

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

THAIS APARECIDA DULZ

DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Astyanax* (TELEOSTEI,
CHARACIDAE) OCORRENTES NO MÉDIO RIO IGUAÇU

PONTA GROSSA

2015

THAIS APARECIDA DULZ

DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Astyanax* (TELEOSTEI,
CHARACIDAE) OCORRENTES NO MÉDIO RIO IGUAÇU

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

D878 Dulz, Thais Aparecida
Diversidade cariotípica em espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae) ocorrentes no médio rio Iguaçu/ Thais Aparecida Dulz. Ponta Grossa, 2015. 67f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

Coorientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho.

1.Cromossomos. 2.Genes ribossomais. 3.Heterocromatina. I.Artoni, Roberto Ferreira. II. Moreira-Filho, Orlando. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 576.312.32



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 07/2015

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Thais Aparecida Dulz**.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Thais Aparecida Dulz**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador UEPG), Dra. Carla Andreia Lorscheider (FAFIUV) e Dra. Mara Cristina de Almeida (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Diversidade cariotípica em espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae) ocorrentes no médio Rio Iguaçu"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof. Dra. Carla Andreia Lorscheider

Prof. Dra. Mara Cristina de Almeida

[Handwritten signatures of Roberto Ferreira Artoni, Carla Andreia Lorscheider, and Mara Cristina de Almeida]

Dedico este trabalho aos meus pais,
Rosangela e Luís, e ao grande amor da
minha vida Vinícius.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela proteção, coragem e força para que eu pudesse concluir mais uma etapa de minha vida acadêmica.

Agradeço de maneira especial a minha mãe Rosangela, o meu maior exemplo de superação e vitória. Mãe, você o meu porto seguro!

Ao meu pai Luís, por sempre me incentivar a seguir em frente, buscando os meus objetivos.

À minha irmã Thatielle, pelo carinho, apoio e por sua amizade sincera.

Gostaria de agradecer de modo particular, a uma pessoa que deu um novo sentido em minha vida, o meu esposo Vinícius. Obrigada por toda força, carinho, amor e paciência, que foram fundamentais para suportar a distância ao longo destes dois anos.

Ao meu orientador prof^o Dr. Roberto Ferreira Artoni, pela paciência, dedicação e amizade. Além do grande conhecimento proporcionado durante o curso do mestrado. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador prof^o Dr. Orlando Moreira-Filho, pela parceria durante este período.

À prof^a. Dr^a Carla Andréia Lorscheider, grande profissional e amiga, pelo apoio e a ajuda oferecidos desde a minha graduação até o mestrado. Muito Obrigada!

À prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello e a Dr^a Michelle Orane Schemberger, pelas valiosas contribuições no meu trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação de Biologia Evolutiva, por contribuírem com a minha formação acadêmica.

Ao Carlos de Oliveira, pela realização da identificação taxonômica dos peixes.

À secretária Zoli e ao técnico de laboratório Miguel pelo bom atendimento e auxílio prestados.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pela amizade e pelas contribuições durante a realização da minha pesquisa, especialmente a Patrícia e a Ieda, grandes amigas que me ajudaram muito.

Aos colegas da Unespar, pelas coletas realizadas, em especial a Angelita e a Daiane, por estarem presentes nos momentos que eu mais precisei. Obrigada meninas!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa.

À Universidade Estadual do Paraná, Campus de União da Vitória (PR), pela assistência que possibilitou a realização de parte da minha pesquisa.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva por fornecerem toda a infraestrutura e apoio para realização deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas, colegas e amigos que, direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A família Characidae é considerada a maior e mais complexa entre os Characiformes. O gênero *Astyanax* é um dos mais especiosos entre os caracídeos, compreendendo 142 espécies válidas distribuídas na região Neotropical. Muitas destas espécies encontram-se restritas a determinadas bacias hidrográficas. A ictiofauna da bacia do Rio Iguaçu caracteriza-se por apresentar um elevado grau de endemismo, possivelmente devido o seu isolamento da bacia do Rio Paraná, ocorrido há cerca de 22 milhões de anos, causado pelo surgimento das Cataratas do Iguaçu. Recentemente, foram descritas novas espécies deste gênero no Rio Iguaçu, entretanto seu posicionamento sistemático frente aos demais *Astyanax* ainda é desconhecido, fazendo-se necessários estudos que visem à compreensão de sua diversidade e de suas relações evolutivas. Sendo assim, objetivou-se realizar a caracterização cariotípica de espécies do gênero *Astyanax* provenientes do médio Rio Iguaçu: *Astyanax altiparanae*, *A. bifasciatus*, *A. dissimilis*, *A. minor*, *A. ribeirae* e *A. serratus*, utilizando como ferramenta a citogenética, a fim de contribuir com um cenário mais consistente acerca da evolução deste grupo. Utilizou-se técnicas baseadas na coloração convencional por Giemsa, detecção de regiões organizadoras de nucléolo por nitrato de prata (Ag-RONs), bandamento C e hibridação *in situ* fluorescência (FISH) com sondas de genes ribossomais 18S e 5S. Todas as espécies estudadas apresentaram $2n = 50$ cromossomos, confirmando o conservadorismo para o gênero. Observaram-se cariótipos compostos por todos os tipos cromossômicos e predominância de cromossomos com dois braços, principalmente do tipo metacêntrico, exceto para *A. ribeirae* com fórmula cariotípica composta por elevado número de acrocêntricos. Apesar do número diploide se manter constante nestas espécies, houve variações na fórmula cariotípica e, conseqüentemente no número fundamental, variando de 66 até 92. O bandamento C evidenciou variações na distribuição dos blocos heterocromáticos entre as espécies, com ocorrência de polimorfismo em *A. serratus*, o que também foi observado em outros estudos envolvendo *Astyanax* sp. D (*A. serratus*). As seis espécies estudadas mostraram a presença de RONS localizadas na região telomérica do braço curto de um par cromossômico do tipo subtelocêntrico, característica conservada para o gênero. Ocorreram RONS simples em *A. altiparanae* e *A. dissimilis*, as demais espécies possuem RONS múltiplas, em quase todos os casos confirmadas pela FISH com rDNA 18S. Todas as espécies evidenciaram rDNA 5S localizados nos segmentos intersticiais dos cromossomos. Foram observados rDNA 5S em um único par em *A. altiparanae*, *A. minor* e *A. serratus*, e múltiplos em *A. bifasciatus*, *A. dissimilis* e *A. ribeirae*. Destaca-se *A. ribeirae* por apresentar um elevado número de sítios rDNA 18S e 5S, os quais mostraram-se sintênicos e co-localizados. Além disso, esta espécie é considerada endêmica para bacia do Ribeira de Iguape; no entanto, foi encontrada pela primeira vez na bacia do Iguaçu, reforçando a hipótese de compartilhamento de fauna entre rios do planalto cristalino e regiões costeiras no sul do Brasil. A diversidade cariotípica evidenciada para todas as espécies devem-se principalmente a rearranjos não Robertsoniano. Neste estudo foram apresentados os primeiros dados citogenéticos para o gênero *Astyanax* ocorrentes na região do médio Rio Iguaçu.

Palavras-chave: Cromossomos. Genes ribossomais. Heterocromatina.

ABSTRACT

The Characidae is considered the largest family and most complex among the Characiforms. The *Astyanax* genus is one of the most speciose between the characids, comprising 142 valid species distributed in the Neotropical Region. Many of these species are restricted to certain river basins. The fish fauna of the Iguaçu River basin is characterized by having a high endemism, possibly because its isolation of the Paraná River basin, occurred about 22 million years, caused by the emergence of the Iguaçu Falls. Were recently described new species of this genus in the Rio Iguaçu, however its systematic position opposite the other *Astyanax* is still unknown, reinforcing necessary studies aimed at understanding their diversity and their evolutionary relationships. Therefore, this research aimed was to perform the karyotype characterization of the *Astyanax* species from the middle Rio Iguaçu: *Astyanax altiparanae*, *A. bifasciatus*, *A. dissimilis*, *A. minor*, *A. ribeirae* and *A. serratus*, using cytogenetics as a tool, in order to contribute to a more consistent scenario about the evolution of this group. The analysis were based on conventional Giemsa staining techniques, detection of nucleolar organizing regions by silver nitrate (Ag-NORs), C-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to ribosomal genes 18S e 5S probes. All species presented $2n = 50$ chromosomes, confirming the conservatism to the genus. The karyotypes comprise all chromosomal types and prevalence of chromosomes with two arms, mainly on the metacentric type except for *A. ribeirae* with the karyotype formula containing high number of acrocentrics. Despite the diploid number remain constant in these species; there were variations in karyotype formula and consequently the fundamental number, ranging from 66 to 92. The C-banding showed differences in the distribution of heterochromatic blocks between species, occurring polymorphism in *A. serratus*, which was also observed in other studies involving *Astyanax* sp. D (*A. serratus*). The six species showed the presence of NORs located in the telomeric region of the short arm of a chromosome pair of the type subtelocentric, characteristic conserved for the genus. Was identified single NORs in *A. altiparanae* and *A. dissimilis*, although the most common being multiple NORs, in almost all cases confirmed by 18S rDNA. All species showed 5S rDNA located in the interstitial segments of the chromosomes. Have been observed simple rDNA 5S in *A. altiparanae*, *A. minor* and *A. serratus*, and multiple in *A. bifasciatus*, *A. dissimilis* and *A. ribeirae*. Highlighted *A. ribeirae* by presenting a high number of rDNA 18S and 5S sites, which proved to be syntenics and co-located. In addition, this species is considered endemic for Ribeira de Iguaçu basin; however, was first found in the Iguaçu basin, strengthening fauna sharing hypothesis between rivers of the plateau and coastal regions in southern Brazil. The karyotype diversity evident for all species is mainly due to non-Robertsonian rearrangements. This study presented the first cytogenetic data for the genus *Astyanax* occurring in the Middle Rio Iguaçu region.

