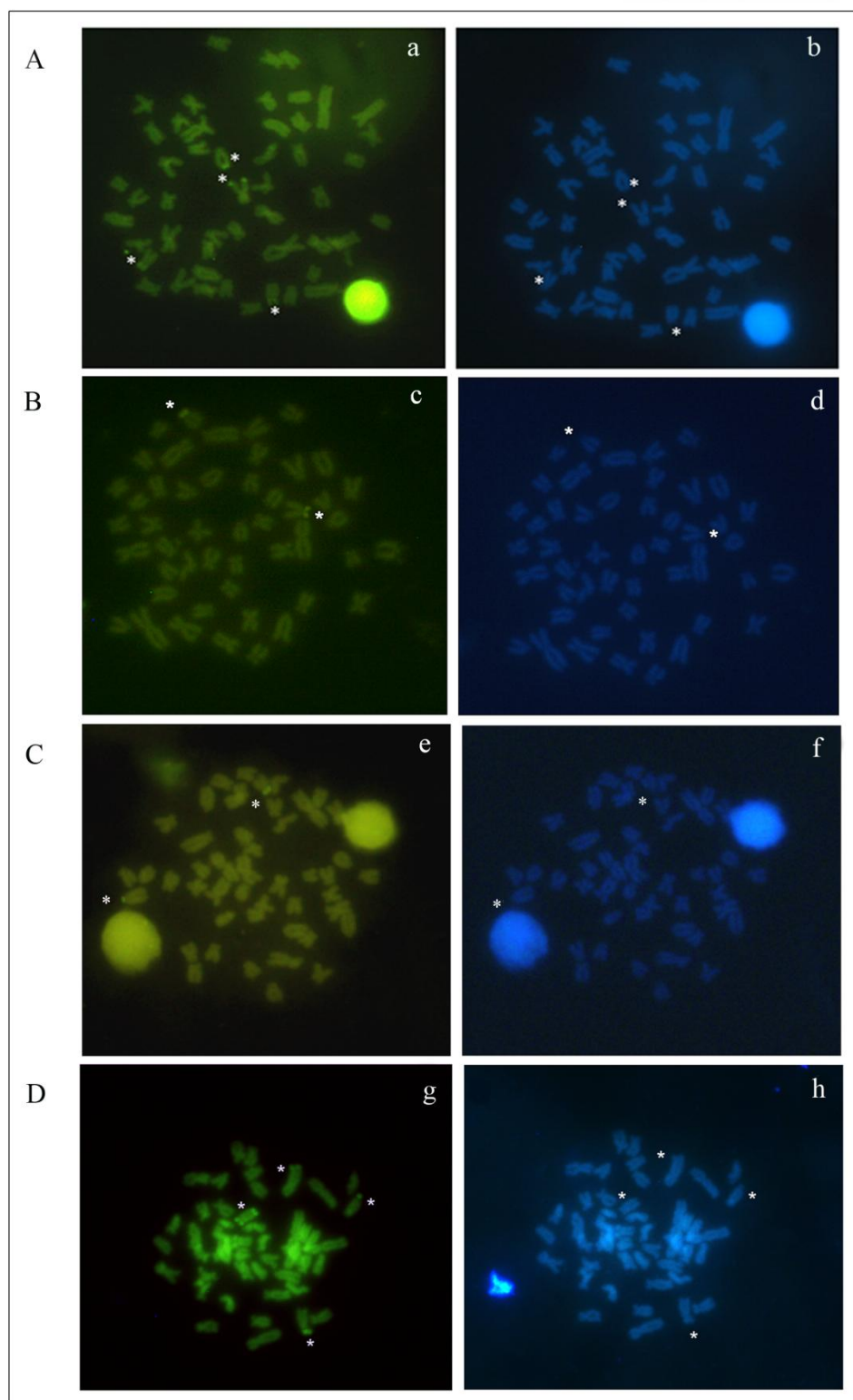


Figura 3- Metáfases de *Astyanax* aff. *fasciatus* após coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA3) e DAPI. (A) calha principal do rio de Contas, (B) rio Preto do Costa, (C) rio Mutum e (D) ribeirão Mineiro. Os asteriscos indicam os cromossomos portadores de sinais CMA₃ positivos (a, c, e, g) e DAPI negativos (b, d, f, h)

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os espécimes de *Astyanax* aff. *fasciatus* analisados apresentaram um número diplóide $2n=48$ cromossomos, porém com fórmulas cariotípicas exclusivas para cada localidade, sugerindo que inversões pericêntricas tiveram um papel importante na diversificação cariotípica das populações.

