

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCOS VINICIUS PUPO**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE *Psalidodon fasciatus*, CUVIER 1819  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DO MUNICÍPIO DE SANTA HELENA – PR**

**SANTA HELENA**

**2021**

**MARCOS VINICIUS PUPO**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE *Psalidodon fasciatus*, CUVIER 1819  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DO MUNICÍPIO DE SANTA HELENA – PR.**

**Chromosomal characterization of *Psalidodon fasciatus*, Cuvier 1819  
(Characiformes, Characidae) from Santa Helena, PR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Daniel Rodrigues Blanco.

**SANTA HELENA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**MARCOS VINÍCIUS PUPO**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE *Psalidodon fasciatus*, CUVIER 1819  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DO MUNICÍPIO DE SANTA HELENA – PR.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título de  
Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29 de Novembro de 2021

---

Sara Tatiana Moreira  
Doutora em Genética  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Heleno Brandão  
Doutor em Zoologia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Daniel Rodrigues Blanco  
Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
Universidade Tecnológica Federal do Para

**SANTA HELENA**

**2021**

Aos meus pais, Regina e Célio, que mesmo distantes, estão comigo em todos os momentos. Essa conquista também é de vocês.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Santa Helena, pela estrutura e suporte financeiro para a realização do projeto.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Fundação Araucária pelo fomento, ao ICMBio pela autorização para as coletas e à Polícia Ambiental de Santa Helena pelo apoio nas atividades de campo.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Rodrigues Blanco, pela enorme parceria e orientação durante os projetos de pesquisa, pelo suporte e toda a ajuda, bem como por todos os conhecimentos e experiência compartilhados.

Ao Grupo de Estudos em Ictiologia Neotropical - GEIN, em especial à Natália e ao Me. Sandro, por toda ajuda e experiências compartilhadas em laboratório e também ao Prof. Dr. Heleno Brandão, pelo suporte técnico na elaboração do mapa e toda a parceria.

A todos os professores e funcionários da UTFPR *campus* Santa Helena que contribuíram com minha formação ao longo desses anos, sem os quais eu não teria as bases de conhecimento para este projeto. Em especial à Profa. Dra. Rosângela, por ser um grande exemplo para mim.

À todas as pessoas que estiveram ao meu lado ao longo desse período e que me ajudaram e incentivaram. Em especial à Aline, que esteve comigo em meus altos e baixos durante tempos tão difíceis. E aos meus amigos, pela parceria e bons momentos compartilhados.

À minha família. Aos meus pais, Regina e Célio, por todos os desafios que superamos juntos, por me ensinarem a dar sempre o meu melhor e nunca medirem esforços para me apoiar, vocês sempre serão parte de mim. Ao meu irmão, Célio Junior, por todos os conselhos, sempre me incentivando, me apoiando, aconselhando e por ser meu melhor amigo para a vida, eu não teria conquistado isso sem você. Ao Vinícius, Lidiane, Rafael, Júlio, Ana, Thiago, Simone, Paulo, Ágata, Daniele, Matheus, Marcelly, João, Adélia, Leonilda, Jandira e demais familiares que mesmo de longe, sempre estiveram presentes e torcendo por mim.

“Nada na biologia faz sentido a não ser sob a luz da evolução” (DOBZHANSKY, 1973)

## RESUMO

PUPO, Marcos Vinícius. **Caracterização cromossômica de *Psalidodon fasciatus*, Cuvier 1819 (Characiformes, Characidae) do município de Santa Helena – PR. 2021. 34 f.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2021.

A região Neotropical possui a maior ictiofauna de águas continentais conhecida, abrigando uma alta biodiversidade de espécies e sendo considerada uma região ainda pouco compreendida. Ampliar a compreensão da diversidade cromossômica da ictiofauna torna-se uma ferramenta potencial para a compressão geral dessa biodiversidade e, conseqüentemente, para a expansão de ações que sejam capazes de favorecer modelos de preservação ambiental e manejo adequado de sistemas aquáticos. A família Characidae, por sua vez, é uma das maiores e mais complexas dentre as famílias da ordem dos Characiformes, apresentando em suas relações de parentesco incongruências descritivas, com frequentes incertezas de monofiletismo, como no caso de *P. fasciatus*. Portanto, este estudo objetivou caracterizar exemplares de *Psalidodon fasciatus* por metodologias de citogenética clássica provenientes de uma população natural do município de Santa Helena - PR. Foram coletados 16 espécimes (6 machos e 10 fêmeas) de *Psalidodon* aff. *Fasciatus*. As análises foram feitas a partir de coloração em Giemsa, Bandamento C e impregnação por nitrato de prata (AgNOR). O número diploide mais frequente encontrado nos espécimes analisados foi de  $2n=50$  cromossomos ( $8m+24sm+6st+12a$ , FN = 88), sendo este encontrado em 5 machos e em 8 fêmeas. Contudo, em 3 exemplares, sendo 2 fêmeas e 1 macho, foi observado um número diplóide de  $2n=48$  cromossomos ( $8m+24sm+6st+10a$ , NF=86). No cariomorfo  $2n=50$  foram evidenciadas marcações por blocos de heterocromatina associados com as AgNORs nas regiões terminais dos pares cromossômicos submetacêntricos 8 e 9, enquanto que no cariomorfo  $2n=48$  foram observadas marcações conspícuas na região terminal do par cromossômico acrocêntrico 23 e somente em um cromossomo do par submetacêntrico 7, também na posição terminal. Os espécimes analisados no presente estudo, embora identificados morfológicamente como *Psalidodon* aff. *fasciatus*, apresentaram divergências cromossômicas consideráveis (número diploide, NF, Ag-NORs e Bandamento C) quando comparadas entre si e com demais populações estudadas, podendo ser separados em dois cariomorfos distintos. Assim, tal variação cromossômica sugere possível isolamento reprodutivo, reforçando a hipótese de *P. fasciatus* se tratar de um complexo de espécies.

**Palavras chave:** Bacia do Alto Paraná. Citogenética. Complexo de espécie. “Lambari”.

## ABSTRACT

PUPO, Marcos Vinícius. **Chromosomal characterization of *Psalidodon fasciatus*, Cuvier 1819 (Characiformes, Characidae) from Santa Helena, PR.** 2021. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2021.

The Neotropical region has the largest known continental water ichthyofauna, harboring a high biodiversity of species and it is considered a region still poorly understood. In this perspective, broadening the understanding of the chromosomal diversity of the its ichthyofauna becomes a potential tool for the general understanding of biodiversity and, consequently, for the expansion of actions that strengthen models of environmental preservation and adequate management of aquatic systems. The Characidae family is one of the largest and most complex among the families of Characiformes, demonstrating descriptive inconsistencies in their kinship relationships, with frequent monophyletic uncertainties, such as *P. fasciatus*. Therefore, this study aimed to characterize *Psalidodon fasciatus* specimens by classical cytogenetic methodologies from a natural population of Santa Helena-PR. Sixteen specimens (6 males and 10 females) of *Psalidodon* aff. *Fasciatus* have been collected. Analyzes have been performed using Giemsa staining, C-Banding and silver nitrate impregnation (AgNOR). The most frequent diploid number found in the analyzed specimens was  $2n=50$  chromosomes ( $8m+24sm+6st+12a$ , FN = 88), which was found in 5 males and 8 females. However, in 3 specimens, 2 females and 1 male, a diploid number of  $2n=48$  chromosomes ( $8m+24sm+6st+10a$ , NF=86) was observed. In the  $2n=50$  karyomorph, markings by heterochromatin blocks associated with the AgNORs were evidenced in the terminal regions of the submetacentric chromosome pairs 8 and 9, while in the  $2n=48$  karyomorph, some conspicuous markings were observed in the terminal region of the acrocentric chromosome pair 23 and only in one chromosome of the submetacentric pair 7, also in terminal position. The specimens analyzed in the present study, although morphologically identified as *Psalidodon* aff. *fasciatus*, showed considerable chromosomal divergences (diploid number, NF, Ag-NORs and C Banding) when compared with each other and with other studied populations, and can be separated into two distinct karyomorphs. Thus, such chromosomal variation suggests possible reproductive isolation, reinforcing the hypothesis that *P. fasciatus* is a complex of species.