Keywords: Chromosomes. Ribosomal genes. Heterochromatin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Espécies de <i>Astyanax</i> : a) <i>A. altiparanae</i> , 81 mm de comprimento padrão (CP); b) <i>A. bifasciatus</i> , 93,5 mm CP; c) <i>A. dissimilis</i> , 89,3 mm CP; d) <i>A. minor</i> , 77,1 mm CP; e) <i>A. ribeirae</i> , 56,2 mm CP; f) <i>A. serratus</i> , 78,2 mm CP.....	25
Figura 2 -	Pontos de coleta localizados na região do médio Rio Iguaçu, sul do Brasil: 1- Rio Claro (<i>A. ribeirae</i>), 2- Rio Iguaçu (<i>A. altiparanae</i> , <i>A. bifasciatus</i> e <i>A. minor</i>) e 3- Rio Pintado (<i>A. dissimilis</i> e <i>A. serratus</i>).....	26
Figura 3 -	Cariótipos de <i>A. altiparanae</i> (a, b), <i>A. bifasciatus</i> (c, d) e <i>A. dissimilis</i> (e, f) após coloração convencional com Giemsa (lado esquerdo). Em destaque na cor amarela os cromossomos portadores das Ag-RONs (lado direito). Barra = 10 µm.....	41
Figura 4 -	Cariótipos de <i>A. minor</i> (a, b), <i>A. ribeirae</i> (c, d) e <i>A. serratus</i> (e, f) após coloração convencional com Giemsa (lado esquerdo). Em destaque na cor amarela os cromossomos portadores das Ag-RONs (lado direito). Barra = 10 µm.....	42
Figura 5 -	Cariótipos de <i>A. altiparanae</i> (a, b), <i>A. bifasciatus</i> (c, d) e <i>A. dissimilis</i> (e, f) após bandamento C (lado esquerdo) e aplicação da técnica FISH (lado direito) com sondas rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). Barra = 10 µm.....	43
Figura 6 -	Cariótipos de <i>A. minor</i> (a, b), <i>A. ribeirae</i> (c, d) e <i>A. serratus</i> (e, f) após bandamento C (lado esquerdo) e aplicação da técnica FISH (lado direito) com sondas rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). Barra = 10 µm.....	44
Figura 7 -	Metáfases de <i>A. serratus</i> submetidas à técnica de bandamento C, as setas indicam a localização dos blocos heterocromáticos intersticiais. Barra = 10 µm.....	45
Figura 8 -	Idiograma: <i>A. altiparanae</i> (a), <i>A. bifasciatus</i> (b), <i>A. dissimilis</i> (c), <i>A. minor</i> (d), <i>A. ribeirae</i> (e) e <i>A. serratus</i> (f). Dados obtidos com diferentes metodologias.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Localidades de coleta das espécies do gênero <i>Astyanax</i> na região do médio Rio Iguaçu.....	24
Tabela 2 -	Dados citogenéticos disponíveis para espécies de <i>Astyanax</i> pertencentes à bacia do Rio Iguaçu.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	CARACTERIZAÇÃO GERAL DA BACIA DO RIO IGUAÇU.....	12
1.2	A ICTIOFAUNA DO RIO IGUAÇU COM DESTAQUE PARA O GÊNERO <i>Astyanax</i>	13
1.3	ASPECTOS GERAIS DA ORDEM DOS CHARACIFORMES, FAMÍLIA CHARACIDAE E GÊNERO <i>Astyanax</i>	15
1.4	MARCADORES CITOGENÉTICOS USUAIS EM PEIXES.....	17
1.5	DIVERSIDADE CARIOTÍPICA NO GÊNERO <i>Astyanax</i> COM FOCO NAS ESPÉCIES DO RIO IGUAÇU.....	19
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	MATERIAL E LOCAIS DE COLETA.....	23
3.2	MÉTODOS.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
	ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DA BACIA DO RIO IGUAÇU

O Rio Iguaçu é um importante tributário do Rio Paraná localizado na região sul do Brasil. Destaca-se entre os rios paranaenses por apresentar a maior bacia hidrográfica, cobrindo uma superfície de aproximadamente 72.000 Km², deste total 79% pertencem ao estado do Paraná, 19% ao estado de Santa Catarina e apenas 2% à Argentina (ELETROSUL, 1978; BAUMGARTNER et al., 2006).

As nascentes do Rio Iguaçu ocorrem na confluência dos Rios Atuba e Iraí, localizados na parte leste do município de Curitiba, divisa com o município de São José dos Pinhais, mais especificamente na margem ocidental da Serra do Mar (BRASIL, 2010). Com direção geral leste-oeste percorre cerca de 1.060 Km desde suas nascentes até a sua foz. Seu desnível é de 830m, isto é, da altitude de 908m onde nasce até os 78m na sua desembocadura no Rio Paraná (PAIVA, 1982). Este elevado desnível constituiu um grande atrativo para o aproveitamento hidroelétrico, resultando em cinco grandes reservatórios: Foz do Areia, Salto Segredo, Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias, além de vários reservatórios menores (JÚLIO JR.; BONECKER; AGOSTINHO, 1997; BAUMGARTNER et al., 2012).

A formação da bacia hidrográfica do Rio Iguaçu remonta a era Mesozóica e o início da era Paleozóica (MINEROPAR, 2010) e foi associada a movimentos escalonados durante o soerguimento da Serra do Mar, resultando na formação dos três planaltos paranaenses, o primeiro compreende a região de Curitiba, o segundo a região de Ponta Grossa e o terceiro a região de Guarapuava. Tal evento também promoveu a inversão da direção do rio, o qual passou a correr para o interior do continente. De acordo com as características geomorfológicas do estado do Paraná, o Rio Iguaçu foi subdividido em três regiões, o alto Iguaçu, o médio Iguaçu e o baixo Iguaçu (MAACK, 2001; MINEROPAR, 2014).

A região do alto Iguaçu não apresenta definição nítida de seus limites, aceitando-se que compreenda desde suas nascentes até à jusante da confluência com o Rio Negro, no município de São Mateus do Sul. A baixa declividade neste trecho resulta em meandros com amplas curvaturas e extensas várzeas (MAACK, 1981; INGENITO; DUBOC; ABILHOA, 2004; PARANÁ, 2006).

O médio Iguaçu é caracterizado por apresentar extensas e rápidas corredeiras unidas a amplas áreas inundadas. Compreende o trecho à jusante da confluência do Rio Iguaçu e Rio Negro, no município de São Mateus do Sul, até imediatamente à jusante da foz do Rio Jordão,

no município de Foz do Jordão. Neste trecho destacam-se alguns afluentes, os Rios Potinga e Claro, na margem direita e o Passa Dois, Negro e Timbó na margem esquerda (MAACK, 1981; PARANÁ, 2006).

A região do baixo Iguaçu tem início à jusante da foz do Rio Jordão seguindo até a desembocadura no Rio Paraná, esta região é marcada por inúmeras corredeiras e cachoeiras, com destaque para Salto Grande (desnível de 13m), Salto Santiago (desnível de 40m), Salto Osório (desnível de 30m). Além de apresentar várias usinas hidroelétricas (MAACK, 1981; PARANÁ, 2006; BAUMGARTNER et al., 2012).

Na região das cataratas, o Rio Iguaçu tem uma largura de 1.200m e uma vazão média de 1.800 m³/s, correndo de seu curso para um profundo cânion até o Rio Paraná. As massas d'água precipitam-se sobre dois degraus, no degrau maior, o Rio Iguaçu possui uma queda de 69m de altura seguindo para Garganta do Diabo, enquanto que no degrau menor, acima do salto principal, atinge apenas 2.50m de altura (MAACK, 1981; 2001).

1.2 A ICTIOFAUNA DO RIO IGUAÇU COM DESTAQUE PARA O GÊNERO *Astyanax*

A fauna de peixes da bacia do Rio Iguaçu tem sua história evolutiva influenciada pelo surgimento das Cataratas do Iguaçu, ocorrido há cerca de 22 milhões de anos. Este evento levou ao isolamento físico entre as bacias dos Rios Iguaçu e Paraná, sendo responsabilizado pelo desenvolvimento de uma ictiofauna peculiar deste sistema hidrográfico (SEVERI; CORDEIRO, 1994; GARAVELLO, 1997; AGOSTINHO et al., 1999).

A ictiofauna do Rio Iguaçu é caracterizada pelo seu elevado grau de endemismo, estimado em 75% (ZAWADZKI; RENESTO; BINI, 1999) e pelo pequeno número de espécies, quando comparada com outros afluentes do Rio Paraná. Além de não possuir famílias de peixes migradores (JÚLIO JR.; BONECKER; AGOSTINHO, 1997).

Os primeiros trabalhos envolvendo as espécies do Rio Iguaçu foram conduzidos por Haseman (1911) que descreveu 13 espécies e, naquela época, ressaltava a questão do endemismo, tendo encontrado um baixo número de espécies de caracídeos quando comparado com a grande diversidade desta família no Rio Paraná.

A família Characidae pertence à ordem dos Characiformes, considerada uma das ordens mais representativas em número de espécies para a bacia do Rio Iguaçu. Entre os caracídeos tem grande destaque o gênero *Astyanax*, por ser o mais diversificado e abundante nesta bacia (BIFF et al., 2006; PAVANELLI; OLIVEIRA, 2009).

Eigenmann (1911) realizou as primeiras contribuições referentes à sistemática do gênero com base na coleção ictiológica do Haseman. Em 1921 e 1927, o autor indicou a presença de *Astyanax scabripinnis paranae* e *Astyanax eigenmanniorum* para Rio Iguaçu. Após várias décadas, outros estudos envolvendo este gênero foram realizados por Garavello (1977), Godoy (1979), Menezes e Géry (1983), Sampaio (1988), Severi e Cordeiro (1994).

Em 1997, Garavello, Pavanelli e Suzuki, forneceram informações taxonômicas sobre seis espécies de *Astyanax*. Posteriormente, Garutti e Britski (2000) descrevem *Astyanax altiparanae*; Almirón, Azpelicueta e Casciotta (2002) descrevem *Astyanax ita* e *Astyanax leonidas*. Haluch e Abilhoa (2005) descreveram *Astyanax totae* a partir de nascentes do Iguaçu. Abilhoa e Duboc (2007) descreveram *Astyanax varzeae* provenientes das cabeceiras do Rio Negro e Alcaraz, Pavanelli e Bertaco (2009) descreveram *Astyanax jordanensis* pertencente ao Rio Jordão.

Em 2010, Garavello e Sampaio descreveram cinco novas espécies de *Astyanax* para o Rio Iguaçu e redescreveram *Astyanax gymnogenis*. Anteriormente, Sampaio (1988) havia definido estas espécies como *Astyanax* sp. B, *Astyanax* sp. C, *Astyanax* sp. D, *Astyanax* sp. E, e Garavello, Pavanelli e Suzuki (1997) definiram *Astyanax* sp. G, que respectivamente foram denominadas como *Astyanax bifasciatus*, *Astyanax minor*, *Astyanax serratus*, *Astyanax dissimilis* e *Astyanax longirhinus*.

Atualmente a bacia do Rio Iguaçu apresenta 14 espécies do gênero *Astyanax*: *A. altiparanae* (Garutti e Britski, 2000); *A. bifasciatus*; *A. dissimilis* (Garavello; Sampaio, 2010); *A. eremus* (Ingenito e Duboc, 2014); *A. gymnodontus*; *A. gymnogenys* (Eigenmann, 1911); *A. ita* (Almirón, Azpelicueta e Casciotta, 2002); *A. jordanensis* (Alcaraz, Pavanelli e Bertaco, 2009); *A. leonidas* (Azpelicueta, Casciotta e Almirón, 2002); *A. longirhinus* (Garavello e Sampaio, 2010); *A. minor*; *A. serratus* (Garavello e Sampaio, 2010); *A. totae* (Haluch e Abilhoa, 2005) e *A. varzeae* (Abilhoa; Duboc, 2007) (INGENITO; DUBOC, 2014).

Destas espécies descritas, 12 são endêmicas à bacia do Rio Iguaçu, mas com ocorrência de algumas destas em sub-bacias menores. Apenas *A. altiparanae* e *A. leonidas* são consideradas como não endêmicas (ALMIRÓN; AZPELICUETA; CASCIOTTA, 2002; PRIOLI et al., 2002). De acordo com Ingenito e Duboc (2014), *Astyanax* sp. F, descrita por Sampaio (1988) e Garavello, Pavanelli e Suzuki (1997), engloba diferentes espécies deste gênero, as quais encontram-se dispersas ao longo do Rio Iguaçu. Diante desta situação, é provável que novas espécies possivelmente ocorram em pequenos afluentes e ainda devam ser reconhecidas como espécies válidas.