Astyanax sp. e *Astyanax* aff. *fasciatus* apresentaram blocos heterocromáticos sutis localizados nas regiões pericentroméricas, corroborando a hipótese que populações oriundas de bacias hidrográficas do leste tendem a apresentar pouca quantidade de heterocromatina localizada próxima aos centrômeros.

O polimorfismo de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) encontrado em *Astyanax* sp. e *Astyanax* aff. *fasciatus* pode ser resultante de eventos de transposição destes sítios, dispersando-os para diferentes cromossomos ou por *crossing-over* desiguais nessas regiões.

A análise de fluorocromos base-específicos possibilitou caracterizar a natureza composicional da heterocromatina, onde a maioria dos sinais CMA_3^+ e DAPI foram coincidentes com sítios de RONs marcados pela prata em *Astyanax* aff. *fasciatus* e *Astyanax* sp.

A análise citogenética de exemplares de *A.* aff. *fasciatus* de diversas populações na bacia do rio de Contas e uma da bacia do Recôncavo Sul indica uma evolução cariotípica divergente entre as populações analisadas, caracterizando distintas unidades evolutivas e prováveis complexos de espécies, já que as diferenças em cada cariomorfo são contrastantes e formas intermediárias não foram encontradas.

A diversidade cariotípica encontrada no grupo *Astyanax*, reafirma a importância da conservação dos habitats destas espécies para preservá-las, e assim proteger a diversidade encontrada em cabeceiras de sistemas hidrográficos neotropicais.

A variabilidade cariotípica encontrada em *Astyanax* com identificação de marcadores citotaxonômicos e/ou populacionais em relação a outros grupos de peixes neotropicais parece estar relacionada às próprias características biológicas do gênero. Nesse sentido, merece destaque a aplicação de técnicas mais refinadas de análise cromossômica como a coloração com fluorocromos base-específicos, onde os dados aqui apresentados constituem o primeiro relato da composição de bases da cromatina em Characiformes do nordeste brasileiro.

6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ABEL, L. D. S.; MANTOVANI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 (3), p. 448-452, 2006.

ARAÚJO, F. G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p.547-558, 1998.

ARAÚJO, A. C. S.; MORELLI, S. Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do Triângulo Mineiro. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 145-150, 2006.

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

AVISE, J. C. Phyleography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, M.A, 2000.

BERTACO, V. A.; LUCINDA, P. H. F. *Astyanax elachylepis*, a new characidae fish from the rio Tocantins drainage, Brazil (Teleostei, Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 389-394, 2005.

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

BERTACO, V. A.; GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.5, p. 25-30, 2007.

BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 7-20, 2010.

BIAVATI, S. H.; MAISTRO, E. L. Cytogenetical Analyses in Three *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae) from Minas Gerais state, Brazil. **Cytologia**, v. 72 (3), p. 357-361, 2007.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias** (com chaves de identificação para os peixes da bacia São Francisco). 3ª. Ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 115p., 1988.

BUCKUP, P. A.; ZAMPROGNO, C; VIEIRA, F; TEIXEIRA, R. L. Waterfall climbing in Characium (Crenuchidae: Characidiinae) from eastern Brazil. **Ichthyological Explorations Freshwaters**, v. 11 (3), p. 273-278, 2000.

CASTRO, R. M. C; MENEZES, C. A. Estudo da diversidade de peixes do estado de São Paulo. *In: Workshop Basis to the Conservation of Biodiversity within the State of São Paulo*. Serra Negra, SP, Brazil, 1996.

CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. *In: CARAMASCHI, E. P.; MAZozoni, R.; PERES-NETO, P. R. (Ed). Ecologia de peixes de riachos*. Rio de Janeiro: Computer & Publish Editoração, p. 139-155, 1999.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. *Astyanax biotae*, a new species of stream fish from the rio Paranapanema basin, upper Rio Paraná system, southeastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes:Characidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 117: 330-338, 2004.

CETRA, M.; SARMENTO-SOARES, L. M.; MARTINS-PINHEIRO, R. F. Peixes de riachos e novas Unidades de Conservação no sul da Bahia. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, p. 11-21, 2010.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C., JUSTI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O Correlation of chromosomal and morphologic characters into two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 14, p. 361-368, 2003.

CETRA, M.; PETRERE, JR., M. Fish assemblage structure of the Corumbatai river basin, São Paulo state, Brazil: characterization and anthropogenic disturbances. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 431-439, 2006.