**Keywords:** Upper Paraná Basin. Cytogenetics. Species complex. "Lambari".



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>04</b>
2.1	Objetivo geral .....	04
2.2	Objetivos específicos .....	04
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>05</b>
3.1	<i>Characiformes: Characidae</i> .....	05
3.2	Marcadores Cromossômicos.....	06
3.3	Citogenética de <i>Psalidodon fasciatus</i> .....	08
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
4.1	Exemplares e pontos amostrados.....	11
4.2	Preparação de cromossomos mitóticos.....	11
4.3	Preparo de lâminas .....	12
4.4	Análise cariotípica.....	12
4.5	Bandeamento C.....	13
4.5	Impregnação por Nitrato de Prata – Ag-RONs.....	14
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>21</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As análises cromossômicas entre as espécies foi desconsiderada dentro das análises evolutivas no início dos estudos citológicos, de forma que diversos autores chegaram a afirmar que haveria pouco significado em comparar diferentes cariótipos, uma vez que o mais relevante seria o conteúdo dos genes, não o formato ou tamanho cromossômico entre as espécies. A partir das primeiras investigações de sítios de recombinação nos cromossomos e, posteriormente, na análise de alterações gênicas como resultado de fissões e fusões cromossômicas, indicando inclusive alterações evolutivas, mostraram a relevância dos estudos cromossômicos (WHITE, 1954 *apud*. PAZZA, 2005). Os estudos de variabilidade cromossômica possuem ampla aplicação clínica para a identificação de diversas doenças no que condiz aos seres humanos, todavia nas demais espécies de animais a relevância se concentra em relações evolutivas, com abordagens filogenéticas e taxonômicas.

As diferentes alterações estruturais nos cromossomos podem ser consideradas favoráveis, neutras ou desfavoráveis para determinada espécie. Dessa forma, as características que sejam favoráveis ou neutras para a população, em determinado momento, são mantidas para as próximas gerações como forma de ampliar a variabilidade genética natural ou conferir vantagens adaptativas aos portadores. Por outro lado, as desfavoráveis são naturalmente eliminadas. Isso evidencia a grande relevância das alterações cromossômicas nos processos evolutivos e a importância de se avançar em estudos citogenéticos para melhor compreender a estrutura e organização cariotípicas das espécies. (GUERRA, 1998).

Diversos tipos de variações cromossômicas podem ser observadas naturalmente em diferentes populações de espécies, compreendendo múltiplas formas de rearranjos. Neste contexto, os peixes têm se apresentado como um dos grupos mais diversificados dos vertebrados para análises de variabilidade cromossômica dentre os vertebrados (WEITZMAN; MALABARBA, 1998; BORŮVKOVÁ, HOWELL, MATOULEK, et al., 2021). A grande variação cromossômica encontrada em populações naturais em diferentes espécies de peixes, tanto marinhos como de águas continentais, revela que eventos como fissões e fusões

cêntricas, inversões e cromossomos supranumerários tem sido frequentemente descritos e fazem parte da história evolutiva desses grupos.

Em posição basal na filogenia e por ser um dos grupos mais diversificados entre os vertebrados, os peixes representam um grupo promissor para estudos da variabilidade genética e cromossômica (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016). Assim, ampliar a compreensão da diversidade cromossômica da ictiofauna torna-se uma ferramenta potencial para a compressão geral da biodiversidade e, conseqüentemente, para a expansão de ações que sejam capazes de favorecer modelos de preservação ambiental e manejo adequado de sistemas aquáticos (VARI; MALABARBA, 1998).

A diversidade presente na ictiofauna de água continental tem sua história natural relacionada com a história geológica dos diversos cursos de água na América Latina (CASTRO, 1999). Desta forma, caracterizar essa ictiofauna diversa e pouco compreendida, suas relações e suas distribuições significa preservar também a biodiversidade histórico-evolutiva. Ou seja, conhecer as espécies que existem em determinada região é fundamental para delimitar regiões de conservação, uma vez que a falta de conhecimento é um dos principais fatores que levam a perda de biodiversidade e, inclusive, traz a possibilidade de espécies serem levadas a extinção antes mesmo de serem conhecidas e descritas (RICKLEFS, 2010).

A enorme diversidade de espécies encontrada nos peixes traz consigo muitas incertezas filogenéticas. Nesse sentido, o uso de marcadores citogenéticos em populações de peixes tem trazido avanços significativos para o entendimento evolutivo e taxonômico de diferentes populações em toda a região Neotropical. Esse fator tem ampliado consideravelmente a compreensão da vasta diversidade ictiofaunística presente nessa região (BERTOLLO; CIOFFI; GALETTI JR. et al., 2017).

As alterações nas macroestruturas cromossômicas têm sido frequentemente associadas com diversas características adaptativas ambientais (HOFFMANN; RIESEBERG, 2008; WELLENREUTHER; BERNATCHEZ, 2018), especialmente em populações de peixes, que esses processos evolutivos podem estar intimamente ligados com uma alta plasticidade genômica, uma vez que são caracterizados por sua alta tolerância a alterações cromossômicas (RAVI; VENKATESH, 2008). Essa

dinâmica, destacada pela relevância dos dados cromossômicos, pode ser considerada uma forte ferramenta para elucidar os caminhos evolutivos que levaram a diversidade ictiofaunística atual, auxiliando na tomada de decisões referentes à sua conservação (RÁB; BOHLEN; RÁBOVÁ et al., 2008).

Apesar dos avanços, muitas problemáticas filogenéticas continuam pouco compreendidas, como as diversas espécies que têm sido agrupadas dentro do mesmo grupo, mesmo se tratando de espécies distintas geneticamente, o que gera descrições errôneas, sinonímias ou que não refletem a biodiversidade presente na região (MIRANDE; KOERBER, 2015; GAVAZZONI; PAVANELLI; GRAÇA et al., 2020), como por exemplo, a relação entre os gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*, que tem sido repetidamente colocada em debate tanto a existência, quanto o monofiletismo dos mesmos (TERÁN; BENITEZ; MIRANDE, 2020). Assim, conhecer a biodiversidade real de espécies pode proporcionar um delineamento mais eficaz que seja capaz de ampliar possíveis ações de conservação ambiental.

Dentre as recentes descrições e incertezas relacionadas aos gêneros supracitados, destaca-se aqui o antigo *Astyanax fasciatus*. Este teve sua filogenia reconsiderada após diversas análises genéticas e morfológicas, para que possa ser válido então como *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819) (TERÁN; BENITEZ; MIRANDE, 2020). Isso evidencia a necessidade de se ampliar os dados citogenéticos destes grupos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar por meio de metodologias de citogenética clássica exemplares de *Psalidodon fasciatus* (Characiformes: Characidae), provenientes de uma população natural do município de Santa Helena, Paraná.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar número diplóide ( $2n$ ), fórmula cariotípica e número fundamental (NF) dos exemplares analisados;
- Determinar o padrão de distribuição heterocromático;
- Detectar as regiões organizadoras de nucléolo (NORs);

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Characiformes: Characidae

A ordem dos Characiformes é representada por 24 famílias, com cerca de 520 gêneros e aproximadamente 2.300 espécies descritas, das quais mais de 200 espécies ocorrem somente no continente africano e as demais são distribuídas entre o sudoeste dos Estados Unidos, no México, América Central e América do Sul (VAN DER LAAN; ESCHMEYER; FRICKE, 2021). Uma significativa parcela deste grupo com muitas espécies ainda pouco conhecidas apresenta notável diversidade morfológica, o que acarreta em compreensões evolutivas que permanecem controversas, levando a necessidade de revisões por vários autores (VARI; MALABARBA, 1998; DAHDUL, 2010; MALABARBA; MALABARBA, 2010).

Dentro dos limites desse grande grupo taxonômico, encontra-se a família Characidae, que segundo Britski (1988), trata-se de uma das maiores e mais complexas dentre as famílias da ordem. As relações de parentesco dentro dessa família apresentam grandes incongruências descritivas, trazendo frequentemente incertezas de monofiletismo (LIMA; MALABARBA; BUCKUP et al., 2003).