1.3 ASPECTOS GERAIS DA ORDEM CHARACIFORMES, FAMÍLIA CHARACIDAE E GÊNERO *Astyanax*

Os peixes representam mais da metade das espécies viventes reconhecidas de vertebrados, totalizando 33.178 espécies válidas (NELSON 2006; ESCHMEYER; FONG, 2014). A ictiofauna de água doce possui em torno de 13.000 espécies, com registros de ocorrência de aproximadamente 6.000 espécies na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 conhecidas, porém ainda não descritas taxonomicamente (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

Entre as principais ordens de peixes destaca-se a dos Characiformes, por ser considerada uma das mais representativas e diversificadas ictiofaunas do mundo. Esta ordem é composta por 23 famílias e 270 gêneros, agrupando mais de 3.428 espécies válidas (OLIVEIRA et al., 2011; ESCHMEYER; FONG, 2014), as quais estão amplamente distribuídas em águas continentais da região Neotropical e do continente Africano (NELSON, 2006).

Os caraciformes habitam vários ecossistemas, desde de rios e córregos até remansos lânticos e planície de inundação (OLIVEIRA et al., 2011). Eles possuem uma variedade de especializações ecológicas, incluindo detritívoros, planctívoros, herbívoros e carnívoros. As características morfológicas marcantes são: dentes bem desenvolvidos, corpo geralmente coberto por escamas, as nadadeiras pélvicas estão presentes (com 5-12 raios), a nadadeira anal varia de curta a moderadamente longa (com cerca de 45 raios), nadadeira caudal (com 19 raios) e a linha lateral é geralmente oblíqua. Algumas espécies apresentam adaptações morfológicas e fisiológicas, possibilitando a sobrevivência em condições extremas (ORTÍ; MEYER, 1997).

O tamanho dos Characiformes varia entre 26 mm, consideradas espécies miniaturas como em *Lepidarchus* (WEITZMAN; VARI, 1988), até mais de um metro de comprimento, a exemplo de *Salminus*. Alguns membros desta ordem são extremamente coloridos, apesar da maioria ser prateado, algumas espécies são utilizadas como ornamentais, outras espécies possuem importância comercial ou para pesca desportiva (CHAO, et al., 2001; NELSON, 2006).

Várias famílias e subfamílias de Characiformes possuem evidências de monofiletismo, (MALABARBA, 1998). Entretanto, em algumas famílias, como Characidae, não há consenso do monofiletismo em sua composição (MIRANDE, 2010).

A família Characidae é considerada a maior e mais complexa entre os caracíformes, envolve aproximadamente 12 subfamílias (LIMA et al., 2003), 170 gêneros (REIS; KULLANDER; FERRARIS; 2003) e 1.083 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2014). Esta família também é uma das mais exploradas, quando se refere a descrição de novas espécies, pois ao longo dos últimos anos foram mais de 250 descrições. No entanto, é provável que ainda tenham muitas a serem descritas (OLIVEIRA et al., 2011).

Os caracídeos podem ser representados por espécies de pequeno porte, conhecidas popularmente como lambaris, piquiras, piabas e matupiris. E espécies de maior porte como as piranhas, pacus, dourados e tabaranas (BUCKUP, 1999). Esta família também é conhecida por abranger complexos de espécies, com incertezas quanto às relações morfológicas e sistemáticas (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

Uma classificação da família Characidae foi proposta por Reis, Kullander e Ferraris (2003), reconhecendo 12 subfamílias, as quais representam grupos monofiléticos, são elas: Agoniatinae, Aphyocharacinae, Bryconinae, Characinae, Cheirodontinae, Clupeocharacinae, Glandulocaudinae, Iguanodectinae, Rhoadsiinae, Serrasalminae, Stethaprioninae e Tetragonopterinae (LIMA et al., 2003).

O gênero *Tetragonopterus* é o único considerado monofilético, pertencente a subfamília Tetragonopterinae, sendo os demais gêneros, inclusive *Astyanax*, listados como *Incertae sedis*. Nesta classificação encontram-se 88 gêneros de caracídeos (LIMA et al., 2003). Na última classificação realizada, 92 gêneros foram considerados como *Incertae sedis*, devido a inclusão de quatro novos: *Myxiops* (ZANATA; AKAMA, 2004); *Nantis* (MIRANDE; AGUILERA; AZPELICUETA, 2004; 2006); *Bryconadenos* (WEITZMAN et al., 2005) e *Dectobrycon* (ZARSKE; GÉRY, 2006). Apesar da maioria dos gêneros ser considerada como não monofiléticos, Mirande (2009), baseado em análises filogenéticas, realizou uma classificação provisória, incluindo 75 dos 92 gêneros em um clado presumivelmente monofilético.

O gênero *Astyanax* foi descrito por Baird e Girard (1854), mas a primeira revisão completa do gênero foi realizada por Eigenmann (1921, 1927), considerando-o um grupo polifilético, classificação esta também reconhecida por Géry (1977). Atualmente é considerado um dos gêneros mais especiosos entre os caracídeos, compreendendo 142 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2014), distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (LIMA et al., 2003) e constituindo um dos gêneros dominantes na América do Sul (GÉRY, 1977).

As espécies deste gênero são conhecidas popularmente como piabas ou lambaris (GÉRY, 1977). As principais características morfológicas são: o tamanho reduzido atingindo cerca de 200 mm (GARUTTI, 1998), nadadeira adiposa geralmente presente, linha lateral completa, discretamente curvada na região anterior; pré-maxilar não protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, dentes com cúspides; altura do corpo aproximadamente três vezes ou menos o comprimento padrão; corpo recoberto por escamas (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Estes peixes possuem fecundação externa, com ausência de cuidado parental e não são migradores (VAZZOLER; MENEZES, 1992).

Astyanax foi classificado primeiramente como Tetragonopterinae (GÉRY, 1977). Após uma revisão na subfamília houve a reorganização da sistemática do gênero, alocando *Astyanax* como *Incertae sedis* (LIMA et al., 2003). Recentes contribuições filogenéticas possibilitaram uma nova relação de proximidade entre os gêneros *Incertae sedis*, originando um ramo na filogenia de Characidae denominado clado *Astyanax* (MIRANDE, 2009).

1.4 MARCADORES CITOGENÉTICOS USUAIS EM PEIXES

Uma importante ferramenta utilizada na identificação e diferenciação das espécies de peixes é a citogenética (BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI, 1986). Dados recentes indicam aproximadamente 2.600 espécies/subespécies cariotipadas, e neste número estão inclusos estudos com espécies das ordens Characiformes, Cypriniformes, Siluriformes e Perciformes (ARAI, 2011).

Esta ciência é aplicada principalmente ao estudo evolutivo dos peixes, podendo estar associada a outras áreas como a taxonomia (citotaxonomia) (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991), a morfologia, biogeografia, comportamento e genética molecular, buscando nestas integrações compreender a história evolutiva dos organismos (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000).

A citogenética vem contribuindo expressivamente para um melhor conhecimento da biodiversidade de peixes através da utilização das técnicas convencionais, como a coloração com Giemsa, bandamento C e impregnação das regiões organizadoras de nucléolo com nitrato de prata (Ag-RONs) e de técnicas moleculares como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), na qual são utilizadas sondas específicas de DNA para localizar determinadas sequências no complemento cromossômico, desta maneira fornecendo informações mais precisas sobre a organização cariotípica nos peixes (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000; GALETTI; MARTINS, 2004).

A visualização dos cromossomos por coloração com Giemsa possibilita a determinação do número diploide e da constituição cariotípica. A técnica de bandamento C evidencia regiões heterocromáticas, as quais estão constantemente condensadas, sendo compostas principalmente por DNA satélites que são sequências altamente repetitivas em tandem (em sequência), com cerca de 100 a 300 pares de base de comprimento e podem variar de 1.000 a mais de 100.000 cópias. Geralmente encontrados em blocos, localizados em regiões pericentroméricas, teloméricas e em posições intersticiais ao longo dos braços cromossômicos (MARTINS, 2007; SUMNER, 2003).

Outro marcador empregado na caracterização cariotípica é a técnica de detecção das regiões organizadoras de nucléolo com nitrato de prata (Ag-RONs), usada para localizar atividade ribossomal (HOWELL; BLACK, 1980). O RNA ribossomal é o mais abundante, representando 80% do RNA total das células, tais moléculas são os principais componentes estruturais dos ribossomos (DOUDNA; RATH, 2002). A análise das RONs é amplamente realizada no estudo citogenético com peixes, devido à simplicidade do método (GALETTI, 1998; PERES et al., 2009; MARTINEZ et al., 2012). Os íons de prata se associam a proteínas não-histônicas ácidas presentes nas RONs ativas, podendo também impregnar regiões heterocromáticas ricas em resíduos ácidos (HOWELL; BLACK, 1980; SUMNER, 1990; GALETTI; MARTINS, 2004; BOISVERT et al., 2007).

Nesta situação, a utilização de sondas de DNA ribossômico por meio da técnica FISH é considerada mais sensível, devido localizar sequências de DNA ribossômico nos cromossomos, independente de ativação, revelando o número total de RONs que caracterizam a espécie (PHILLIPS; REED, 1996; GALETTI; MARTINS, 2004).

As RONs podem ser observadas em apenas um par cromossômico (RONs simples) ou em vários pares cromossômicos (RONs múltiplas). Em peixes, a presença de cariótipos com RONs simples pode ser considerada uma condição ancestral, comparado com RONs múltiplas (SCHMID; 1980). Estes sítios são importantes marcadores cromossômicos, pois o número e a localização podem ser característicos de uma espécie ou população, apesar da variabilidade intra ou interindividuais estar envolvida em diversos organismos (LOURENÇO et al., 1998).

As regiões organizadoras de nucléolo compreendem parte da família multigênica do rDNA 45S, a qual consiste nas unidades transcricionais codificantes de rRNA 18S (relacionada às RONs), 5,8S e 28S, separados por espaçadores intergênicos; esta família é transcrita pela enzima nuclear RNA polimerase I (MARTINS; GALETTI, 2001; MARTINS, 2007).

Outra família multigênica corresponde ao rDNA 5S, codificando apenas rRNA 5S, transcrito fora do núcleo pela enzima RNA polimerase III, está relacionada com a organização nuclear (GALETTI; MARTINS, 2004). A unidade compreende sequências codificantes de 120 pares de bases, separadas umas das outras por espaçadores não transcritos de tamanho variável (MARTINS; GALETTI, 2001; GALETTI; MARTINS, 2004).

Muitos grupos de peixes apresentam acentuada variabilidade em relação a localização dos sítios cromossômicos de rDNA 45S, que na maioria das vezes encontram-se localizados nas regiões teloméricas dos cromossomos, facilitando a sua dispersão (MARTINS; GALETTI, 1999). Tais regiões são mais propícias a transferência de material genético, devido a sua proximidade dentro do núcleo interfásico (SCHWEIZER; LOIDL, 1987).

O rDNA 5S apresentam-se mais conservados, esta característica pode estar relacionado com a localização cromossômica dos rDNA 5S em posição intersticial para vários grupos de peixes, isto pode representar alguma vantagem para o genoma, indicando que tais *clusters* estão protegidos de possíveis mudanças na estrutura cariotípica (MARTINS; WASKO, 2004). Este padrão de localização cromossômica parece corresponder a uma condição ancestral para os peixes (MARTINS; GALETTI, 1999).