CRA – Centro de Recursos Ambientais. Recursos Hídricos. *In: Avaliação da Qualidade das Águas*. Relatório Técnico/Avaliação Ambiental. Salvador, Centro de Recursos Ambientais, 389 p, 2001.

DANIEL-SILVA, M. F. Z; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, p. 209-215, 2001.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 497-501, 2005.

- DOMINGUES, M. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 37-44, 2007.
- FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. An additional chromosome in two fish species. **Revista Brasileira de Genética**, v. 7, p.109-118, 1984.
- FAUAZ, G; Vicente, V. E; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae) **Brazilian Journal Genetics**, v. 17, p. 157-163, 1994.
- FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 328-332, 2004.
- FERNANDES C. A; MARTINS-SANTOS, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B-chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**, v. 124, p. 301-306, 2005.
- FERREIRA NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32 (4), p. 792-796, 2009.
- GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Serie Zoológica**, v. 13, p. 65-88, 2000.
- GARUTTI, V.; VENERE, P. C. *Astyanax xavante*, a new species of characid from middle rio Araguaia in the Cerrado region, Central Brazil (Characiformes, Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 7(3), p. 377-383, 2009.
- GARUTTI, V.; LANGEANI, F. Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 7(3), p. 371-376, 2009.
- HASHIMOTO, D. T.; GONÇALVES, V. R.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, 1 (suppl), p. 275-278 2008.
- HALUCH, C. F.; ABILHOA, V. *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei, Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 383-388, 2005.

INGA, 2008. **Instituto Nacional de Gestão das Águas. Região de Planejamento e Gestão das Águas-VIII Rio de Contas.** disponível em: <http://www.inga.ba.gov.br/modules/downloads>. Acessado em novembro de 2010.

JACOBINA, U. P.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S.; DERGAM, J. A. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7(4), p. 617-622, 2009.

KANTEK, D. L. Z.; NOLETO, R. B.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M. Cytotaxonomy heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçú River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 67-74, 2007.

KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Editora SBG: Ribeirão Preto, SP, 1ª edição, 160 p., 2009.

KAVALCO, K. F. **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Paraitinga**. 143p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2003.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56 (4), p. 453-461, 2003.

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

KAVALCO, K. F., PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, v. 136, p. 135-139, 2009a.

KAVALCO, K. F.; BRANDÃO, K. O.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 32(3), p. 477-483, 2009b

LIMA, F.T.C.; MALABRABA, L. R.; BUCKP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and America**. Reis, R. E; Kullander, S.O; Ferraris, Jr. C. J. (eds). EDIPCURS: Porto Alegre- RS, Brazil, p. 729, 2003.

LIMA, F. T. C.; ZAUANON, J. A new species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the rapids of the lower rio Xingu, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, p. 117-122, 2004.

LOWEL-MCCONNELL, R. H. Speciation in tropical freshwater fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 1, p. 51-75, 1969.

LUCENA, C. A. S. **Estudo filogenético da família Characidae com um adiscussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. 158p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1993.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G.M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas. 157p., 2005.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae) **Genetica**, v. 87, p. 101-106, 1992.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica**, v. 110, p. 177-183, 2001.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Caderno da região hidrográfica do Atlântico Leste**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos (Ed.), Brasília, 156p, 2006.

MALACRIDA, A. C. P.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. Natural triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi River bay- PR **Cytologia**, v. 68, p. 267-270, 2003.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S DNAr chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** v. 123, p. 211-216, 2005.

MARINHO, M. M. F.; LIMA, F. C. T. *Astyanax ajuricaba*: a new species from the Amazon basin in Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 7(2), p. 169-174, 2009.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 208-214, 2008.

MESTRINER, C. A.; GALETTI Jr., P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

MOREIRA-FILHO, O. Estudos na família Parodontidae (Pisces, Cypriniformes) da bacia do rio Passa-Cinco, SP: Aspectos citogenéticos e considerações correlatas. Tese de mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1983.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14(2), p. 331-357, 1991.

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

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 230-234, 2004.

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P. A. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and Upper Paraná river basins. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 449-452, 2005.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, p. 245-250, 1983.

MURAMOTO, J.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, v. 24, p. 59-66, 1968.

NAKAYAMA, C. M.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 114, p. 231-236, 2002.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 4th Edition. New York, John Wiley & Sons. Inc. 601p, 2006.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) **Genetica**, v. 108, p. 211-215, 2000a.

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p. 136-141, 2000b.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. **Citogenética de peces**. Universidad de Oriente, Venezuela 212p., 2006.

- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 577-624, 1988.
- PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; HORÁCIO, F. J. Jr.; DIAS, A. L. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8(3), p. 667-671, 2010.
- PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 145-149, 2003.
- PAMPONET, V. C. C., CARNEIRO, P. L. S., AFFONSO, P. R. A. M., MIRANDA, V. S., SILVA JUNIOR, J. C., OLIVEIRA, C. G. & GAIOTTO, F. A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6 (4), p. 621-630, 2008.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, p. 313-319, 2006.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The nucleus**, v. 50, p. 519-543, 2007.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2. Gene mapping satellite DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 61-66, 2008.
- PENDÁS, A. M., MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 63, p.128-130, 1993.
- PERES, W. A. M.; BUCKUP, P. A.; KANTEK, D. L. Z.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, v. 137, p. 305-311, 2009.
- PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 307-313, 1988.
- PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JULIO JR, H. F.; MARTINS-SANTOS, I. C.; PAVANELLI, C. S. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *Iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. **Genetica**, v. 133: p. 113-118, 2008.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS- JUNIOR, C.J (org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central**. America. Porto Alegre, EDIPUCRS. 729 p, 2003.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225-246, 2006.

ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supranumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 601-615, 1993.

ROSA, R.; RUBERT, M.; MALABARBA, L. R.; MARTINS-SANTOS, I. C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, v. 7 (4), p. 601-605, 2009.

RUBERT, M.; MARGARIDO, V. P. Cytogenetic Studies in Three Species of the Genus *Oligosarcus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 127-135, 2007.

SECRETARIA DOS RECURSOS HÍDRICOS SANEAMENTO E HABITAÇÃO. **Plano Diretor de Recursos Hídricos Bacia do rio de Contas: Diagnóstico do sistema físico**. Relatório Técnico. Salvador: (SRHSH). Governo do Estado da Bahia, 160p, 1993.

SCHEEL, J.J. Fish chromosome and their Evolution. International report of Danmarks Akvarium. Charlottenlund: Danmark, 22p. 1973

SEVERI, W.; EL-DEIR, A. C. A.; FELIX, R. T. S.; ARAÚJO, I. M. S.; LUZ, S. C. S.; CALADO NETO, A. V.; COSTA, B. D. F.; CHAGAS, R. J.; BARRETTO, M. G. Composição e abundância da ictiofauna na área de influência dos reservatórios da Pedra e Funil, Bacia do Rio de Contas, Bahia. In: Moura, A. N.; Araújo, S. E. L.; Bittencourt Oliveira, M. C.; Pimentel, R. M. M.; Albuquerque, U. P. **Reservatórios do Nordeste do Brasil: Biodiversidade, ecologia e manejo**. Bauru. NUPPEA, p. 541-572, 2010.

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

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 405-410, 1996.

SOUZA, I. L.; SANTOS-SILVA, L. K.; VENERE, P. C.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron**, v. 39, p. 1036-1041, 2008.

SWERTS, C. P.; CASTRO, G. C.; MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Análises citogenéticas preliminares na espécie *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) proveniente do rio Sapucaí, represa de Furnas, MG. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p.66, 1998.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from de Araguari river, Uberlândia, M.G, Brasil, **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 161-165, 2006.

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

VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper Rio Paraná System, Brazil. **Copeia**, v. 2007(1), p. 150-162, 2007.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janaeensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 67-72, 2008a.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 173-179, 2008b.

WEITZMAN, S. H., MALABARBA, L. R. **Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes)**. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P. et al. (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS: Porto Alegre-RS, Brazil, pp. 161-170, 1998.

WASKO, A. P.; GALETTI-JÚNIOR., P. M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 135-138, 2000.

ZANATA, A. M.; CAMELIER, P. *Astyanax vermilion* and *Astyanax burgerai*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7 (2), p. 175-184, 2009.

ZANATA, A. M.; CAMELIER, P. *Hyphessobrycon brumado*: a new characid fish (Ostariophysi: Characiformes) from the upper rio de Contas drainage, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.8 (4), p. 771-777, 2010.

7. ANEXOS

7.1. Procedimentos metodológicos

7.1.1. Preparação de cromossomos mitóticos

O órgão utilizado para a obtenção de metáfases mitóticas foi a porção anterior do rim, uma vez que esta possui função hematopoiética e em peixes as hemácias são nucleadas. Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica de preparação direta proposta por Bertollo et al. (1978).

Para se obter uma boa análise cromossômica, foi necessária a obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Para isso, foi utilizada a indução do aumento na frequência mitótica nas células de defesa através da injeção de uma suspensão de levedura, segundo Lee e Elder (1980) ou alternativamente através da injeção de Munolan (Molina, 2001).

