

## DIVERSIDADE CARIOTÍPICA DE *Astyanax asuncionensis* (Teleostei, Characiformes) NA MICROBACIA DO RIO SEPOTUBA (ALTO PARAGUAI)

### Karyotypic diversity of *Astyanax asuncionensis* (Teleostei Characiformes) from Sepotuba river microbasin (Upper Paraguai basin)

Patrícia Giongo<sup>1,3\*</sup>, Wagner Martins Santana Sampaio<sup>1</sup>, Anderson Fernandes<sup>2</sup>, Jorge Abdala Dergam<sup>1</sup>, Karine Frehner Kavalco<sup>3</sup>, Rubens Pazza<sup>3</sup>

1. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal

2. Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Tangará da Serra

3. LaGEEvo – Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba

patricia\_giongo@yahoo.com.br

#### Resumo

Este trabalho teve por objetivo utilizar ferramentas da citogenética para estudar *A. asuncionensis* na microbacia do Sepotuba. Os espécimes foram coletados nos córregos São José e Bocaiuval e no Rio Sepotuba, na região de Tangará da Serra – Mato Grosso. A partir da coloração convencional foi possível observar a ocorrência de cinco citótipos. O citótipo A foi encontrado no Rio Sepotuba com número cromossômico  $2n=50$ , número fundamental (NF) igual a 94 e morfologia cromossômica de  $14m+10sm+18st+8a$ . No córrego São José, foram encontrados três citótipos, o citótipo B com  $2n=50$ ,  $4m+20sm+14st+12a$  e  $NF=88$ , o citótipo C com  $2n=50$ ,  $26m+14sm+22st+8a$  e  $NF=92$ , e o citótipo D com  $2n=48$ ,  $6m+10sm+16st+16a$  e  $NF=80$ . O citótipo E do córrego Bocaiuval apresentou  $2n=50$ ,  $6m+10sm+20st+14a$  e  $NF=86$ . A impregnação com nitrato de prata revelou marcações simples nas regiões teloméricas dos cromossomos submetacêntricos e o bandamento C evidenciou regiões heterocromáticas nas regiões teloméricas, centroméricas e pericentroméricas. Os resultados evidenciam uma variação interpopulacional da macroestrutura cariotípica em *Astyanax asuncionensis*.

**Palavras-chave:** *Astyanax asuncionensis*, Alto Paraguai, citogenética.

#### Abstract

This study aimed to use cytogenetic tools to study *A. asuncionensis* from Sepotuba microbasin. The specimens were collected in Bocaiuval and São José Streams and in Sepotuba River, in Tangará da Serra-Mato Grosso region. Based on conventional staining, it was possible to determine the occurrence of five cytotypes. The cytotype A was detected in Sepotuba River with presented chromosome number  $2n=50$ , fundamental number (FN) equal to 94 and karyotypic morphology of  $14m +10sm +18st +8a$ . In São José stream, three cytotypes were observed, the cytotype B with  $2n=50$ ,  $4m+20sm+12st+14a$  and  $FN=88$ , the cytotype C with  $2n=50$ ,  $6m+14sm+22st+8a$  and  $FN=92$ , the cytotype D with  $2n=48$ ,  $6m+10sm+16st +16a$  and  $FN=80$ . The cytotype E found in Bocaiuval stream presented  $2n=50$ ,  $6m+10sm+20st+14a$  and  $FN=86$ . The silver nitrate staining revealed single nucleolus organizer regions at telomeric regions of submetacentric chromosomes, and C-banding showed heterochromatic sites at telomeric, centromeric and pericentromeric regions. The results show an interpopulational variation of the karyotype macrostructure in *Astyanax asuncionensis*.

**Key words:** *Astyanax asuncionensis*, Alto Paraguai, cytogenetics.

## Introdução

O gênero *Astyanax* inclui peixes de pequeno porte de até 200mm, vulgarmente conhecido como lambaris, e comuns nas bacias hidrográficas neotropicais (Garutti, 1998). As últimas revisões registram cerca de 100 espécies nas águas continentais brasileiras para o gênero *Astyanax*, com a posição indeterminada (*Incertae sedis*) dentro da família Characidae (Lima *et al.*, 2003; Bertaco e Garutti, 2007).