Os sítios de rDNA 45S e 5S podem apresentar uma organização sintênica no cromossomo ou estarem localizados em pares cromossômicos diferentes. A sintenia destes *clusters* pode facilitar a ocorrência de translocação entre essas sequências gênicas, causando interferências nas estruturas bem como nas funções destes genes (MARTINS; GALETTI, 1999). A sintenia entre rDNA 45S e 5S pode ser considerada uma condição conservada entre diferentes grupos de peixes (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2003; HATANAKA; GALETTI, 2004; VICARI et al., 2006). No entanto, a organização não sintênica das RONS e rDNA 5S, aparenta ser uma situação comum entre os peixes (LUCCHINI et al., 1993) e um padrão mais frequente entre os vertebrados (SUZUKI, 1996).

1.5 DIVERSIDADE CARIOTÍPICA NO GÊNERO *Astyanax* COM FOCO NAS ESPÉCIES DO RIO IGUAÇU

Os primeiros estudos citogenéticos envolvendo o gênero *Astyanax* foram realizados por Jim e Toledo (1975), em *A. fasciatus* e *A. altiparanae* (mencionado como *A. bimaculatus*). Desde então este grupo tem sido amplamente estudado. O número diploide em *Astyanax* varia de $2n = 36$ cromossomos em *A. schubarti* (MORELLI et al., 1983; DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005) até $2n = 50$ cromossomos descrito para a maioria

das espécies (PAZZA; KAVALCO, 2007). Algumas espécies como, por exemplo, *A. fasciatus* apresentam $2n = 45$, $2n = 46$, $2n = 47$, $2n = 48$ cromossomos (PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006).

O número diploide conservado de $2n = 50$ (PAZZA; KAVALCO, 2007), pode ser observado tanto em espécies com ampla distribuição geográfica como *A. altiparanae* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES et al., 2007; MARTINEZ et al., 2012; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2014). Quanto em espécies restritas a determinadas bacias hidrográficas, como *Astyanax* sp. B (*A. bifasciatus*), *Astyanax* sp. C (*A. minor*) e *Astyanax* sp. D (*A. serratus*), consideradas endêmicas da bacia do Rio Iguaçu (FAZOLI et al., 2003; KANTEK; FENOCCHIO; CESTARI, 2003; KANTEK et al., 2007; 2008b) e *A. ribeirae*, endêmica da bacia do Rio Ribeira de Iguape (KAVALCO; PAZZA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010).

As espécies de *Astyanax* provenientes da bacia do Iguaçu apresentam poucos estudos com abordagem citogenética. De um total de 14 espécies reconhecidas para esta bacia (INGENITO; DUBOC, 2014), apenas quatro possuem informações citogenéticas: *A. altiparanae* e *Astyanax* sp. D (*A. serratus*) com a maior quantidade de informações e *Astyanax* sp. B (*A. bifasciatus*) e *Astyanax* sp. C (*A. minor*) com apenas dois estudos cada (PORTO; MARTINS-SANTOS, 2002; FAZOLI et al., 2003; KANTEK; FENOCCHIO; CESTARI, 2003; DOMINGUES et al., 2007; KANTEK et al., 2007; KANTEK et al., 2008a; KANTEK et al., 2008b; FERREIRA-NETO et al., 2009). Ressalta-se que todas as espécies estudadas são provenientes da região do alto Iguaçu ou do baixo Iguaçu, não havendo registros de estudos com tal abordagem para região do médio Rio Iguaçu.

Estudos com *A. altiparanae* proveniente do Rio Iguaçu revelaram padrões conservados e variações na macroestrutura cariotípica. O bandamento C evidenciou a distribuição dos blocos heterocromáticos posicionados na região pericêntrica em grande parte dos cromossomos, característica esta presente na maioria das populações de *A. altiparanae*. No que se referente a localização da RONS e dos sítios de rDNA 5S e 18S, existem variações entre as populações (PORTO; MARTINS-SANTOS, 2002; DOMINGUES et al., 2007; FERREIRA-NETO et al., 2009).

Análises realizadas com *Astyanax* sp. D (*A. serratus*) evidenciaram a macroestrutura cromossômica conservada. Com relação aos sítios ribossomais de 5S mostraram-se simples em todas as populações. Diferentemente da rDNA 18S e RONS que apresentaram-se de forma múltipla. Referente ao padrão de distribuição dos blocos heterocromáticos verificou-se variações interindividuais nesta espécie. Além destas abordagens, foram realizados estudos

envolvendo a distribuição de DNA satélite As51, evidenciados em regiões terminais e intersticiais dos cromossomos (KANTEK et al., 2007; 2008a; 2008b; 2009).

Para *Astyanax* sp. B (*A. bifasciatus*) identificou-se pouca variação da macroestrutura cromossômica entre as populações, com registro da presença de cromossomos B na população do Reservatório de Salto Caxias (baixo Iguaçu). Os sítios ribossomais de 18S e das RONS mostraram-se de forma simples, já para rDNA 5S foram observados sítios múltiplos. Referente ao bandamento C foram verificados blocos heterocromáticos localizados na região telomérica de alguns cromossomos (FAZOLI et al., 2003; KANTEK et al., 2008b).

Estudos realizados com *Astyanax* sp. C (*A. minor*) revelaram um padrão conservado para a macroestrutura cariotípica entre as três populações analisadas, no entanto houve variações na distribuição e na quantidade dos sítios ribossomais 18S e 5S, como também nas RONS. Com relação a banda C foram observados blocos heterocromáticos em posições pericentroméricas e teloméricas nos cromossomos (KANTEK; FENOCCIO; CESTARI, 2003; KANTEK et al., 2008b).

A espécie *A. ribeirae* é considerada endêmica da bacia do Rio Ribeira de Iguaçu (OYAKAWA et al., 2006). A sua macroestrutura cariotípica destaca-se pelo elevado número de cromossomos acrocêntricos evidente na sua fórmula cariotípica (FC) ($4m+10sm+6st+30a$). O bandamento C revelou poucos blocos heterocromáticos localizados nas regiões pericentromérica dos cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolo apresentaram marcações simples, enquanto os sítios ribossomais de 18S e 5S marcações múltiplas (KAVALCO; PAZZA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010).

Verifica-se no gênero *Astyanax* que além de diferentes números diploides, também existem variações na fórmula cariotípica, no número e localização das RONS, nos sítios ribossomais 18S e 5S, presença de cromossomos B e polimorfismo da heterocromatina (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; KAVALCO et al., 2007). Como consequência de tantas variações é possível verificar a ocorrência de complexos de espécies, pelo menos três grupos são conhecidos: *A. altiparanae*, evidenciando diferentes fórmulas cariotípicas, apesar de possuir o número diploide conservado, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*, com diferenças nos números diploides (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004).

As variações cariotípicas que ocorrem e permitem a manutenção do número diploide podem ser atribuídas principalmente a rearranjos, como inversões. No caso das alterações no número diploide, é provável que sejam causadas por rearranjos robertsonianos tipo fusão (PAZZA; KAVALCO, 2007).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A ictiofauna do Rio Iguaçu é caracterizada pelo seu elevado grau de endemismo quando comparada a outros afluentes do Rio Paraná, possivelmente em virtude do seu isolamento ocorrido há cerca de 22 milhões de anos, com a formação das Cataratas do Iguaçu.

O gênero *Astyanax* é considerado muito especioso, além de possuir características citogenéticas variáveis em diferentes níveis. Por si, estas são características instigam a investigação acerca da biologia evolutiva destes peixes, não bastasse o fato de ser pouco explorada em diferentes aspectos da sua diversidade. Em adição, nenhuma espécie deste gênero apresenta informações citogenéticas na região do médio Rio Iguaçu.

Outro fator relevante, é que recentemente foram descritas novas espécies deste gênero para a bacia do Rio Iguaçu. Contudo, seu posicionamento sistemático frente aos demais *Astyanax* ainda é desconhecido, fazendo-se necessários estudos que visem à compreensão de sua diversidade e de suas relações evolutivas.

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar cariotipicamente espécies do gênero *Astyanax*, do médio Rio Iguaçu, utilizando como ferramenta a citogenética, a fim de contribuir com um cenário mais consistente acerca da evolução deste grupo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Entender a estruturação cariotípica das espécies, através da determinação do número diploide, fórmula cariotípica e número fundamental, a fim de confrontar os dados obtidos com dados disponíveis para o gênero;
- b) Analisar os padrões de distribuição da heterocromatina e a localização das regiões organizadoras de nucléolos de cada espécie, com intuito de comparar relações interespecíficas e intraespecíficas;
- c) Localizar genes ribossomais utilizando as sondas de rDNA 18S e 5S, com a finalidade de conhecer a sua distribuição no cariótipo, assim como confirmar a posição das regiões organizadoras de nucléolo. Inferir ainda sobre a localização destes genes diante das demais espécies de *Astyanax*;

- d) Acrescentar informações para o entendimento dos mecanismos cromossômicos envolvidos na diversificação cariotípica deste gênero.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA

Foram estudadas seis espécies de *Astyanax* (Figura 1) provenientes de três pontos distintos de coleta no médio Rio Iguaçu (Figura 2). Os peixes foram coletados com auxílio de varas e redes de pesca. Após coletados, os indivíduos foram encaminhados vivos para o laboratório de pesquisa da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR) Campus de União da Vitória, e mantidos em aquários aerados. Os peixes foram sacrificados após serem anestesiados com óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000). Todos os espécimes foram identificados e depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) (Tabela 1), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil.

O material cromossômico foi obtido via preparações de espécimes coletados na natureza (licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15115-1; anexo 1). Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Ponta Grossa (Protocolo: 04509/08; anexo 2).

Tabela 1: Localidades de coleta das espécies do gênero *Astyanax* na região do médio Rio Iguaçu.

Espécie	Fig.	Nº/Sexo	Rio, Cidade, Estado	Coordenada	NUP
<i>A. altiparanae</i>	2 (a)	7 ♀ + 3 ♂	Rio Iguaçu, União da Vitória, PR	26° 15' 1.11" S 51° 06' 10.67" O	16029
<i>A. bifasciatus</i>	2 (b)	9 ♀ + 8 ♂	Rio Iguaçu, União da Vitória, PR	26° 37' 2.24" S 50° 40' 37.23" O	16898
<i>A. dissimilis</i>	2 (c)	8 ♀ + 4 ♂	Rio Pintado, Porto União, SC	26° 16' 41.66" S 51° 02' 55.10" O	16895
<i>A. minor</i>	2 (d)	6 ♀ + 3 ♂	Rio Iguaçu, União da Vitória, PR	26° 15' 1.11" S 51° 06' 10.67" O	16888
<i>A. ribeirae</i>	2 (e)	10 ♀	Rio Claro, Mallet, PR	25° 57' 21.5" S 50° 41' 07.2" O	16900
<i>A. serratus</i>	2 (f)	10 ♀ + 7 ♂	Rio Pintado, Porto União, SC	26° 16' 41.66" S 51° 02' 55.10" O	16890

Nota: Fig.= figura; Nº/Sexo = número de indivíduos por sexo; PR=Paraná; SC= Santa Catarina; NUP= acronímia Nupélia, número do depósito no museu do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Brasil.