7.1.1.1. Obtenção dos cromossomos mitóticos (Bertollo et al., 1978).

- 1- Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção 1 mL/100 g de peso animal durante 30 minutos após o qual sacrifica-se o animal e retira-se o rim anterior.
- 2- Colocar o material, previamente lavado em solução hipotônica, em um béquer contendo 10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M.
- 3- Dissociar o material com pinças de dissecação para separar as células, completando o processo com o auxílio de uma seringa hipodérmica.
- 4- Incubar o material em estufa a 37°C durante 20 minutos.
- 5- Transferir o material para tubos de centrifuga de 15 mL e pingar 5-10 gotas de fixador metanol/ácido acético (3:1), ressuspender o material, e centrifugá-lo durante 10 minutos a 1500 rpm.

- 6- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirar o sobrenadante e acrescentar 6 mL de fixador. Ressuspender o material e centrifugá-lo durante 10 minutos.
- 7- Repetir o passo número 6 mais duas vezes.
- 8- Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1-2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material, e ressuspender o material.
- 9- Acondicionar o material em tubos de plásticos do tipo Eppendorf e guardá-lo no refrigerador.

7.1.2. Preparo de lâminas

- 1- Pingar cerca de 2 a 3 gotas de suspensão celular, com auxílio de pipeta Pauster, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa, levemente inclinada e com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina.
- 2- Deixar secar diretamente ao ar.
- 3- Corar com Giemsa, diluído 5% em tampão fosfato pH 6,8 por cerca de 8 minutos, ou tratar a lâmina segundo as técnicas de impregnação por nitrato de prata, bandamento C ou coloração por flurocromos base-específicos CMA₃ e DAPI.

7.1.3. Técnica para detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Howell e Black, 1980).

- 1- Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica para cromossomos mitóticos 2 gotas de solução de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na preparação de 1 parte para 100 ml de solução). A gelatina comercial sem sabor deu resultados satisfatórios.
- 2- Adicionar, sobre a gota anterior, 4 gotas de solução de nitrato de prata a 50%. Misturar bem e cobrir com lamínula.
- 3- Incubar em estufa a 60°C, por um período de 3 a 8 minutos, dependendo de um monitoramento da coloração da lâmina. Na estufa as lâminas são incubadas em câmara úmida (placa de petri com papel filtro úmido).
- 4- Após o tempo apropriado, quando as RONS e os nucléolos assumem uma coloração preta ou marrom e os cromossomos um tom amarelado, lavar em água destilada, possibilitando que a lamínula seja retirada naturalmente pela própria água.

5- Pode-se corar com Giemsa (após retirar a lamínula e lavar em água destilada), só que tem que ser muito rápida a coloração, cerca de 30 segundos.

7.1.4. Bandamento C (Sumner, 1972)

- 1- Envelhecer a lâmina por cinco dias a 37°C.
- 2- Imergir a lâmina envelhecida em HCl 0,2N à temperatura ambiente de 13 a 15 minutos; lavar em água corrente e secar ao ar.
- 3- Incubar a lâmina, por um tempo que pode variar de 45 segundos a 1 minuto e 30 segundos em solução saturada de Ba (OH)₂ a 5% a 42°C.
- 4- Mergulhar a lâmina rapidamente em HCl a 0,2 N à temperatura ambiente.
- 5- Incubar a lâmina por 30 minutos em solução de 2X SSC a 60°C.
- 6- Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar.
- 7- Corar com Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos.

7.1.5. Coloração com fluorocromos GC e AT específicos (Schmid, 1980).

- 1- Colocar cerca de 50 µL de solução de cromomicina (0,5mg/mL) sobre a lâmina, cobrir com lamínula e deixar por 1 hora em local escuro.
- 2- Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIvaine ou água destilada e secar levemente.
- 3- Colocar cerca de 50 µL de solução de Distamicina (0,1 mg/mL) sobre a lâmina, cobrir com lamínula e deixar por 30 minutos em local escuro.
- 4- Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIvaine ou água destilada e secar levemente.
- 5- Colocar cerca de 50 µL de solução de DAPI (0,2mg/mL) sobre a lâmina, cobrir com lamínula e deixar por 30 minutos.
- 6- Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIvaine ou água destilada, secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de montagem glicerol/McIvaine.
- 7- Esperar por 15 dias para analisar em microscópio de fluorescência. Opcionalmente, a lâmina pode ser montada com DAPI/antifading no passo 5, usando 50 µL de solução DAPI/antifading.