Com um grande número de casos de *incertae sedis*, termo usado para indicar a incapacidade de estabelecer as posições exatas de táxons, que considerando-se as subfamílias do grupo, pode variar entre 500 à 600 casos (NELSON, 2016). Nesse sentido, Reis et al. (2003), por exemplo, descreveram inicialmente 9 espécies como *incertae sedis* dentro da família Characidae e, posteriormente, registraram cerca de 88 gêneros compreendendo 620 espécies como *incertae sedis*. Alguns dos gêneros que ainda apresentam casos de incertezas taxonômicas são: *Astyanax*, *Bramocharax*, *Exodon*, *Gymnocharacinus*, *Gymnocorymbus*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Jupiaba*, *Moenkhausia*, *Oligosarcus*, *Paracheirodon*, *Pristella*, *Probolodus*, *Rachoviscus*, *Stygichthys*, bem como o *Psalidodon* (NELSON, 2016; TERÁN, BENITEZ, MIRANDE, 2020), o que evidencia a necessidade de maiores estudos para continuar elucidando a sistemática dos grupos de forma cada vez mais concreta.

Vários questionamentos têm sido levantados com frequência em relação à filogenia de alguns grupos ao longo dos últimos anos (LIMA; MALABARBA; BUCKUP et al., 2003; ROSSINI et al., 2016; MIRANDE, 2018; PAZZA et al., 2018), as quais tem sido cada vez mais refinadas com o advento de novas ferramentas moleculares. Neste contexto, destaca-se o gênero *Psalidodon*, que foi criado por Eigenmann (1911) como um gênero monotípico para abrigar a espécie *Psalidodon gymnodontus*. Terán, Benitez e Mirande (2020), descrevem que *Psalidodon* apresenta um monofiletismo com suporte moderado. A monofilia do gênero está embasada em quatro sinapomorfias moleculares e duas sinapomorfias morfológicas, sendo estas: a presença de cinco ou mais cúspides tanto nos dentes da fileira do pré-maxilar, quanto nos do maxilar. A sobreposição parcial de caracteres morfológicos e a fragilidade monofilética foi utilizada por muitos autores como Malabarba (1998), Pavanelli & Britski (2003), Mirande (2009), e Pavanelli & Oliveira (2009) para propor uma redescrição da espécie tipo *P. gymnodontus* e sinonimização de *Psalidodon* com *Astyanax*. Nesse contexto, Terán, Benitez e Mirande (2020), analisando 520 caracteres morfológicos e dados de nove marcadores moleculares (12S, 16S, ATP6, COI, CYTB, MYH6, PTCHD1, RAG1 e RAG2) propõem a revalidação de *Psalidodon*, tornando-o válido. Adicionalmente, os mesmos autores expandem as extensões do gênero que passa a abarcar muitos táxons anteriormente alocados em *Astyanax*, como destaque para *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax fasciatus*.

### 3.2. Marcadores cromossômicos

O uso de corantes de caráter acidófilo para os análises de citogenética clássica proporcionou uma visão nítida das estruturas cromossômicas, permitindo o estudo de padrões e análises de diferentes parâmetros, como a contagem do número diploide ou o cálculo do número fundamental do cariótipo (MELO, 2009). Todavia, essas análises iniciais se mostram insuficientes para uma interpretação filogenética adequada, tornando necessário o uso de marcadores específicos que são capazes de proporcionar resultados comparativos mais refinados (SUMNER, 2003). Dentre as principais técnicas de marcação cromossômica mais avançadas, destacam-se o

Bandeamento C, a Impregnação por Nitrato de Prata (Ag-NOR), bem como a coloração por fluorocromos base-específicos e a Hibridização *in situ* (BENNETT; LEITCH, 1995).

A maioria dessas técnicas visa reagir com a heterocromatina constitutiva, uma porção específica do cromossomo na qual a cromatina está permanentemente condensada no ciclo celular com repetição tardia na fase S e com pouca ou nenhuma incidência de genes (MELO, 2009). Dessa forma, durante o Bandeamento C há um processo de corrosão nos cromossomos, o que gera a remoção parcial do material genético e de suas proteínas associadas, sobretudo das regiões eucromáticas, mantendo a região da heterocromatina, que por sua vez é mais resistente, gerando um padrão de destaque de blocos heterocromáticos (SUMNER, 2003).

As Regiões Organizadoras de Nucléolo ou NORs (do inglês, *Nucleolus Organizer Regions*) são caracterizadas por regiões cromossômicas específicas que apresentam cópias em *tandem* dos genes 8S, 18S e 26S de rDNA (do inglês, *Ribosomal DeoxyriboNucleic Acid*, ou ácido desoxirribonucleico ribossomal) responsáveis por codificar o RNA (do inglês *RiboNucleic Acid*, ou ácido ribossômico), ribossômico. Esses segmentos estão frequentemente presentes em regiões de constricção secundária de cromossomos profásicos e metafásicos, com a função específica de formar os nucléolos (SUMNER, 2003).

A técnica de Impregnação por Nitrato de Prata (Ag-NOR) permite então evidenciar as NORs funcionais, indicando posição e número dos DNA ribossomais (ZURITA et al., 1997). Essas investigações permitem diferenciações cromossômicas intra e inter-específicas e, além disso, funcionam como ferramenta para determinação de padrões que podem auxiliar no esclarecimento de questões de ordem taxonômica (KLINKHARDT, 1998).

Apesar de eficiente, a técnica por Ag-NOR é limitada a marcar apenas NORs ativas no genoma alvo, de forma que em diversos casos, regiões ativas e inativas coexistem ao longo do material genético (SUMNER, 2003). Dessa forma, técnicas como a Hibridização *in situ* fluorescente (do inglês, *Fluorescence in situ hybridization - FISH*), permitem o mapeamento físico de sequências de DNA Repetitivo, independentemente se sejam ativos ou não (LÓPEZ-LEÓN et al., 1999).



Assim, técnicas como as de hibridização *in situ*, em que se permite identificar um ou mais locus cromossômico onde se está determinada sequência de DNA previamente clonada, se mostram como boas ferramentas para a localização de sequências específicas de DNA ou RNA celular. Com base nesta técnica é possível, por exemplo, realizar a determinação sexual, o mapeamento físico cromossômico, identificar estruturas e anomalias nos cromossomos, analisar fusões e evoluções cromossômicas e do genoma, bem como determinar a expressão gênica ou até mesmo identificar sequências virais no genoma, fornecendo suporte substancial para estudos filogenéticos e evolutivos (LEITCH et al., 1994).

### 3.4. Citogenética de *Psalidodon fasciatus*

A espécie *Psalidodon fasciatus*, alocada nos últimos anos no gênero *Astyanax*, no qual permaneceu por um longo período de tempo, foi recentemente redescrita e alocada dentro de *Psalidodon* após análises de taxonomia integrativa (associação de caracteres morfológicos com dados genéticos), como anteriormente relatado (TERÁN; BENITEZ; MIRANDE, 2020). Essa espécie tem sido frequentemente reportada em diversos sistemas hidrográficos brasileiros, de forma que sua ampla distribuição associada à uma grande diversidade de preferências biológicas, como variação de habitats, alimentação e comportamentos podem intensificar processos evolutivos na espécie (KAVALCO et al., 2016; BERTACO; GARUTTI, 2007; BUCKUP et al., 2007; LIMA et al., 2003).

As análises cromossômicas em *Psalidodon fasciatus* (citado como *A. fasciatus*) têm indicado que as populações encontradas na região de base do Alto Rio Paraná podem possivelmente apresentar um grupo mais diversificado de espécies, todavia, são frequentemente classificados dentro do mesmo táxon (PAZZA; KOVALCO; BERTOLLO, 2006; TEIXEIRA; VENERE; FERREIRA et al., 2018; JAVONILLO et al. 2010; MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al. 2011; PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2008; ARTONI; SHIBATTA; GROSS, 2004; ROSSINI et al., 2016; PAZZA et al., 2018; MIRANDE et al., 2018). Assim, muitas espécies tem sido descritas erroneamente, com

sinonímias ou refletindo estimativas de diversidade pouco precisas dentro do grupo (MIRANDE; KOERBER, 2015; GAVAZZONI; PAVANELLI; GRAÇA et al., 2020).

A espécie *P. fasciatus* tem apresentado a maior diversidade cariotípica dentro do gênero, com o número diplóide variando entre  $2n=45$  em populações relatadas por Pazza et al. (2006) no Rio Mogi-Guaçu, próximo a confluência com o Rio Pardo em Barrinha-SP, até  $2n=50$  relatados na região do Alto Rio Tibagi (ARTONI et al., 2006), sendo mais frequente entre  $2n = 46$  e  $48$ , dos quais observa-se a prevalência em populações do número diploide  $2n = 48$  (PAZZA et al., 2006; MEDRADO et al., 2008; citado como *A. fasciatus*). Diversas espécies do gênero já foram consideradas como sendo uma subespécie de *P. fasciatus* (citado como *A. fasciatus*) segundo Kavalco, Pazza, Brandão et al. (2016), como ocorreu em *A. mexicanus*.