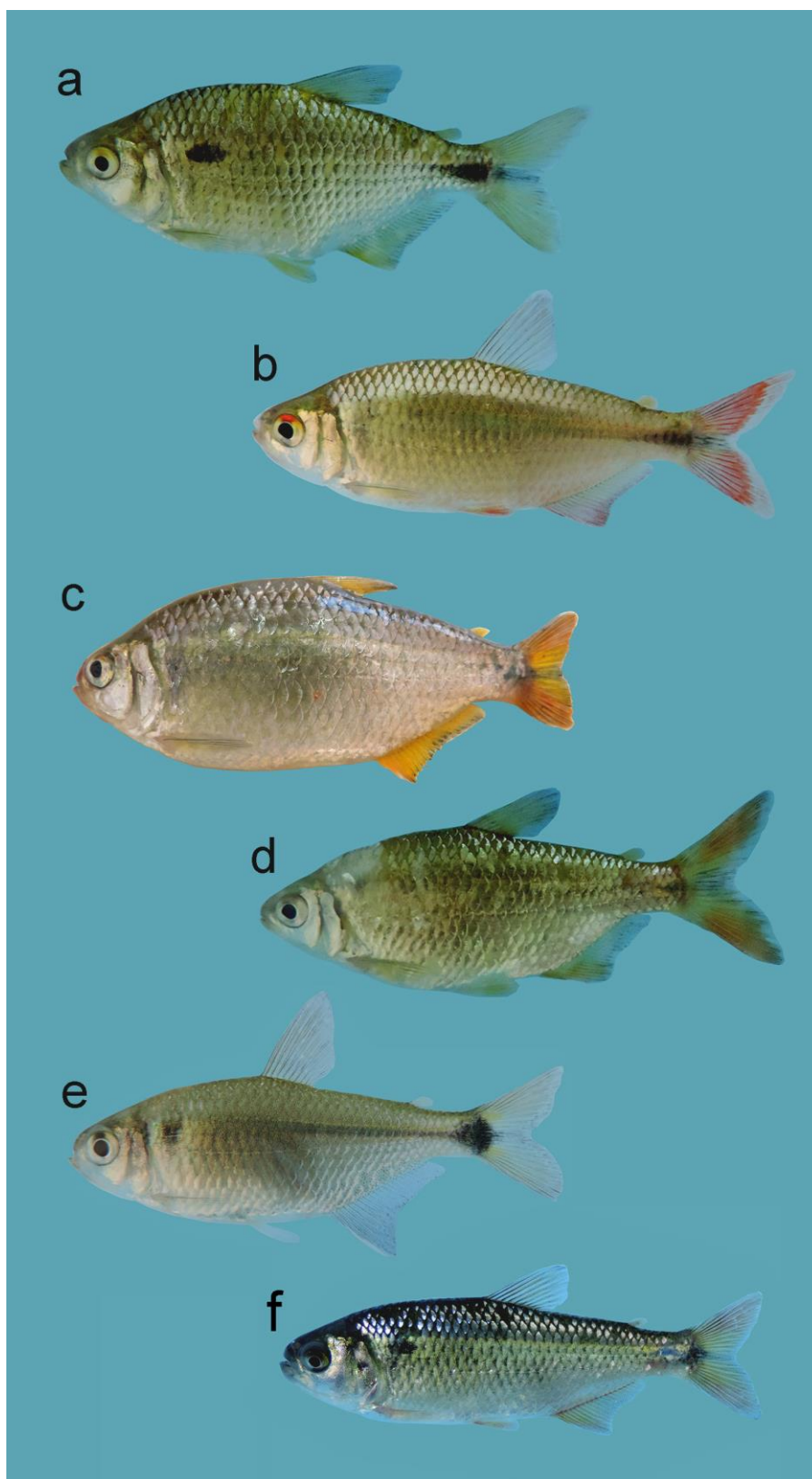


Figura 1: Espécies de *Astyanax*: a) *A. altiparanae*, 81 mm de comprimento padrão (CP); b) *A. bifasciatus*, 93,5 mm CP; c) *A. dissimilis*, 89,3 mm CP; d) *A. minor*, 77,1 mm CP; e) *A. ribeirae*, 56,2 mm CP; f) *A. serratus*, 78,2 mm CP.

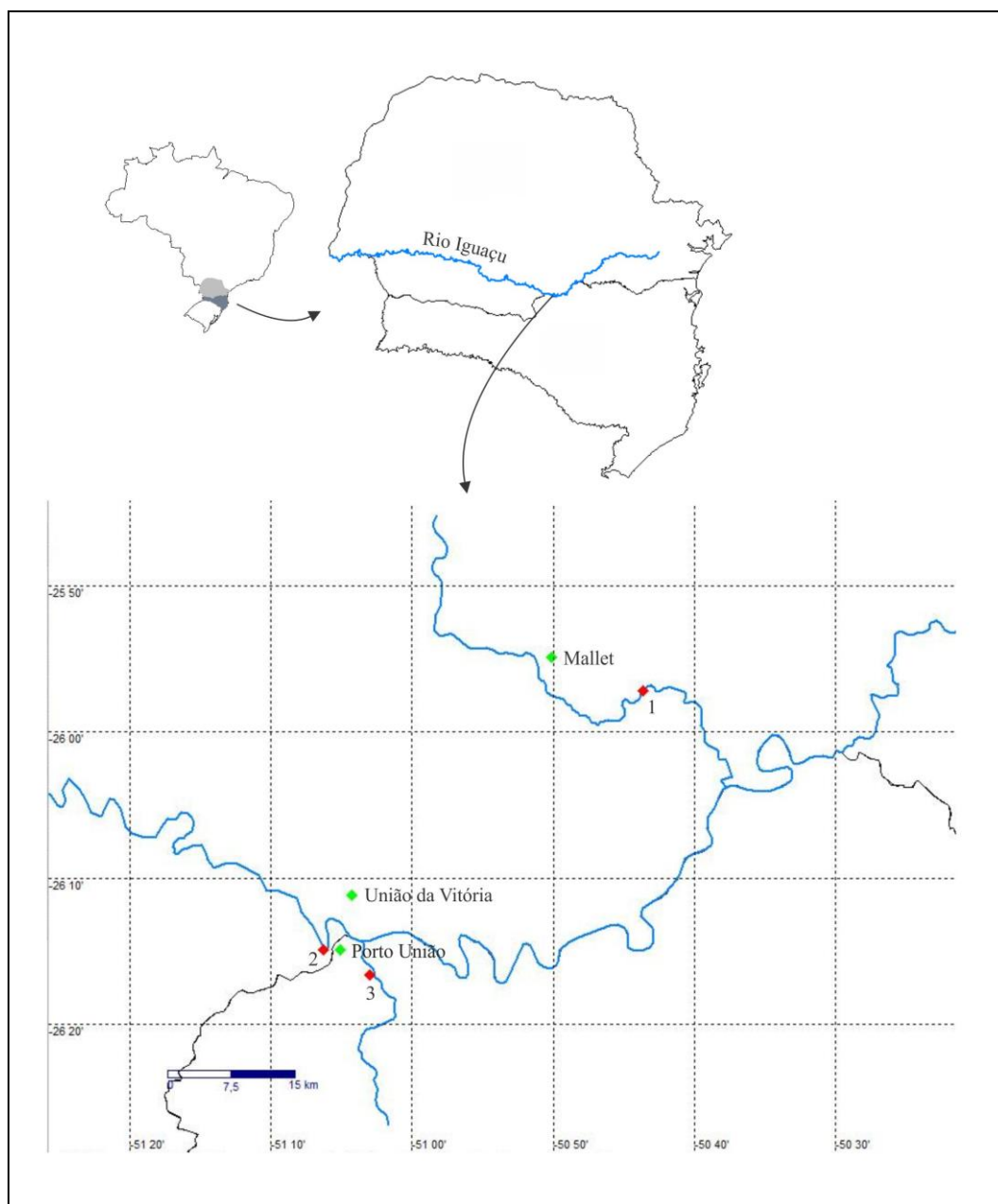


Figura 2: Pontos de coleta localizados na região do médio Rio Iguaçu, sul do Brasil: 1- Rio Claro (*A. ribeirae*), 2- Rio Iguaçu (*A. altiparanae*, *A. bifasciatus* e *A. minor*), 3- Rio Pintado (*A. dissimilis* e *A. serratus*).

3.2 MÉTODOS

Os cromossomos mitóticos por preparações diretas (*in vivo*) foram obtidos através da técnica de “air-drying” segundo Bertollo; Takahashi e Moreira-Filho (1978) (Anexo 3) e as preparações indiretas (*in vitro*) conforme Foresti; Oliveira e Almeida-Toledo (1993) (Anexo 4).

Para a detecção de heterocromatina constitutiva, realizou-se a técnica de bandamento-C proposta por Sumner (1972) (Anexo 5) com algumas modificações (LUI et al., 2009). A determinação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) detectada com nitrato de prata segundo Howell e Black (1980) (Anexo 6).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o procedimento descrito por Pinkel; Straume e Gray (1986) (Anexo 7). A obtenção da sonda de DNA ribossômico 18S ocorreu a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2004) e a sonda de rDNA 5S a partir de DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) (MARTINS; GALETTI, 1999). As sondas foram marcadas por *nick translation*, para a sonda rDNA 18S foi utilizado digoxigenina -11-dUTP com e para a sonda do rDNA 5S biotina-16-dUTP, segundo as orientações do fabricante (Roche Applied Science). A detecção das sondas foi realizada com anticorpo anti-digoxigenina conjugada com rodamina e streptavidina conjugada com FITC, respectivamente. Os cromossomos foram contraincorados com DAPI em meio de montagem Vectashield. As misturas de hibridização tiveram a estrigência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2x SSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 horas).

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio (Olympus Bx41) de campo claro e de epifluorescência; as melhores imagens capturadas com câmera digital.

Para a montagem dos cariótipos os cromossomos foram identificados baseando-se na relação de braços proposta por Levan et al, (1964) e mensurados por meio do programa Easy Idio 1.0 (DINIZ; MELO, 2006). Calculou-se o número fundamental considerando metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos contendo dois braços e os cromossomos acrocêntricos contendo apenas um braço. Realizou-se a montagem dos cariótipos através da utilização do software Adobe Photoshop (versão PSD 14). Os idiogramas foram construídos a partir dos cariótipos com o software Corel Draw v.X6, 2012 - Corel Corporation.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo I

4.1 Diversidade cariotípica em *Astyanax* (Teleostei: Characidae) no médio Rio Iguaçu

Resumo

Astyanax é um táxon altamente especioso, destacando-se entre os peixes neotropicais por compreender espécies com diferentes tendências evolutivas. Pouco se conhece sobre a sua diversidade cariotípica, principalmente para espécies restritas a determinadas bacias hidrográficas. A ictiofauna da bacia do Rio Iguaçu é caracterizada por apresentar um elevado endemismo, possivelmente devido ao seu isolamento da bacia do Rio Paraná, ocorrido há cerca de 22 milhões de anos, ocasionado pelo surgimento das Cataratas do Iguaçu. O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização cariotípica de espécies do gênero *Astyanax* provenientes do médio Rio Iguaçu: *Astyanax altiparanae*, *A. bifasciatus*, *A. dissimilis*, *A. minor*, *A. ribeirae* e *A. serratus*, utilizando marcadores cariotípicos a fim de contribuir com um cenário mais consistente acerca da evolução deste grupo. Para a obtenção dos resultados foram aplicadas técnicas baseadas na coloração convencional com Giemsa, detecção de regiões organizadoras de nucléolo por nitrato de prata (Ag-RONs), bandamento C e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de genes ribossomais 18S e 5S. Os resultados revelaram $2n = 50$ cromossomos para todas as espécies. O bandamento C evidenciou variações na distribuição dos blocos heterocromáticos, com ocorrência de polimorfismo em *A. serratus*. Ocorreram RONS simples em *A. altiparanae* e *A. dissimilis*, enquanto as demais espécies apresentaram RONS múltiplas, em quase todos os casos confirmadas pelo rDNA de 18S. Foram observadas marcas rDNA 5S simples em *A. altiparanae*, *A. minor* e *A. serratus* e múltiplas em *A. bifasciatus*, *A. dissimilis* e *A. ribeirae*, todos localizados em segmentos intersticiais dos cromossomos. *Astyanax ribeirae* é considerado endêmico para bacia do Ribeira de Iguaçu, no entanto, foi encontrado pela primeira vez na bacia do Iguaçu. Esta evidência reforça a hipótese de compartilhamento de fauna entre rios do planalto cristalino e regiões costeiras no sul do Brasil. A diversidade cariotípica evidenciada para todas as espécies deve-se principalmente a rearranjos não Robertsonianos. Neste estudo foram apresentados os primeiros dados citogenéticos para o gênero *Astyanax* ocorrentes na região do médio Rio Iguaçu.