O gênero *Astyanax* revela espécies morfológicamente muito semelhantes e com grande variabilidade cariotípica dentro da mesma bacia, formando um grupo altamente complexo ao nível taxonômico e citogenético. Este fato fez com que alguns autores enquadrassem algumas espécies desse gênero como um complexo de espécies, pois esse conceito suportaria essas variações. Assim, complexos dentro do gênero *Astyanax* foram determinados para *A. scabripinnis*, *A. bimaculatus*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. hastatus* e outras espécies do gênero (Moreira-Filho e Bertollo, 1991, Fernandes e Martins-Santos, 2004; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Pazza e Kavalco, 2007; Pazza *et al.*, 2008; Medrado *et al.*, 2008; Kavalco *et al.*, 2009a). Dessa forma, os estudos citotaxonômicos no gênero vem contribuindo de forma substancial no entendimento das questões genéticas e evolutivas envolvidas na diferenciação cromossômica do grupo (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Oliveira *et al.*, 2009a).

Estudos citogenéticos para o gênero *Astyanax* evidenciam uma diversidade cariotípica de  $2n=36$  em *Astyanax schubarti* (Daniel-Silva e Almeida Toledo, 2001, 2005) a  $2n=50$  em *Astyanax scabripinnis*, *A. bockmani*, *A. altiparanae* e *A. fasciatus* (Oliveira *et al.*, 1988; Souza e Moreira-Filho, 1995; Artoni *et al.*, 2006; Kavalco *et al.*, 2009b; Ferreira-Neto *et al.*, 2009) com morfologia cromossômica e padrões de bandamento diversificados.

Os estudos citogenéticos realizados por Troy (2004) para espécie *A. asuncionensis* na Micro-bacia do rio Cuiabá (bacia do Paraguai) na região de Chapada

do Guimarães, de Cáceres e de Cuiabá demonstram uma conservação da estrutura cariotípica com número diplóide  $2n=50$ , sendo a fórmula cariotípica igual a  $14m+18sm+12st + 6ae$   $N F=94$ . Porém, Oliveira (2009b), em suas revisões, registra variações no número cromossômico ( $2n=48$ ) e na Fórmula Cariotípica para a *A. asuncionensis* no rio Miranda em Mato Grosso do Sul (Bacia do Paraguai).

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar citogeneticamente *A. asuncionensis* a fim de entender a diversidade cromossômica encontrada no gênero.

## Material e Métodos

Foram coletados 50 espécimes de *A. asuncionensis* (13 machos e 37 fêmeas) na microbacia do Rio Sepotuba (rio Sepotuba, córrego São José e córrego Bocaíval), no município de Tangará da Serra, Mato Grosso (Fig. 1). A metodologia utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o protocolo proposto por Bertollo e colaboradores (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 cariótipos foram montados com auxílio de softwares de análise de imagem e a morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a razão de braços (RB) proposta por Levan *et al.* (1964).

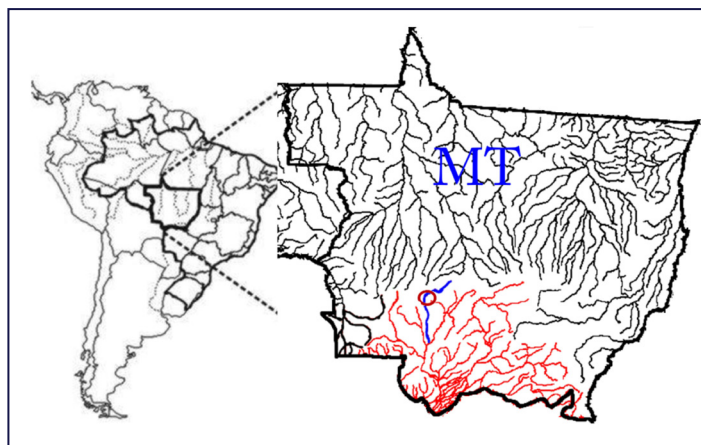


Fig. 1: Área de estudo de *A. asuncionensis*: em preto, bacia Amazônica; em vermelho, bacia do Paraguai Paraná; em azul, microbacia do Sepotuba; círculo vermelho, área de estudo na região de Tangará da Serra.