Em populações de diferentes pontos da bacia do Alto Rio Paraná, Pazza et al. (2015) observaram um número diplóide  $2n=46$ . Todavia, a presença de  $2n=50$  na mesma espécie no Rio Tibagi, um afluente também do Alto Rio Paraná, observado por Artoni et al. (2006), levantam a possibilidade de ocorrência de especiação alopátrica entre as populações, processo que leva ao surgimento de uma nova espécie e pode ocorrer em consequência de uma barreira geográfica (YANO; MOREIRA FILHO; MARGARIDO, 2014).

Populações analisadas por Pazza (2006), provenientes do Rio Mogi-Guaçu, apresentaram  $2n$  variando entre 45 a 48 cromossomos, podendo indicar a ocorrência de um processo de especiação simpátrica.

De acordo com Yano, Moreira Filho e Margarido (2014), algumas hipóteses tem sido formuladas para explicar a especiação de algumas espécies, tais como os fatores abióticos, como a sazonalidade, diferenças nos fluxos hídricos, diferenças químicas na água, ordem e largura média de canais, entre outros; e em fatores bióticos, como competição entre espécies.

Com relação ao padrão de distribuição heterocromático, Pazza, Kavalco, Bertollo et al. (2006) em populações desta espécie coletadas no Rio Mogi-Guaçu, evidenciaram marcações pericentroméricas em diversos cromossomos, bem como blocos terminais mais conspícuos na maioria dos cromossomos do complemento, usualmente relacionados com as Regiões Organizadoras de Nucléolos. Em

contrapartida, Kavalco et al. (2016) encontraram marcações heterocromáticas conspícuas nas regiões pericentroméricas na maioria dos cromossomos, em alguns casos com marcações somente em alguns cromossomos. Gavazzoni et al. (2020) ao analisarem populações de *P. fasciatus* (citado como complexo de espécie *A. fasciatus*) da bacia do rio Uruguai encontraram marcações heterocromáticas centroméricas na maioria dos cromossomos e marcações terminais coincidentes com as NORs.

Com relação às Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs), Pazza, Kavalco, Bertollo et al. (2006) evidenciaram NORs múltiplas com até 8 marcações, sendo estas mais frequentemente observadas em 2 pares cromossômicos submetacêntricos com sítios ribossômicos na região subterminal do braço curto. Kavalco et al. (2016), também encontraram sítios ativos múltiplos, entretanto as marcações mais frequentes encontravam-se na região subterminal do braço curto de um par subtelocêntrico.

Populações de *P. fasciatus* (citado como *A. fasciatus*) de diversas regiões foram analisadas por Yano et al. (2014) em uma população do Rio Pindorama as marcações por nitrato de prata evidenciaram NORs ativas na região terminal do braço longo de dois cromossomos submetacêntricos, em um cromossomo subtelocêntrico e no braço curto de dois cromossomos - um subtelocêntrico e um acrocêntrico. Em populações do Rio Lopei, as NORs foram evidenciadas na região terminal do braço longo de um submetacêntrico e um acrocêntrico, bem como no braço curto de um metacêntrico, um subtelocêntrico e de um cromossomo subtelocêntrico.

Em contrapartida, populações analisadas por Gavazzoni et al. (2020), apresentaram marcações em apenas um par na posição terminal do braço curto do cromossomo subtelocêntrico, confirmado pela FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) com sonda de rDNA 18S. Medrado et al. (2008), ao analisarem populações de Bacias dos rios de Contas e Recôncavo Sul - Bahia, observaram que os sítios ativos de NORs estavam localizados predominantemente na região do braço longo de cromossomos subtelocêntricos, com algumas poucas marcações no braço curto de um pequeno par de cromossomos submetacêntricos, além de esporadicamente em cromossomos metacêntricos. Pazza et al. (2015), ao analisarem populações provenientes da bacia hidrográfica do rio Paranaíba, com a impregnação por nitrato de prata, encontraram

marcações evidentes na posição distal do braço curto de um par de cromossomos, intercalados com heterocromatina. Esse padrão tem sido descrito com frequência em amostras da bacia do Rio Paraná (PAZZA et al., 2006; ARTONI et al., 2006; KAVALCO et al., 2013).

Por fim, é notável, como supracitado, que há uma evidente diversidade cariotípica, representada pela variação do número diploide, padrões de distribuição heterocromático e variação numérica / posicional das Ag-NORS (ALVES; MARTINS-SANTOS, 2002; PAZZA et al., 2006, 2008, 2010; ARTONI et al., 2006, KAVALCO, 2016), que pode indicar a presença de um complexo de espécies.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Exemplos e Pontos Amostrados

Foram coletados 16 espécimes (6 machos e 10 fêmeas) de *Psalidodon aff. fasciatus* (Figura 1) com auxílio peneiras, rede de arrasto e tarrafas em um ponto de coleta localizado no município de Santa Helena, estado do Paraná (24°54'47,91"S 54°17'35,82"W) (Figuras 2 e 3), - Licença permanente SISBIO 38532, no período compreendido entre Setembro à Novembro de 2021. Imediatamente após a coleta os exemplares foram levados vivos, sob adequada condição de temperatura e oxigenação, para o Laboratório de Ictiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Santa Helena e mantidos em aquários aquecidos e aerados. Posteriormente, os exemplares foram eutanasiados por overdose de óleo de cravo na concentração de 100mg/L (GRIFFITHS, 2000), conforme aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA (Protocolo nº 2021/13), com o objetivo de se obter a suspensão celular para as preparações citogenéticas.

Os exemplares analisados no presente trabalho foram encaminhados para o Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), para precisa identificação e tombamento.

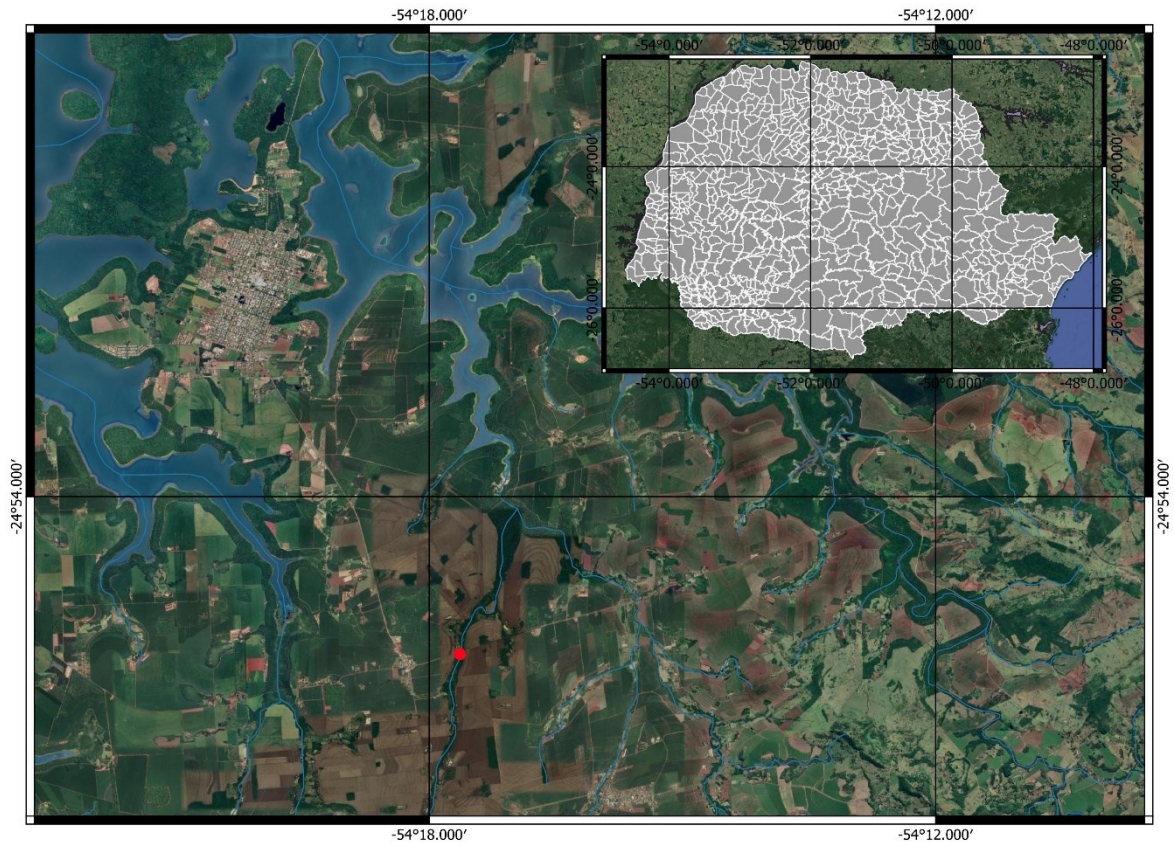
Para cada um dos 16 indivíduos analisados, foram preparadas lâminas de suspensão celular, das quais foram selecionadas 20 metáfases de cada espécime para as análises cromossômicas, totalizando 320 metáfases analisadas ao longo do presente estudo.