Palavras-chave: Cromossomos. Banda C. Ag-RONs. FISH.

Karyotypic diversity in *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from middle Rio Iguaçu**Abstract**

Astyanax is a highly specious taxon, highlighting among the neotropical fish comprises species with different evolutionary trends. Little is known about their diversity karyotype, especially for species restricted to certain watersheds. The fish fauna of the Rio Iguaçu basin is characterized by having a high endemism, possibly because its isolation of the Rio Paraná basin occurred about 22 million years caused by the emergence of the Iguaçu Falls. This study aimed to make the chromosome characterization of the *Astyanax* species from the middle Rio Iguaçu: *Astyanax altiparanae*, *A. bifasciatus*, *A. dissimilis*, *A. minor*, *A. ribeirae* and *A. serratus*, using karyotype marks in order to contribute to a more consistent evolutionary scenario of this group. To obtain the results were applied techniques based on conventional Giemsa staining, detection of nucleolar organizing regions by silver nitrate (Ag-NORs), C-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes of the ribosomal genes 18S and 5S. The results showed $2n = 50$ chromosomes for all species. The C-banding showed differences in the distribution of heterochromatic blocks, occurring polymorphism in *A. serratus*. The NORs were simple in *A. altiparanae* and *A. dissimilis*, while in the other species was multiple, in almost all cases confirmed by 18S rDNA located. Were observed 5S rDNA simple sites in *A. altiparanae*, *A. minor* and *A. serratus*, and multiple in *A. bifasciatus*, *A. dissimilis* and *A. ribeirae*, all located in interstitial chromosomes regions. *Astyanax ribeirae* is considered endemic for Ribeira de Iguape basin; however it was first time verified in the Iguaçu basin. This evidence reinforce the hypothesis that strengthening fauna sharing between rivers of the plateau and coastal regions in southern Brazil. The karyotype diversity evident for all species is mainly due to rearrangements non-Robertsonian. This study showed the first cytogenetic data for the *Astyanax* genus occurring in the Middle Rio Iguaçu.

Keywords: Chromosomes. Band C. Ag-NOR. FISH.

Introdução

A ictiofauna Neotropical merece destaque no cenário mundial, devido à ocorrência de aproximadamente 6.000 espécies de água doce (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003), grande parte desta diversidade de espécies pode ser atribuída à ordem dos Characiformes, a qual é amplamente distribuída na região Neotropical e também no continente Africano (NELSON, 2006; MARTINEZ et al., 2012). Atualmente esta ordem compreende 23 famílias, 270 gêneros que agrupam 3.428 espécies válidas, (OLIVEIRA et al., 2011; ESCHMEYER; FONG, 2014).

O gênero *Astyanax* descrito por Baird e Girard (1854) é representado por mais de 140 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2014). Considerado um dos mais especiosos entre os Characidae, os quais distribuem-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (LIMA et al., 2003). Este gênero inicialmente foi classificado como Tetragonopterinae (GÉRY, 1977), após revisão nesta subfamília houve a reorganização da sua sistemática, alocando *Astyanax* como *Incertae sedis*, onde encontram-se 88 gêneros de caracídeos (LIMA et al., 2003).

A citogenética é uma importante ferramenta utilizada na identificação e diferenciação das espécies de peixes (BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI, 1986), contribuindo expressivamente para um melhor entendimento da ictiofauna Neotropical, através da caracterização de marcadores cromossômicos, os quais possuem aplicações citotaxonômicas e evolutivas (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000; GALETTI; MARTINS, 2004).

Dados cariotípicos de *Astyanax* revelam um elevado grau de polimorfismo e variabilidade entre as espécies. O número diploide varia de 36 cromossomos em *A. schubarti* (MORELLI et al., 1983) até 50 cromossomos, sendo este último considerado número modal para o gênero (PAZZA; KAVALCO, 2007). Além de diferentes números diploides, este gênero apresenta polimorfismo da heterocromatina, variações quanto ao número e a localização das regiões organizadoras de nucléolo e dos sítios ribossomais 18S e 5S. (PAZZA; KAVALCO, 2007).

Muitas espécies de peixes encontram-se restritas a determinadas bacias hidrográficas, como ocorre na bacia do Rio Iguaçu, caracterizada por apresentar um elevado endemismo, estimado em 75% (GARAVELLO, 1997; ZAWADZKI; RENESTO; BINI, 1999). Esta situação provavelmente é resultado do seu isolamento da bacia do Rio Paraná, ocorrido há cerca de 22 milhões de anos pelo surgimento das Cataratas do Iguaçu (SEVERI; CORDEIRO, 1994).

O gênero *Astyanax* é considerado o mais diversificado e abundante na bacia do Iguaçu, compreendendo atualmente 14 espécies (INGENITO; DUBOC 2014), deste total apenas quatro possuem estudos citogenéticos, pertencendo para a região do alto ou baixo Rio Iguaçu, não havendo relato de descrição cariotípica para as espécies da região do médio Rio Iguaçu.

Em 2010, Garavello e Sampaio, descreveram novas espécies de *Astyanax* para esta bacia, as quais haviam sido definidas por Sampaio (1988), como *Astyanax* sp. B, *Astyanax* sp. C, *Astyanax* sp. D e *Astyanax* sp. E. Estas foram denominadas respectivamente como *A. bifasciatus*, *A. minor*, *A. serratus* e *A. dissimilis*. Entretanto, o posicionamento sistemático e evolutivo destas espécies frente aos demais *Astyanax* ainda é desconhecido, fazendo-se necessários estudos que visem à compreensão de sua diversidade e de suas relações evolutivas. O presente estudo objetivou realizar a caracterização cariotípica de espécies do gênero *Astyanax* do médio Rio Iguaçu, utilizando como ferramenta a citogenética clássica e molecular, a fim de contribuir com um cenário mais consistente acerca da evolução deste grupo.

Material e Métodos

Análises citogenéticas foram realizadas em seis espécies de *Astyanax* (total de 75 exemplares): *A. altiparanae* (7 fêmeas e 3 machos), *A. bifasciatus* (9 fêmeas e 8 machos) e *A. minor* (6 fêmeas e 3 machos) do Rio Iguaçu (26° 15' 1.11" S, 51° 06' 10.67" O), *A. dissimilis* (8 fêmeas e 4 machos) e *A. serratus* (10 fêmeas e 7 machos) do Rio Pintado (26° 16' 41.66" S, 51° 02' 55.10" O) e *A. ribeirae* (10 fêmeas) do Rio Claro (25° 57' 21,5" S, 50° 41' 07,2" O), todas pertencentes a região do médio Rio Iguaçu, Paraná, Brasil (Figura 2). A captura dos exemplares ocorreu com o auxílio de redes e varas de pesca (Licença do Ministério do Meio Ambiente/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade N° 15115-1). Os peixes foram sacrificados após serem anestesiados com óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000) antes dos procedimentos metodológicos. Todos exemplares foram identificados e depositados após fixação em formol 10% e álcool 70% na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA da Universidade Estadual de Maringá Paraná, Brasil (NUP 16029, NUP 16898, NUP 16895, NUP 16888, NUP 16900 e NUP 16890).

Para a obtenção de cromossomos mitóticos utilizou-se células provenientes da porção anterior do rim, de acordo com Bertollo; Takahashi e Moreira- Filho (1978) e Foresti;

Oliveira e Almeida-Toledo (1993). A detecção da heterocromatina constitutiva (bandas-C) ocorreu por meio da técnica de Sumner (1972), com alterações na coloração realizada com iodeto de propídio (LUI et al., 2009). A caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foi realizada conforme Howell e Black (1980). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986), realizada com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S, obtidas respectivamente a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2004) e de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI, 1999). As sondas foram marcadas com o *kit biotin Nick Translation* e *kit Dig Nick Translation*, segundo as recomendações do fabricante (Roche Applied Science). As reações de hibridização tiveram a estringência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 horas). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos anti-digoxigenina conjugada com rodamina e streptavidina conjugada com FITC (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield.

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41 para todos os exemplares, com no mínimo 30 metáfases consideradas por indivíduo para o estabelecimento do cariótipo padrão e número diploide modal. As melhores imagens foram capturadas com câmera digital Olympus DP71 com a utilização do software DP-Controller-BSW. Foram consideradas as melhores preparações cromossômicas para a realização dos ensaios de FISH, com no mínimo três exemplares analisados por espécie. Os resultados obtidos foram considerados após a repetição dos ensaios em triplicata para cada amostra, a fim de se obter o padrão representativo de marcações das diferentes sondas empregadas. Utilizou-se microscopia de epifluorescência para as preparações com FISH em microscópio Zeiss Axio Imager A2 com o software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®) acoplado a Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels. Para a montagem dos cariótipos os cromossomos foram classificados baseando-se na relação de braços (RB) proposta por Levan et al. (1964), e mensurados por meio do programa Easy Idio 1.0 (DINIZ; MELO, 2006). Calculou-se o número fundamental (NF) considerando metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos contendo dois braços e os cromossomos acrocêntricos contendo apenas um braço. Realizou-se a montagem dos cariótipos através da utilização de software Adobe Photoshop (versão PSD 14). Os idiogramas foram construídos a partir dos cariótipos, e respectiva RB, com o software Corel Draw v.X6, 2012 - Corel Corporation.

Resultados

As seis espécies de *Astyanax* (Tabela 2) estudadas apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos para ambos os sexos, porém a morfologia cromossômica variou entre as espécies com predominância de cromossomos com dois braços, exceto para *A. ribeirae*, que apresentou 17 pares acrocêntricos. Destaca-se em todas as espécies o primeiro par de cromossomos metacêntricos de tamanho significativamente maior que os demais do complemento. As fórmulas cariotípicas (FC) foram espécie-específicas (Figuras 3a, 3c, 3e, 4a, 4c, 4e) e (Tabela 2).

Os bandamentos cromossômicos evidenciaram marcações com nitrato de prata (Ag-RONs), (figuras 3b, 3d, 3f, 4b, 4d, 4f) mostraram-se simples em *A. altiparanae*, confirmada pela FISH com sonda 18S (Figuras 3b e 5b). Para *A. dissimilis*, as RONS apresentaram-se como simples, no entanto foi observado sítios múltiplos de marcações rDNA 18S (Figuras 3f e 5f). As demais espécies apresentaram um padrão de RONS múltiplas confirmadas pela FISH com rDNA 18S (Figuras 3d, 4b, 4d, 4e, 5d, 6b, 6d e 6f).