Ponto de coleta	2n	NF	Morfologia	NORs	Heterocromatina	Citótipo
<b>Cromossômica</b>						
Rio Sepotuba	50	94	14m+10sm+18st+8a	2	T-BL	A
Córrego São José	50	88	4m+20sm+14st+12a	2	T-BC, T-BL	B
Córrego São José	50	92	6m+14sm+22st+8a	2	C, P-BC, BL	C
Córrego São José	48	80	6m+10sm+16st+16a	1	C, T-BC, BL	D
Córrego Bocauiual	50	86	6m+10sm+20st+14a	2	-	E

**Tabela 01: Resultados obtidos com técnicas citogenéticas aplicada para *Astyanax asuncionenses*. T: Telomérica, C: Centromérica, P: Pericentromérica, BC: Braço Curto e BL: Braço Longo.**

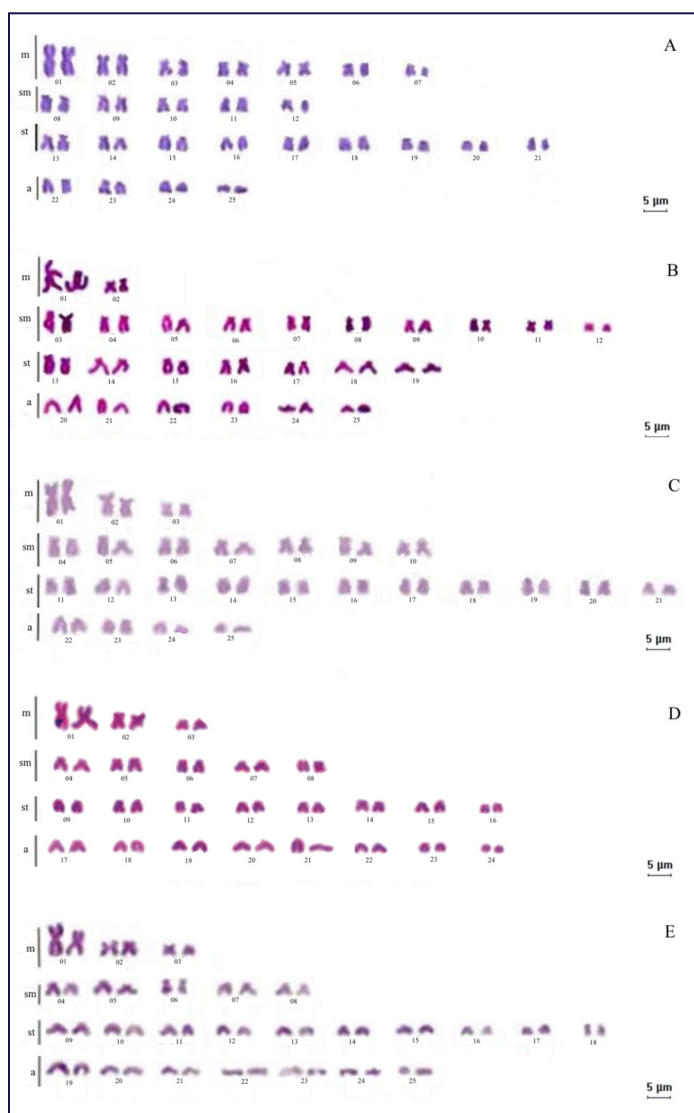
## Resultados

Os resultados mostram a ocorrência de cinco citótipos em *Astyanax asuncionenses* da microbacia do rio Sepotuba (Tabela 1 e Fig. 2).

Para o Rio Sepotuba foi encontrado o citótipo A com número cromossômico  $2n=50$ , sendo a fórmula cariotípica igual a  $14m+10sm+18st+8a$  e  $NF=94$  (Fig. 2a). Para o córrego São José foram encontrados 3 citótipos (B, C, D). O citótipo B apresenta  $2n=50$  ( $4m+20sm+14st+12a$  e  $NF=88$ ), o citótipo C com  $2n=50$  ( $6m+14sm+22st+8a$  e  $NF=92$ ) e o citótipo D  $2n=48$  ( $6m+10sm+16st+16a$  e  $NF=80$ ) (Fig. 2b,c,d). Para o Córrego Bocauiual foi encontrado apenas um citótipo (citótipo E) com  $2n=50$  ( $6m+10sm+20st+14a$  e  $NF=86$ ) (Fig. 2e).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) reveladas pelo nitrato de prata mostraram para os espécimes dos citótipos B e D, marcações na região terminal do braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos. Para o citótipo E marcações Ag-RONs terminais no braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos marcados (Fig.3).