**Figura 1** - Exemplar de *Psalidodon aff. fasciatus*. Comprimento total = 8 cm.



Fonte: Autoria própria, 2021.

**Figura 2** - Localização do ponto de coleta.



Fonte: Autoria Própria, 2021.

**Figura 3** - Coleta de exemplares de *Psalidodon fasciatus*.



Fonte: Aatoria Própria, 2021.

#### **4.2. Preparação e obtenção de cromossomos mitóticos**

Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica adaptada por Foresti et al. (1993), que consiste na obtenção de metáfases mitóticas a partir de fragmentos do rim, uma vez que este possui função hematopoiética. Este foi colocado em 10 mL de solução salina de *Hanks* (RPMI), na qual o material foi bem dissociado. Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de *Pasteur*. Em seguida, foram adicionadas de 1 – 2 gotas de solução de Colchicina 0,016 %, sendo estas bem misturadas com o material. O mesmo foi então transferido para estufa a 36°C, por 30 minutos e posteriormente centrifugado durante 10 minutos, a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e em seguida, foi adicionado 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), misturando-se bem o material com uma pipeta *Pasteur*. Esse material foi então levado novamente para estufa a 36 °C, por mais 30 minutos. Na sequência, foram adicionadas cerca de 6 gotas de fixador (metanol e ácido acético,



em proporção de 3:1), misturando-as com o material repetidas vezes. O material passou por nova centrifugação por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado e, em seguida, adicionou-se 10 mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes, sendo novamente levado à centrífuga por mais 10 minutos a 1100 rpm. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes. Os materiais fixados foram devidamente acondicionados em microtubos específicos e armazenados em freezer para as devidas análises.

Para o desenvolvimento das análises foram seguidos os processos metodológicos, respectivamente:

#### **4.3. Preparo de lâminas**

Foram pingadas de 1 a 3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, deixando-a secar ao ar. A lâmina foi então corada com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH= 6,8 por 7 minutos.

#### **4.4. Análise Cariotípica (LEVAN et al., 1964)**

A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan et al. (1964) onde os cromossomos foram contados e organizados em ordem decrescente de tamanho e o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, dentro da seguinte proporção: RB = 1,00-1,70, metacêntrico (m); RB = 1,71-3,00, submetacêntrico (sm); RB = 3,01-7,00, subtelocêntrico (st); RB = maior que 7,00, acrocêntrico(a).

#### **4.5. Bandeamento C (SUMNER, 1972)**



Para determinar o padrão de distribuição da heterocromatina constituinte, foi utilizada a técnica de bandeamento C descrita por SUMNER (1972), que consiste em hidrolisar a lâmina com HCl 0,2N em banho maria a 42°C, por 8 a 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar. Passar por uma solução aquosa de Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O 5% a 42°C durante 1 minuto a 1 minuto e meio. Mergulhar a lâmina três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar. Incubar a lâmina em solução salina 2xSSC (pH=6.8) a 60°C por aproximadamente 30 minutos. Lavar a lâmina em água corrente, deixar secar ao ar. Por fim, corar com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O) pH 6.8 por aproximadamente 7 minutos.

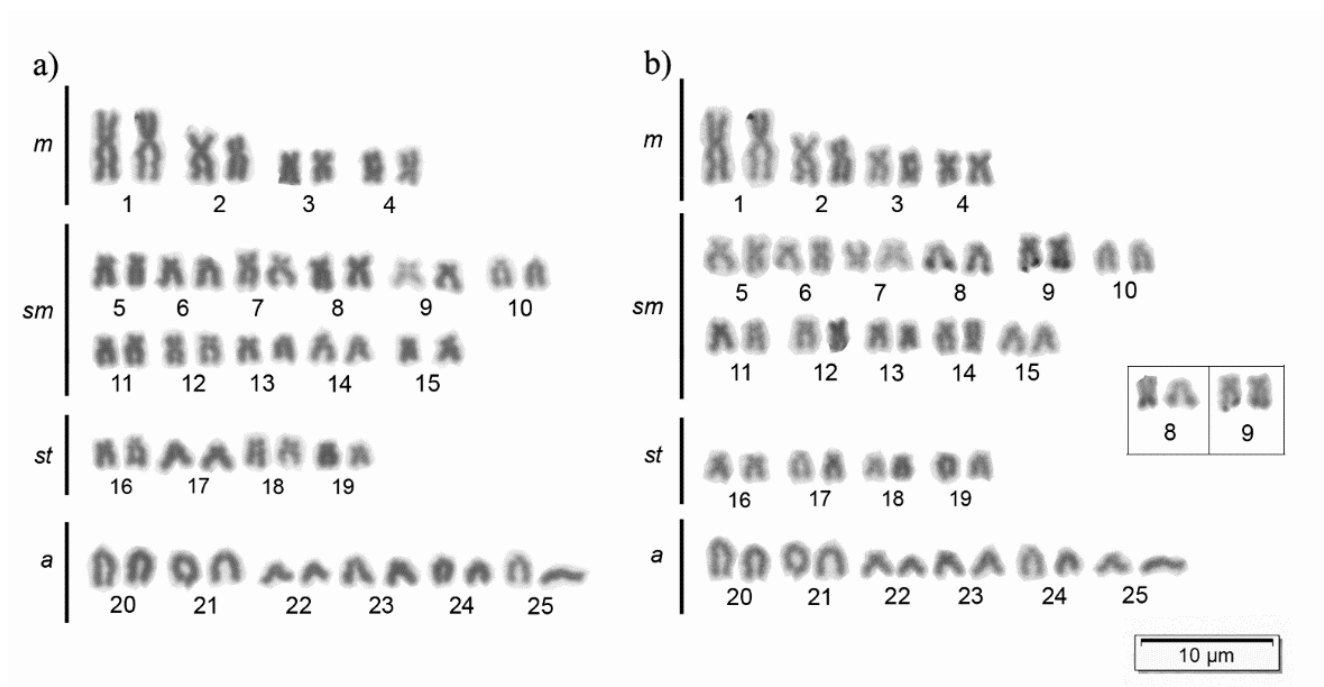
#### **4.6. Determinação das Ag-NORs (HOWELL; BLACK, 1980)**

Para a detecção das Ag-NORs, foi utilizado protocolo descrito por Howell e Black (1980), que consiste em colocar sobre uma lâmina previamente preparada 2-3 gotas de solução aquosa de gelatina (1g de gelatina incolor + 50 mL de H<sub>2</sub>O + 0,5 ml de ácido fórmico). Adicionar sobre cada gota de gelatina, 2 gotas de AgNO<sub>3</sub> 50% e 1 gota de água destilada. Cobrir com lamínula e colocar em estufa a 60°C durante 3-6 minutos. Deixar a lamínula escorrer debaixo de água corrente. Secar a lâmina, corar com Giemsa e observar ao microscópio.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O número diploide mais frequente encontrado nos espécimes analisados foi de  $2n=50$  cromossomos ( $8m+24sm+6st+12a$ , FN = 88), sendo este encontrado em 5 machos e em 8 fêmeas (Figura 4). É pertinente ressaltar que não foram identificadas diferenças na macroestrutura cariotípica entre os sexos, caracterizando ausência de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos. Foi observado que o primeiro par de cromossomos metacêntricos se destacam em tamanho em comparação com outros cromossomos do complemento, característica relativamente frequente e conservada dentro do grupo.

**Figura 4** - Cariótipos de *Psilidodon* aff. *fasciatus* com  $2n=50$  cromossomos (a) corado em Giemsa e (b) C-bandado. Ag-NORs em destaque (*in box*).