As marcações com o emprego da FISH com sonda de rDNA 5S ocorreram em apenas um par cromossômico nas espécies *A. altiparanae*, *A. minor* e *A. serratus* (Figuras 5b, 6b e 6f), enquanto as demais espécies apresentaram múltiplos sítios de sequências 5S (Figuras 5d, 5f e 6d). O padrão de localização da heterocromatina constitutiva (bandas-C) foi heterogêneo (Figuras 5a, 5c, 5e, 6a, 6c, 6e) destacando-se um acentuado polimorfismo em *A. serratus* indicado pelas setas (Figura 7). Os resultados foram sumarizados na tabela 2 que revisa os estudos cariotípico para as espécies e populações do gênero *Astyanax* da bacia do Rio Iguaçu até o momento. Descrições detalhadas da localização cariotípica dos marcadores cromossômicos obtidos podem ser visualizadas no idiograma (Figura 8). Não foi constatada a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados e de cromossomos supranumerários.

Discussão

Os resultados aqui obtidos confirmam algumas características conservadas entre os *Astyanax*, a exemplo do número diploide basal $2n = 50$ cromossomos, ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, além da presença do primeiro par do cariótipo sendo um cromossomo metacêntrico destacadamente maior que os demais cromossomos do complemento, condição esta encontrada com frequência em outros gêneros

da família Characidae (KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003). Do ponto de vista citogenético, estas características corroboram com um possível estruturamento evolutivo para o gênero *Astyanax*.

Apesar do conservadorismo do número diploide entre as espécies estudadas, verificou-se uma diversificação cariotípica, especialmente em relação ao número fundamental (NF) e a fórmula cariotípica (FC), desta maneira, sugerindo a possível ocorrência de eventos não robertsonianos entre estas espécies. Entretanto, tal diversificação não foi observada entre as populações analisadas quando comparadas a populações estudadas anteriormente, sendo *Astyanax bifasciatus* e *Astyanax* sp. B; *Astyanax minor* e *Astyanax* sp. C; *Astyanax serratus* e *Astyanax* sp. D (FAZOLI et al., 2003; KANTEK et al., 2008b). A espécie *Astyanax dissimilis* foi analisada citogeneticamente pela primeira vez neste estudo.

Astyanax altiparanae pode ser considerado um complexo de espécies, pelo fato de apresentar uma extensa variabilidade em sua macroestrutura cariotípica, constituída por diferentes FC e variações no número fundamental (NF= 76 a 100), observado tanto para as populações do Iguaçu; (PORTO; MARTINS-SANTOS, 2002; DOMINGUES et al., 2007; FERREIRA-NETO et al., 2009), como para populações proveniente de outros locais (TENÓRIO, 2013; FERNANDES et al., 2014; YANO; MOREIRA-FILHO; MARGARIDO, 2014). É evidente que as diferenças na FC identificadas para uma mesma espécie evidenciam o isolamento entre as diferentes populações, caracterizando a existência de unidades evolutivas distintas ao longo da bacia do Rio Iguaçu.

As espécies aqui estudadas apresentaram cariótipos compostos por todos os tipos cromossômicos, com predominância de cromossomos de dois braços, principalmente tipo submetacêntrico, observados também para outros *Astyanax* (PAZZA; KAVALCO, 2007). No entanto, dentre as espécies estudadas, *Astyanax ribeirae* evidenciou uma tendência evolutiva diferenciada, apresentando uma grande quantidade de cromossomos do tipo acrocêntricos, caso semelhante foi verificado por Kavalco, Pazza e Almeida-Toledo (2010), quando estudou a mesma espécie, proveniente da bacia do Rio Ribeira do Iguape, considerada seu local de origem (OYAKAWA et al., 2006),

Uma característica frequente para a maioria das espécies de *Astyanax* é a presença de RONS localizadas na região telomérica do braço curto de um par cromossômico tipo subtelocêntrico (TENÓRIO et al., 2013), o que também foi evidenciado no presente estudo. Foram detectadas RONS simples em *A. dissimilis* e *A. altiparanae*, e da mesma forma observadas para outras populações (DOMINGUES et al., 2007; PACHECO et al., 2011; FERREIRA- NETO et al., 2009; MARTINEZ et al., 2012), apesar de RONS múltiplas

aparecerem com maior frequência em populações de *A. altiparanae* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; PACHECO et al., 2011; FERREIRA-NETO et al., 2009; TENÓRIO, 2013; FERNANDES et al., 2014; YANO; MOREIRA-FILHO; MARGARIDO, 2014).

A ocorrência de RONS múltiplas é considerada relativamente comum entre espécies/populações de *Astyanax* (PAINTNER-MARQUES et al., 2002), como evidenciado para *A. bifasciatus*, *A. minor*, *A. ribeirae* e *A. serratus*, também verificado em outros estudos com as mesmas espécies (KANTEK, et al., 2007; 2008a; 2008b; KAVALCO; PAZZA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010). No entanto, nem todas as RONS foram coincidentes com o rDNA 18S, provavelmente em decorrência do baixo número de cópias destes genes e consequente fraco sinal fluorescente.

O padrão de bandamento C mostrou-se heterogêneo para a maioria das espécies estudadas. Entretanto, *A. serratus* apresentou variações intrapopulacionais, quanto ao número e localização de bandas de heterocromatina, destacando-se blocos heterocromáticos intersticiais em alguns cromossomos. Kantek et al., (2007) estudaram um caso semelhante em *Astyanax* sp. D (*A. serratus*) e atribuíram tais variações a inversões paracêntricas. Outro caso de polimorfismo foi registrados para *A. scabripinnis* por Mantovani et al. (2000).

Os polimorfismos nos blocos heterocromáticos podem ser explicados ainda por processos de trocas desiguais, amplificação, acumulação e eliminação (JOHN, 1988). Também pelo modelo de dispersão da heterocromatina, no qual as regiões teloméricas estão mais propícias a transferência material genético devido à sua proximidade dentro do núcleo interfásico, promovido pela ordenação de cromossomos (SCHWEIZER; LOIDL, 1987).

O modelo de eventos de dispersão de Schweizer e Loidl, (1987), também é utilizado para explicar a acentuada variabilidade em relação aos sítios cromossômicos de rDNA 45S, os quais encontram-se localizados nas regiões teloméricas, facilitando a sua dispersão. Todas as espécies analisadas evidenciaram sítios de rDNA 18S em posições terminais dos cromossomos, com destaque *A. ribeirae* que apresentou um elevado número deste sítios. Uma possível explicação para este evento foi obtida por Silva et al. (2013), quando observou rDNA 18S em *Astyanax bockmanni* co-localizado a um elemento transponível (Retroelemento - Rex3), o qual possivelmente seria o responsável pela dispersão do rDNA 18S.

O mapeamento de sequências do gene de rDNA 5S realizados em todas as espécies analisadas evidenciou que tais sítios frequentemente localizam-se nos segmentos intersticiais dos cromossomos. Este padrão de localização cromossômica parece corresponder a uma condição ancestral para os peixes (PENDÁS et al., 1994; MARTINS; GALETTI, 1999; 2001)

representando alguma vantagem no genoma, indicando que estes *clusters* estão protegidos de possíveis mudanças na estrutura cariotípica (MARTINS; GALETTI, 1999; MARTINS; WASKO, 2004).

As espécies *A. altiparanae*, *A. minor* e *A. serratus* evidenciaram um único par de rDNA 5S, também verificado para outras populações (DOMINGUES et al 2007; FERREIRA-NETO et al., 2009; KANTEK et al., 2008b; HASHIMOTO et al., 2010). Para *A. bifasciatus*, *A. dissimilis* e *A. ribeirae* apresentaram rDNA 5S múltiplos, com encontrado em outros estudos (KANTEK et al., 2008b; KAVALCO; PAZZA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010).

A organização não sintênica entre o rDNA 5S e as RONS foi observado entre as espécies estudadas, indicando uma situação comum entre os peixes (LUCCHINI et al., 1993) e um padrão mais frequente entre os vertebrados (SUZUKI et al., 1996).

Por outro lado, verificou-se sintonia entre os sítios ribossômicos 18S e 5S apenas para *A. ribeirae*, semelhante a *Astyanax scabripinnis* (MANTOVANI et al., 2005) e *Astyanax janeiroensis* (VICARI et al. 2006). Almeida-Toledo et al. (2002), obtiveram resultados parecidos para algumas espécies de *Astyanax*, com rDNA 5S co-localizado ao rDNA 28S, e atribuíram os elementos transponíveis como os responsáveis por tais associações.

Apesar disso, a ocorrência de *A. ribeirae* é enigmática na bacia do Rio Iguaçu, sendo o primeiro relato desta espécie na bacia. Embora seja uma indicação pontual para um afluente da margem direita do Rio Iguaçu (Rio Claro), levanta-se a hipótese de introdução ou de captura desta espécie a partir da bacia litorânea da bacia do Rio Ribeira de Iguape, ocorrido ao longo da história geomorfológica da formação da atual bacia do Rio Iguaçu. Esta hipótese reforça a ideia de compartilhamento de fauna entre rios do planalto do cristalino e drenagens costeiras, proposto por Ribeiro (2006). Outros casos de intercâmbio de fauna já haviam sido registrados (ARTONI et al., 2004; INGENITO et al., 2004; OYAKAWA; AKAMA; ZANATA, 2005; VICARI et al., 2005).

Em síntese o presente trabalho apresenta novos dados acerca da citogenética de *Astyanax* que corroboram informações anteriores quanto a sua diversidade cariotípica e enfatiza a importância dos marcadores cromossômicos para a citotaxonomia das espécies de *Astyanax* da bacia do Rio Iguaçu. Novos dados foram apresentados para populações de espécies de *Astyanax* já estudadas de outras localidades na bacia e destacamos ainda a primeira descrição cariotípica para a espécie *A. dissimilis*. Variações interpopulacionais foram evidenciadas para *A. altiparanae* e a ocorrência de *A. ribeirae* foi anotada pela primeira vez na bacia do Rio Iguaçu. Ambas as situações são discutidas no contexto da possível introdução

destas espécies na bacia do Rio Iguaçu, enquanto as demais aqui analisadas são endêmicas a este rio.

Tabela 2: Dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Astyanax* pertencentes à bacia do Rio Iguaçu.