Os resultados encontrados para Banda C mostram padrões de heterocromatina para o citótipo A distribuídas nas regiões terminais do braço longo de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos (Fig. 4a). Para os citótipos B, C e D as regiões heterocromáticas se encontram nas regiões centroméricas, pericentroméricas e terminais tanto no braço longo como no braço curto de cromossomos submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos (Fig. 4b,c,d). Para o Citótipo E não foram observados resultados significativos.



**Fig. 2: Cariótipos de *Astyanax asuncionenses* da microbacia do Sepotuba: 2a) Citótipo A, Rio Sepotuba; 2b) Citótipo B, Corrego São José; 2c) Citótipo C, Córrego São José; 2d) Citótipo D, Córrego São José; 2e) Citótipo E, Córrego Bocauiual.**

## Discussão e Conclusões

Os resultados quanto ao número cromossômico, morfologia cromossômica e Número Fundamental (NF), estão dentro da variação esperada para o gênero *Astyanax* de  $2n=36$  à  $2n=50$  (Oliveira *et al.*, 1988; Oliveira, 2009b). Os citótipos A, B, C e E conservaram





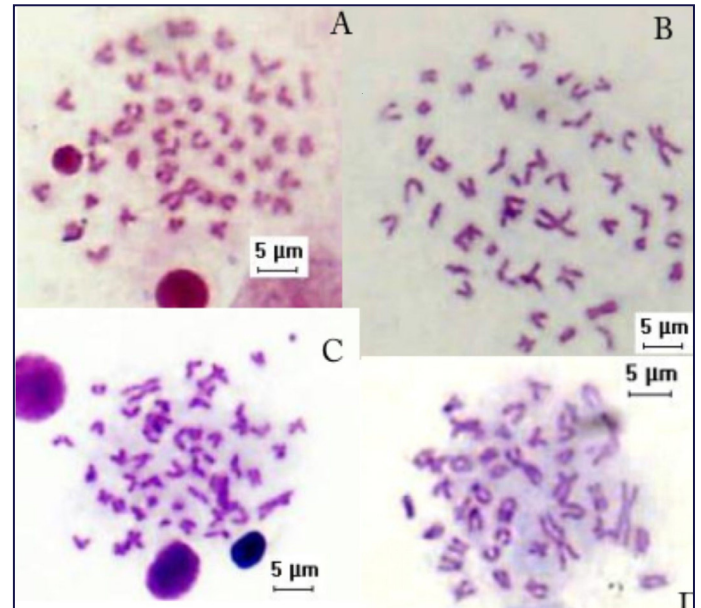
**Fig. 3:** Ag-RONs em *Astyanax asuncionensis*: 3A), Citótipo B, Córrego São José; 3B), Citótipo D, Córrego São José; 3C) Citótipo E, Córrego Bocaiuva.

$2n=50$  corroborando estudos feitos em outros rios brasileiros (Martínez *et al.*, 2012). O citótipo D apresentou  $2n=48$ , sendo encontrado, para esta espécie, apenas por Carvalho *et al.* (2002) também em um rio sul mato-grossense (Bacia do Paraguai). Essa diferença do número cromossômico pode ser consequência de rearranjos cromossômicos do tipo fusão ou fissão.

Os dados obtidos para os espécimes do citótipo A são muito semelhantes aos encontrados em outros estudos para o complexo “bimaculatus” em outras bacias (Kavalco *et al.*, 2009; Kavalco *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2012). Porém, os resultados encontrados nos córregos São José e Bocaiuva (Citótipos B, C e E) divergem na morfologia cromossômica e NF, mas mantêm seus números diplóides constantes, indicando que inversões pericêntricas podem ter desempenhado um papel importante na evolução cromossômica.

Neste estudo, um sistema de RONS simples foi encontrado em todos os citótipos. Embora o RON simples esteja dentro dos padrões já encontrados para o grupo (Kavalco *et al.*, 2009; Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Kavalco *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2012), sistema RONS múltiplas são mais comum ao gênero *Astyanax* (Domingues *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008; Ferreira-Neto, 2009; Ferreira-Neto *et al.*, 2012). O padrão de bandas heterocromáticas encontrado no presente trabalho corroboram outros estudos para o complexo “bimaculatus” (Kavalco *et al.*, 2009; Neto *et al.*, 2009; Kavalco *et al.*, 2011, Martínez *et al.*, 2012 ).