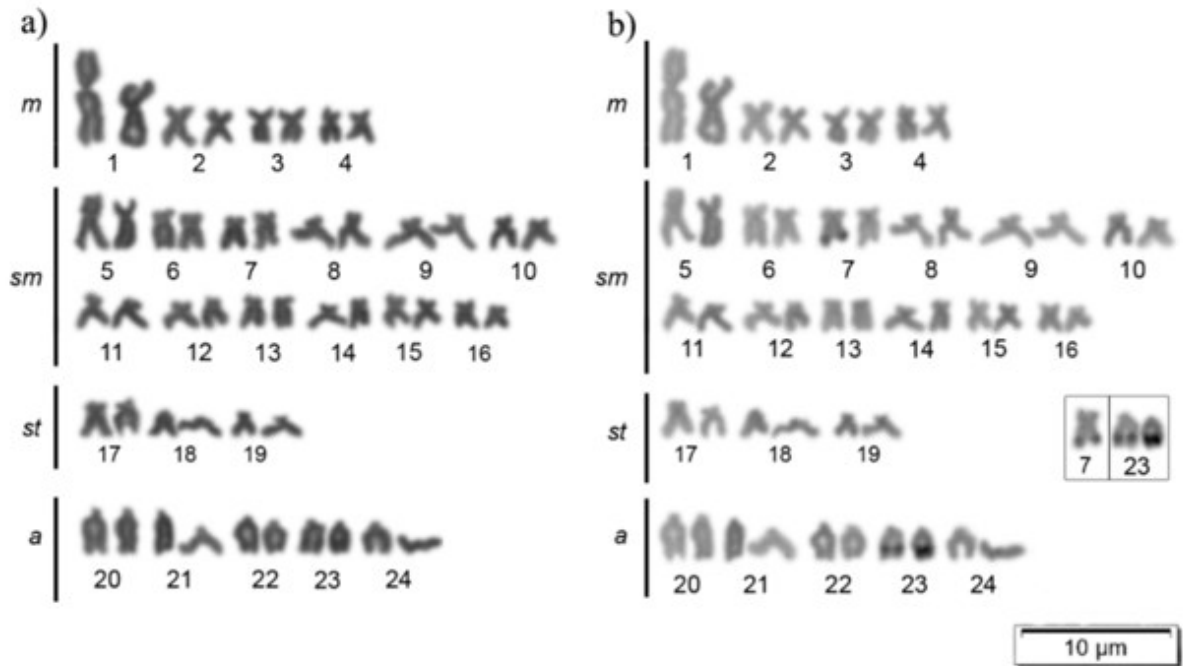


**Fonte:** Autoria Própria, 2021.

Em contrapartida, foi observado que em 3 exemplares, sendo 2 fêmeas e 1 macho, o número diplóide encontrado foi de  $2n=48$  cromossomos ( $8m+24sm+6st+10a$ , NF=86) (Figura 5), o que diverge da maioria dos indivíduos e

converge com as variações cariotípicas amplamente discutidas em outros estudos do grupo (ARTONI et al., 2004; PAZZA et al., 2006; MEDRADO et al., 2008; KAVALCO et al., 2013).

**Figura 5** - Cariótipos de *Psalidodon* aff. *fasciatus* com  $2n=48$  cromossomos (a) corado em Giemsa e (b) C-bandado. Ag-NORs em destaque (*in box*).



Fonte: Autoria Própria, 2021

A macroestrutura cariotípica dos cariomorfos encontrados ( $2n=48$  e  $2n=50$ ) apresentou-se conservada, ou seja, nenhuma variação cromossômica foi observada. Entretanto, além da divergência no número diploide entre os cariomorfos, foi observada variação na fórmula cariotípica e número fundamental (NF), em virtude da ausência de um par cromossômico acrocêntrico no cariomorfo com  $2n=48$ .

Adicionalmente, ao compararmos os cariomorfos aqui estudados, é evidente a divergência na distribuição de blocos heterocromáticos associados às regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs), sendo que no cariomorfo  $2n=50$  foram evidenciadas marcações nas regiões terminais dos pares cromossômicos submetacêntricos 8 e 9, enquanto que no cariomorfo  $2n=48$  foram observadas

marcações conspícuas na região terminal do par cromossômico acrocêntrico 23 e somente em um cromossomo do par submetacêntrico 7, também na posição terminal. A presença de um único cromossomo marcado no par cromossômico 7 possivelmente está relacionada ao evento de *crossing over* desigual.

Os marcadores aqui utilizados demonstram que há diferenças conspícuas entre os cariomorfos encontrados, evidenciando assim que possivelmente podemos ter duas unidades evolutivas distintas vivendo em sintopia e simpatria na região do presente estudo. A ausência de possíveis híbridos (provavelmente com  $2n=59$ ) pode ser um indicativo que esta divergência não é recente, entretanto não podemos destacar a possibilidade destes simplesmente não terem sido amostrados ou serem inviáveis.

Ambos os números diplóides encontrados nos cariomorfos analisados no presente trabalho ( $2n=48$  e  $2n=50$ ) já foram anteriormente observados, na bacia do Paraná, em populações de *P. fasciatus* provenientes das bacias dos rios Mogi-Guaçu (PAZZA et al. 2006), Tietê (KAVALCO et al. 2013), e no rio Tibagi (ARTONI et al. 2006).

Apesar de não ser o mais frequente, a distribuição do cariomorfo  $2n=50$  é ampla, sendo este cariomorfo encontrado em estudos realizados no Córrego Fundo por Centofante e Vênere (1995), no rio Paranapanema por Vale e Martins-Santos (1999), no Riacho Águas da Madalena por Ferreira-Neto et al. (2012), entre outros.

Como descrito anteriormente, o bandamento C dos exemplares analisados do cariomorfo  $2n=50$  evidenciou blocos de heterocromatina associados e intercalados às Ag-NORs na região terminal do braço longo dos pares cromossômicos submetacêntricos 8 e 9 (Figura 4). A ocorrência de Ag-NORs múltiplas é recorrente dentro do gênero, podendo ser considerada uma característica plesiomórfica (ROCON-STANGE, ALMEIDA-TOLEDO et al., 1993; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS et al., 1998; MANTOVANI et al., 2000; FERRO et al., 2001; KAVALCO, MOREIRA-FILHO et al., 2003).

Entretanto, apesar de possivelmente basal, há variações descritas para estas características. Um padrão com marcações de heterocromatina associadas às Ag-NORs em posição intersticial foi encontrado em populações com  $2n=50$  cromossomos

provenientes de Lagoa Dourada e do Rio Tibagi analisadas (ARTONI et al., 2006). Em contrapartida, Kavalco et al. (2016) analisando populações desse mesmo cariomorfo provenientes de Salesópolis (Alto rio Tietê) e Rio Mogi-Guaçu, identificaram Ag-NORs múltiplas alocadas no braço curto de um par subtelocêntrico em posições intersticiais.

Paralelamente, com relação ao cariomorfo com  $2n=48$ , este tem sido relatado com maior frequência em outros estudos cromossômicos envolvidos, como no rio Mogi Guaçu e no rio Tibagi por Artoni et al. (2006), no rio Piracicaba e no Córrego Águas da Madalena por Ferreira-Neto et al. (2012), no rio Paraíba por Heras e Moreira-Filho (1996), no rio Paiol Grande por Abel et al. (2006), no rio Araras e no rio São Francisco por Peres et al. (2008), no rio Contas, rio Mineiro do Costa e rio Preto do Costa por Medrado et al. (2008), dentre outros.

Em exemplares  $2n=48$  do rio Araras, Pazza et al. (2010) encontraram blocos heterocromáticos preferencialmente localizados nas regiões distais do braço longo de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos, bem como no braço curto de alguns outros cromossomos do complemento. Artoni et al. (2006) encontraram em exemplares deste mesmo cariomorfo provenientes do rio Tibagi, um padrão de distribuição heterocromático principalmente em blocos muito conspícuos na região terminal do braço longo de cromossomos acrocêntricos. Adicionalmente, nas análises de exemplares provenientes do Riacho Água da Madalena (FERREIRA-NETO et al., 2012), foi evidenciada uma marcação na região distal do braço curto e outra no braço longo de diferentes cromossomos. Como evidenciado nos trabalhos anteriormente relatados, assim como no presente estudo, a posição terminal das marcações heterocromáticas parece ser uma característica recorrente no grupo (JUSTI, 1993; HERAS, 1998; CENTOFANTE et al., 2003, PAZZA et al., 2008).