Os resultados evidenciam uma variação cariotípica interpopulacional em *Astyanax asuncionensis*, situação comum para o gênero (Domingues *et al.*, 2007; Kavalco *et al.*, 2009; Neto *et al.*, 2009; Kavalco *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2011,



**Fig. 4:** Distribuição de heterocromatina em *Astyanax asuncionensis* da microbacia do Sepotuba: 4A) Citótipo A, Rio Sepotuba; 4B) Citótipo B, Córrego São José; 4C) Citótipo C, Córrego São José; 4D) Citótipo D, Córrego São José.

Martínez *et al.*, 2012). A acentuada diversidade encontrada nesses lambaris parece estar relacionada com a ampla distribuição geográfica desse grupo de peixes e sua capacidade de explorar grande variedade de microhabitats, formando pequenas populações com dispersão relativamente restrita, o que facilitaria a fixação de rearranjos cromossômicos (Garutti & Britski, 2000).

#### Referências Bibliográficas

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

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae*

(Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, **1**: 103 - 120.

Carvalho ML, Oliveira C, Foresti F. (2002) Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia**, **55**: 181-188.

Daniel-Silva MFZ, Almeida-Toledo LF. (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, **54**: 209-215.

Daniel-Silva MFZ, Almeida-Toledo LF. (2005) Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, **109**: 497-501.

Domingues MS, Vicari RM, Abilhoa V, Wamser PJ, Cestari MM, Bertollo ACL, Almeida CM, Artoni FR. (2007) Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, **5**: 37-44.

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

Fernandes CA, Martins-Santos IC. (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, **29**: 464–468.

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

Ferreira-Neto M, Artoni R, Vicari M, Moreira-Filho O, Camacho J, Bakkali M, Oliveira C, Foresti F. (2012) Three

sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. **Comparative Cytogenetics**, **6**: 29-40.

Garutti V. (1998) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia**, **85**: 115-122.

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

Kavalco KF, Brandão KO, Pazza R, Almeida-Toledo LF. (2009a) *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, **32**: 477-483.

Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF. (2009b). *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, **136**(1), 135-139.

Kavalco KF, Pazza R, Brandão KO, GARCIA, C, Almeida-Toledo LF. (2012) Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, **134**: 108–119.

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

Lima TCF, Malabarba RL, Buckup PA, Silva PFJ, Vari P, Harold A, Benine R, Oyakawa TO, Pavanelli SC, Menezes NA, Lucena SSC, Malabarba LSCM, Lucena SMZ, Reis ER, Langeani F, Cassati L, Bertaco AV, Moreira C, Lucinda FHP. (2003) Genera *Incertae Sedis* in characidae. Pp. 106-109. In: Reis, R. E., Kullander, S. O.; Ferraris Jr., C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, RS: Edipucrs, 729p.

Martinez ERM, Alves AL, Silveira SM, Foresti F, Oliveira C. (2012) Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetics**, **6**: 41–51.

Medrado AS, Figueiredo AVA, Waldschmidt AM, Affonso PRAM, Carneiro PLS. (2008) Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, **31**: 208-214.

Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC. (1998) Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, **21**:55-6

Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, **14**: 331-357.

Nelson J S. (2006) **Fishes of the world**. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4rd edition. 601 pp.

Oliveira C, Almeda-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho AS. (1988) Formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, **11**: 577-624.

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

Oliveira C. et al., (2009b). Base de dados de citogenética de peixes neotropicais. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>. Acessado em maio de 2012.

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

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

Peres WAM, Bertollo LAC, Buckup PA, Blanco DR, Kantek DLZ ; Moreira-Filho O. (2011) Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax bimaculatus* group (Characiformes: Characidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**: **22**: 519-526.

Vicari MR, Noletto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC.(2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, **31**: 173-179.

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

Sumner AT. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, **75**: 304–306.

Troy PW. (2004) Diversidade cariotípica de lambaris da subfamília Tetragonopterinae (Characidae, Characiformes). Cuiabá (MT), 2004. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Mato Grosso.