É provável que alguns dos espécimes coletados, como os pertencentes ao cariomorfo com  $2n=48$ , sejam originários de diferentes populações e teriam convergido para o mesmo local durante as variações de migrações e expansões territoriais da espécie, resultando nas variações citotípicas analisadas. Tal fato sugeriria que o cariomorfo  $2n=50$  possa se tratar de uma possível variante “nativa” da região analisada.

Neste caso, considerando *P. fasciatus*  $2n = 48$  como de fato um possível cariomorfo "não nativo", é possível inferir que uma plasticidade cariotípica proposta para esta espécie possa representar um fator positivo para o seu sucesso evolutivo, principalmente quando considerada a importância do rearranjo genômico e hibridização no processo invasivo (LEE, 2002).

De forma geral, a ocorrência simpátrica e sintópica de diferentes cariomorfos reforça a hipótese de que *P. fasciatus* pode representar um grupo de espécies atualmente colocadas sob uma única designação comum, ou seja, um complexo de espécies.

Esta hipótese tem sido amplamente considerada (JUSTI, 1993; GARUTTI, BRITSKI, 2000; MELO, 2001; CENTOFANTE et al., 2003). Inclusive, populações que apresentam cariótipos com o mesmo número diplóide também podem apresentar algumas diferenças na fórmula cariotípica (JUSTI, 1993; HERAS, 1998). Assim, os cariomorfos com  $2n=48$  cromossomos podem representar espécies distintas neste grupo, ou pelo menos populações de *P. fasciatus* cromossomicamente distintas, mantendo relativo potencial de cruzamento. Por fim, as variações cariotípicas estudadas apontam ou para possíveis formas híbridas viáveis correlacionadas ou para o fato de que se tratam de espécies diferentes dentro do mesmo táxon.

É importante considerar que o papel dos rearranjos cromossômicos na especiação já foi amplamente discutido (RIESEBERG, 2001; ROCKMAN & ROWELL, 2002; NAVARRO & BARTON, 2003), e alguns trabalhos já correlacionam a evolução do cariótipo com a filogenia derivada de sequências de DNA (WANG & LAN, 2000; GARCÍA et al., 2001; SHIMABUKURO-DIAS et al., 2004). Modelos clássicos de especiação cromossômica inferem que, uma vez que os indivíduos híbridos são parcialmente estéreis, as alterações cromossômicas podem atuar como barreiras ao fluxo gênico entre as populações e facilitar o isolamento reprodutivo, gerando possíveis novas espécies.

Em suma, *Psalidodon* é amplamente distribuído em toda a América do Sul (NELSON, 2016) e suas espécies habitam ambientes lênticos e lóticos ou até mesmo restritos às cabeceiras de riachos inóspitos para outros peixes. Possivelmente, essa alta capacidade de dispersão adicionada ao isolamento geográfico deve representar

condições de extrema importância para a diversidade que tem sido relatada para este grupo.

## 6. CONCLUSÕES

Os espécimes analisados no presente estudo, embora identificados morfológicamente como *Psolidodon aff. fasciatus*, apresentaram divergências cromossômicas consideráveis (número diploide, NF, Ag-NORs e Bandamento C) quando comparadas entre si e com demais populações estudadas disponíveis na literatura, podendo ser separados em dois cariomorfos distintos. Adicionalmente, tal variação cromossômica sugere possível isolamento reprodutivo, reforçando a hipótese de *P. fasciatus* se tratar de um complexo de espécies.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho reforçam a hipótese sugerida anteriormente de que as populações encontradas na região de base do Alto Rio Paraná podem apresentar um grupo mais diversificado de espécies, todavia, tem sido frequentemente classificados dentro do mesmo táxon.

A espécie *P. fasciatus* apresenta uma grande diversidade cariotípica e alta plasticidade cromossômica, com mais de um cariomorfo descrito, indicando que se trate de um táxon polifilético. Os espécimes analisados neste trabalho, embora sejam classificados unicamente como *P. fasciatus*, mostram evidências citogenéticas de serem unidades taxonômicas distintas. Portanto, os resultados apresentados aqui fomentam a relevância da taxonomia integrativa para os estudos evolutivos, uma vez que podem ser usados em estudos futuros para a resolução de questionamentos taxonômicos, assim como ressaltam a eficiência de análises cromossômicas como ferramenta para estas problemáticas.



## REFERÊNCIAS

ABEL, L. D. S.; M. MANTOVANI, MOREIRA-FILHO, O. 2006. **Chromosomal distribution of the As-51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. *Genetics and Molecular Biology* 29: 448-452.

ALVES, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C. **Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) with 2n = 48 chromosomes**. *Cytologia*. v. 67, p. 117-122. 2002.

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, p. 197-202. 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, p. 197-202. 2006.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. **Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas.** Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences. 2000.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. **Nuclear DNA amounts in Angiosperms.** *Annals of Botany*. v. 76, p. 113-176, 1995.

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.

BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B.; GALETTI JR., P. M.; MOREIRA-FILHO, O. **Contributions to the cytogenetics of the Neotropical fish fauna.** *Comparative Cytogenetics*. v. 11, p. 665-690. 2017.

BORŮVKOVÁ, V.; HOWELL, W. M.; MATOULEK, D. SYMONOVÁ, R. **Quantitative Approach to Fish Cytogenetics in the Context of Vertebrate Genome Evolution.** Maryland: Genes (Basel). v.12, n. 12, p. 312. 2021.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco).** Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF. ed. 3. 1988.  
BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil.** Rio de Janeiro: Museu Nacional. 2007.

CASTRO, R. M. C.; **Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais..** *Ecologia de peixes de riachos*. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, v. 5, p.139-155. 1999.

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

CENTOFANTE, L.; VÊNERE, P.C. **Descrição dos cariótipos e das RONS de três espécies de peixes do gênero *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) do Médio Araguaia.** *Anais do 41º Congresso Nacional de Genética*, pp. 455. 1995.

DAHDUL, W. M. **REVIEW OF THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AND FOSSIL RECORD OF CHARACIFORMES.** In: GRANDE, T. C.; POYATO-ARÍZA, F. J.; DIOGO, R. *Gonorynchiform and Ostariophysan Relationships, a comprehensive Review.* New Hampshire: Science Publishers, p. 441-446. 2010.

DOBZHANSKY, T. **Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution**. The American Biology Teacher, 35(3), 125–129. 1973.

EIGENMANN, C. H. **New characins in the collection of the Carnegie Museum**. Pittsburgh: Annals of the Carnegie Museum, v. 8. p. 164-181. 1911.

FERREIRA-NETO, M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R., MOREIRA-FILHO, O., et al. **Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations**. CompCytogen 6(1): 29–40. 2012.

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

FORESTI, F., C. OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.. **A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine**. Cellular and Molecular Life Sciences. v. 49. p. 810-813. 1993.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; R. VAN DER LAAN. **Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References**. 2021. Disponível em < <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> >. Acesso em: 20 jun. 2021.

GARCÍA G, LALANNE A. I, AGUIRRE G, CAPPETTA M. **Chromosome evolution in the annual killifish genus *Cynolebias* and mitochondrial phylogenetic analysis**. Chromosome Res 9: 437–448. 2001.

GARUTTI V, BRITSKI H. A. **Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do Alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia**. Comun Mus Ciênc PUCRS 13: 65–88. 2000.  
GAVAZZONI, M.; PAVANELLI, C. S.; GRAÇA, W. J.; MELO, B. F.; GUBIANI, E. A.; MARGARIDO, V. P.. **Detection of natural hybridization and delimitation of two closely related operational taxonomic units of the *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characidae) complex through integrative approaches**. Biological Journal of the Linnean Society. v. 129, p. 687–700. 2020.

GRIFFITHS, S. P. **The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes**. Journal of Fish Biology. v. 57, p. 1453-1464. 2000.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara – RJ. 1988.

HERAS M. P. **Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de rios do Brasil**. MSc Dissertation, Universidade Federal de São Carlos. 1998.

HERAS, M. P. ; MOREIRA FILHO, O. **Novos Dados Sobre A Variabilidade Cariotípica de *Astyanax Fasciatus* (Cuvier 1819) (Pisces, Characidae)**. In: VI Simposio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotrópicos, São Carlos. VI Simposio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotrópicos. São Carlos-SP.: UFSCar. p. 10-10. 1996.

HOFFMANN, A. A., RIESEBERG, L. H. **Revisiting the impact of inversions in evolution: From population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation?** Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 39, p. 21–42. 2008.

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

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R. WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. **Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on molecular sequence data.** Molecular Phylogeny and Evolution. v. 58, p. 498-511. 2010.

JUSTI, A. J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas.** MSc Dissertation, Universidade Federal de São Carlos. 1993.

KAVALCO, K. F., PAZZA, R.; BRANDÃO, K. O.; GARCIA, C.; BERTOLLO, L. A. C.; et al. **Chromosomal Diversification Higher Than Molecular Variation in *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characidae).** ZEBRAFISH. v. 13, n. 4. 2016.

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

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes).** Organisms Diversity & Evolution. v. 13, p. 67–76. 2013.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. O.; GARCIA, C.; BERTOLLO, L. A. C. **Chromosomal Diversification Higher Than Molecular Variation in *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characidae).** ZEBRAFISH. v. 13, n. 4, 2016.

KLINKHARDT, M. B. **Some Aspects of Karyoevolution In Fishes.** Animal Research Development. v. 47, p. 7-36, 1998.

LEE, C. E. **Evolutionary genetics of invasive species**. Trends Ecol Evol 17: 386–391. 2002.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T; JACKSON, D. LEITCH, I. J. **In Situ Hybridization: a practical guide**. p. 1-3, 1994.

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

LIMA, F. C. T.; MALABARBA L. R.; BUCKUP P. A.; SILVA J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F.. **Genera Incertae Sedis in Characidae**. In: REIS, R. E.; KULLANDER S. O.; FERRARIS JR. C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 106-169. 2003.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. **Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris***. Chromosome Research. v. 7, p. 83-88. 1999.

MALABARBA, L. R. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.

MALABARBA, M. C.; MALABARBA, L. R. **Biogeography of Characiformes: An evaluation of the available information of fossil and extant taxa**. In: NELSON, J.S.; SCHULTZE, H. P.; WILSON, M. V. H. Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts. Munich: Verlag Dr. Friedrich Pfeil, p. 317-316. 2010.

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

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; et al. **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, C. A. F. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos**. Arq Mus Nac RJ 59: 1–46. 2001.

MIRANDE, J. M. **Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes)**. Cladistics. v. 35, p. 282–300. 2018.

- MIRANDE, J. M. **Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy.** *Neotropical Ichthyology* v. 8, p. 385–568. 2010.
- MIRANDE, J. M. **Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes).** *Cladistics*. v. 25. p. 574–613. 2009.
- MIRANDE, J. M.; KOERBER, S. **Checklist of the freshwater fishes of Argentina (CLOFFAR).** *Ichthyological Contributions of PecesCriollos*. v. 36, p. 1–68. 2015.
- MIZOGUCHI, S. M. H. N, MARTINS-SANTOS, I. C. **Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax 'scabripinnis'* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil.** *Genet Mol Biol* 21: 55–61. 1998.
- NAVARRO A., BARTON, N. H. **Chromosomal speciation and molecular divergence – accelerated evolution in rearranged chromosomes.** *Science* 300: 321–324. 2003.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world.** ed. 5. New Jersey: John Wiley and Sons. 2016.
- OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTÍ, G.; VARI, R. P.; CORRÊA E CASTRO, R. M. **Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling.** *BMC Evolutionary Biology*. v. 11, p. 275. 2011.
- PAVANELLI, C. S.; BRITSKI, H. A. ***Apareiodon eigenmann, 1916* (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with description of three new species.** *Ichthyology & Herpetology*. v.2. p. 337–348. 2003.
- PAVANELLI, S. C.; OLIVEIRA, C. A. O. **A redescription of *Astyanax gymnodontus* (Eigenmann, 1911), new combination, a polymorphic characid fish from rio Iguaçú basin, Brazil.** *Neotropical Ichthyology*. v. 7, n. 4, p. 569-578, 2009.
- PAZZA, R. **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE).** 2005. Dissertação (Doutorado em Genética e Evolução). Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2005.
- PAZZA, R.; ARGENTO, R. F. M.; MARIANO, I. H. S.; KAVALCO, K. F. **Phenotypic plasticity and karyotype conservation in allopatric populations of *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characiformes) at the Upper Parana river basin.** *Acta Zoologica (Stockholm)*, v. 97, p. 241–245. 2015.

- PAZZA, R.; DERGAM, J. A.; KAVALCO, K. F. **Trends in Karyotype Evolution in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes, Characidae):** Insights from Molecular Data. *Frontiers in Genetics*. v. 9. 2018.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. **Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms.** *Cytogenetic and Genome Research*. v. 112. p. 313-319. 2006.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. **Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 – Chromosomal location of a satellite DNA.** *Cytogenetic and Genome Research*. v. 122. 2008.
- PAZZA, R.; KAVALCO, S. A. F.; PENTEADO, P. R.; KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach.** *Journal of Fish Biology*. v. 72, p. 2002–2010. 2008.
- PERES W. A. M, BERTOLLO L. A. C, MOREIRA-FILHO, O. **Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes).** *Genetics and Molecular Biology* 31: 222–226. 2008.
- RÁB P; BOHLEN J; RÁBOVÁ M.; FLAJSHANS, M; KALOUS, L. **Cytogenetics as a tool in fish conservation: The present situation in Europe.** In: PISANO E.; OZOUF-COSTAZ C.; FORESTI F.; KAPOOR, B. G. *Fish Cytogenetics*. New Hampshire: Science Publishers. p 215-240. 2007.
- RAVI, V.; VENKATESH, B. **Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity.** *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 18, p. 544-550. 2008.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)**, Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 729. 2003.
- RICKLEFS, R. E.; **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. ed. 6. 2010.
- RIESEBERG, L. H. **Chromosomal rearrangements and speciation.** *Trends Ecol Evol* 16: 351–358. 2001.
- ROCKMAN, M. V, ROWELL, D. M. **Episodic chromosomal evolution in *Planipapillus* (Onychophora: Peripatopsidae): a phylogenetic approach to evolutionary dynamics and speciation.** *Evolution* 56: 58-69. 2002.

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

ROSSINI, B. C.; OLIVEIRA, C. A. M.; GONÇALVES DE MELO, F. A.; BERTACO, V. A.; ASTARLOA, J. M. D.; ROSSO, J. J. , FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. **Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding**. PLoS ONE, v. 11, n. 12, p. 1-20, 2016.

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

***Solanum L. (Solanaceae A. Juss)***. Dissertação de Mestrado (Melhoramento Genético). Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2009.

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

SUMNER, A. T. **CHROMOSOMES ORGANIZATION AND FUNCTION**. New Jersey: Blackwell Publishing Limited. p. 304. 2003

TEIXEIRA, T. K. S. S.; VENERE, P. C.; FERREIRA, D. C.; et al. **Comparative cytogenetics of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from the upper Paraguay basin**. Neotropical Ichthyology. v. 16. 2018.

TERÁN, G. E.; BENITEZ M. F.; MIRANDE, J. M. **Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae)**. Zoological Journal of the Linnean Society. v. 20. p. 1-18. 2020.

VALE, J. D.; MARTINS-SANTOS, I. C. **Análise citogenética em duas espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characiformes) da bacia do rio Paranapanema**. pp. 95. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., Gramado, RS, Genet. and Mol. Biol. 1999.

VARI, R. P.; MALABARBA L. R. **NEOTROPICAL ICHTYOLOGY: an overview**. In: MALABARBA L. R; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS; p.1-11. 1998.

VARI, R. P; MALABARBA, L. R. **Neotropical Ichthyology: An Overview**. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 603. 1998.

WANG W, LAN H. **Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny**. Mol Biol Evol 17: 1326–1333. 2000.



WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. B. **Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes)**. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Part 2 – Characiformes. UFRGS. Porto Alegre, RS. 1998.

WELLENREUTHER, M.; BERNATCHEZ, L. **Eco-evolutionary genomics of chromosomal inversions**. Trends in Ecology and Evolution, v. 33, p. 427-440. 2018.

YANO, C. F.; MOREIRA FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. **Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *Incertae Sedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil**. Versita: Section Zoology. v. 69, p. 790-798, 2014.

ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JÍMENEZ, R. DE LA GUARDIA, R. D. **Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridization**. HEREDITY. v. 78, p. 229-234. 1997.