(Continua)

Espécie	Rio/Localidade	2n	NF	FC	Ag-RONs	18S	5S	Ref.
<i>A. altiparanae</i>	Rio Iguaçu, Piraquara (PR)	50	94	6m+30sm+8st+6a	simples	simples	simples	1
<i>Astyanax</i> sp. B (<i>A. bifasciatus</i>)	Rio Iguaçu, Piraquara (PR)	50	84	4m+22sm+8st+16a	simples	simples	múltiplos	2
<i>Astyanax</i> sp. C (<i>A. minor</i>)	Rio Iguaçu, Piraquara (PR)	50	84	4m+22sm+8st+16a	simples			3
<i>Astyanax</i> sp. C (<i>A. minor</i>)	São José dos Pinhais (PR)	50	84	4m+22sm+8st+16a	múltiplas			3
<i>Astyanax</i> sp. C (<i>A. minor</i>)	Rio Iguaçu, Piraquara (PR)	50	84	4m+22sm+8st+16a	múltiplas	múltiplos	simples	2
<i>Astyanax</i> sp. D (<i>A. serratus</i>)	Rio Iguaçu, Rio Poço Claro, Curitiba (PR)	50	84	4m+24sm+6st+16a				4
<i>Astyanax</i> sp. D (<i>A. serratus</i>)	Rio Iguaçu, Piraquara (PR)	50	84	4m+24sm+6st+16a	múltiplas			5
<i>Astyanax</i> sp. D (<i>A. serratus</i>)	Rio Bicudo, Balsa Nova (PR)	50	84	4m+24sm+6st+16a	múltiplas	múltiplos	simples	2
<i>A. altiparanae</i>	Rio Iguaçu, União da Vitória (PR)	50	92	10m+24sm+8st+8a	simples	simples	múltiplos	6
<i>A. bifasciatus</i>	Rio Iguaçu, União da Vitória (PR)	50	86	6m+24sm+6st+14a	múltiplas	múltiplos	múltiplos	6
<i>A. dissimilis</i>	Rio Pintado, Porto União (SC)	50	92	6m+24sm+12st+8a	simples	múltiplos	múltiplos	6

								(Conclusão)
<i>A. minor</i>	Rio Iguaçu , União da Vitória (PR)	50	84	4m+22sm+8st+16a	múltiplas	múltiplos	simples	6
<i>A. ribeirae</i>	Rio Claro, União da Vitória (PR)	50	66	6m+6sm+4st+34a	múltiplas	múltiplos	múltiplos	6
<i>A. serratus</i>	Rio Pintado, Porto União (SC)	50	84	4m+24sm+6st+16a	múltiplas	múltiplos	simples	6
<i>A.altiparanae</i>	Rio Iguaçu, Salto Caxias (PR)	50	90	10m+26sm+4st+10a	múltiplas			7
<i>A.altiparanae</i>	Rio Jordão, Manguairinha (PR)	50	92	6m+28sm+8st+8a	múltiplas	múltiplos	simples	8
<i>Astyanax</i> sp. B (<i>A. bifasciatus</i>)	Rio Iguaçu, Reservatório de Salto Caxias (PR)	50	86	6m+24sm+6st+14a				9

Nota: 2n = número diploide (m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st= subtelocêntrico; a= acrocêntrico); NF= número fundamental; FC= fórmula cariotípica; Ag-RONs= regiões organizadoras de nucléolo impregnadas com nitrato de prata; 18S e 5S= sítio de DNA ribossômico; Ref.= referências: 1-(DOMINGUES *et al.*, 2007); 2-(KANTEK *et al.*, 2008b); 3- (KANTEK; FENOCCIO; CESTARI, 2003); 4 – (KANTEK *et al.*, 2008a); 5- (KANTEK *et al.*, 2007); 6- (PRESENTE ESTUDO); 7- (PORTO; MARTINS-SANTOS, 2002); 8- (FERREIRA NETO *et al.*, 2009); 9- (FAZOLI *et al.*, 2003).

Legenda: Região do Alto Iguaçu , Médio Iguaçu  e Baixo Iguaçu .

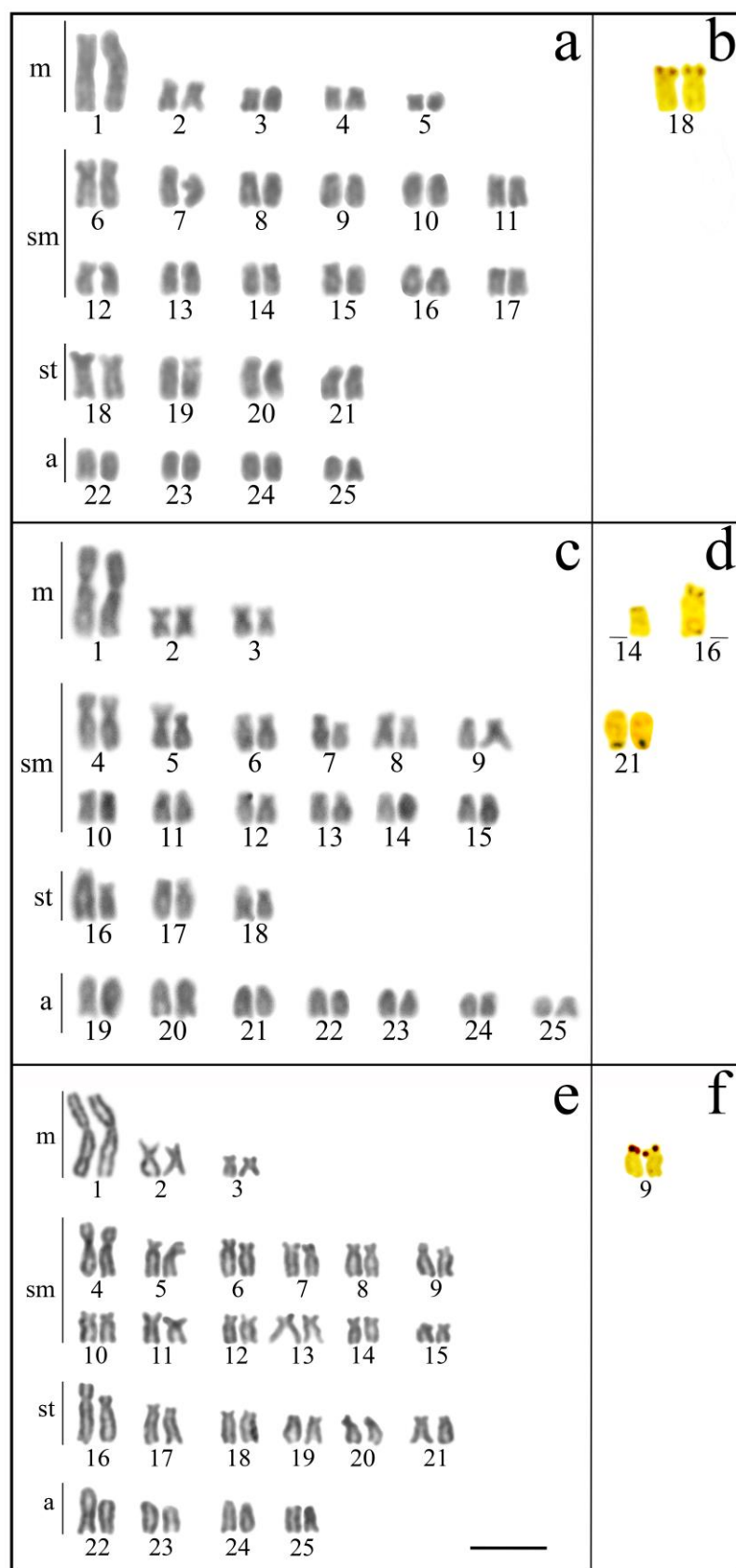


Figura 3: Cariótipos de *A. altiparanae* (a, b), *A. bifasciatus* (c, d) e *A. dissimilis* (e, f) após coloração convencional com Giemsa (lado esquerdo). Em destaque na cor amarela os cromossomos portadores das Ag-RONs (lado direito). Barra=10 μm.

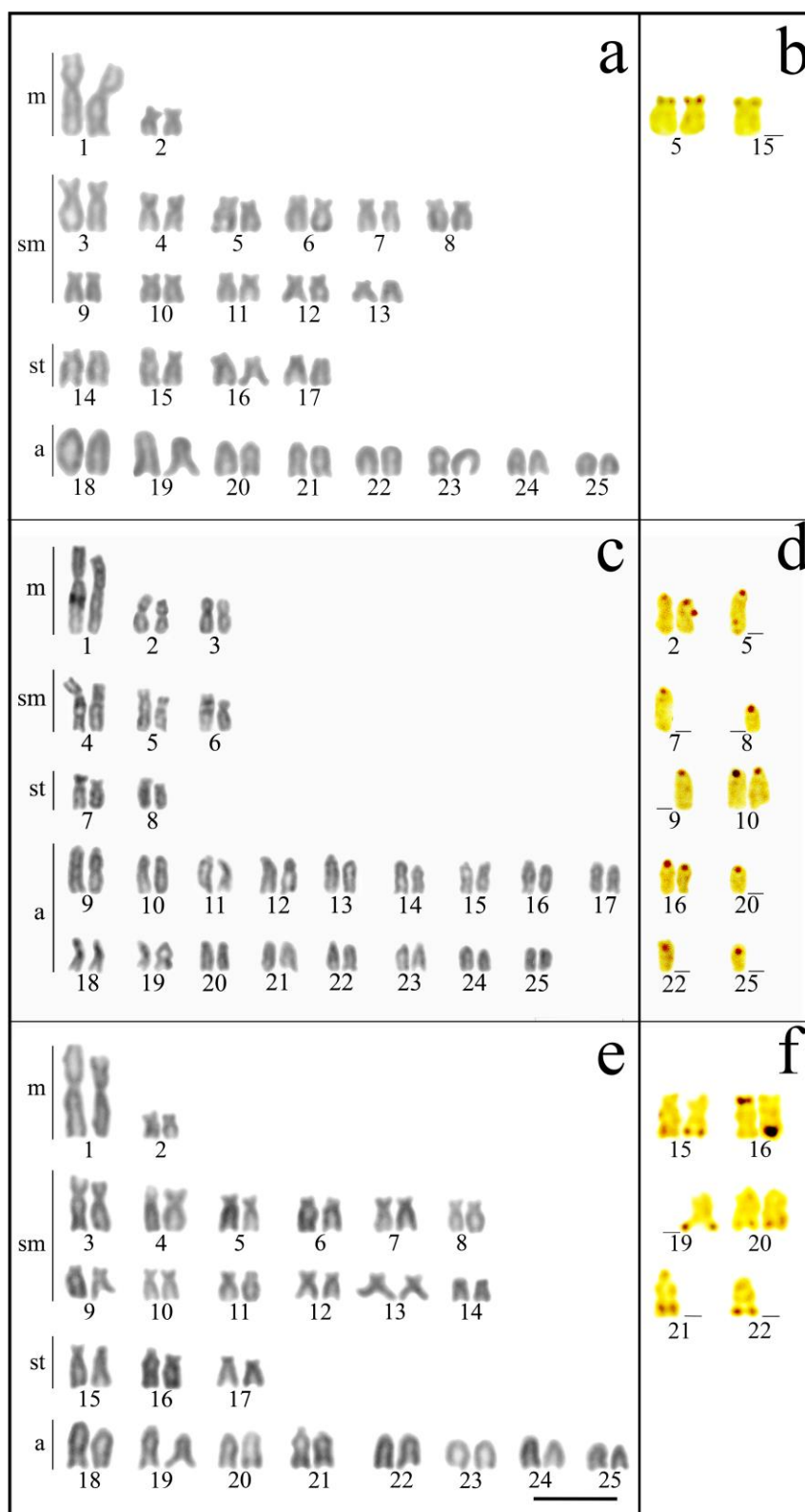


Figura 4: Cariótipos de *A. minor* (a, b), *A. ribeirae* (c, d) e *A. serratus* (e, f) após coloração convencional com Giemsa (lado esquerdo). Em destaque na cor amarela os cromossomos portadores das Ag-RONs (lado direito). Barra=10 μm.

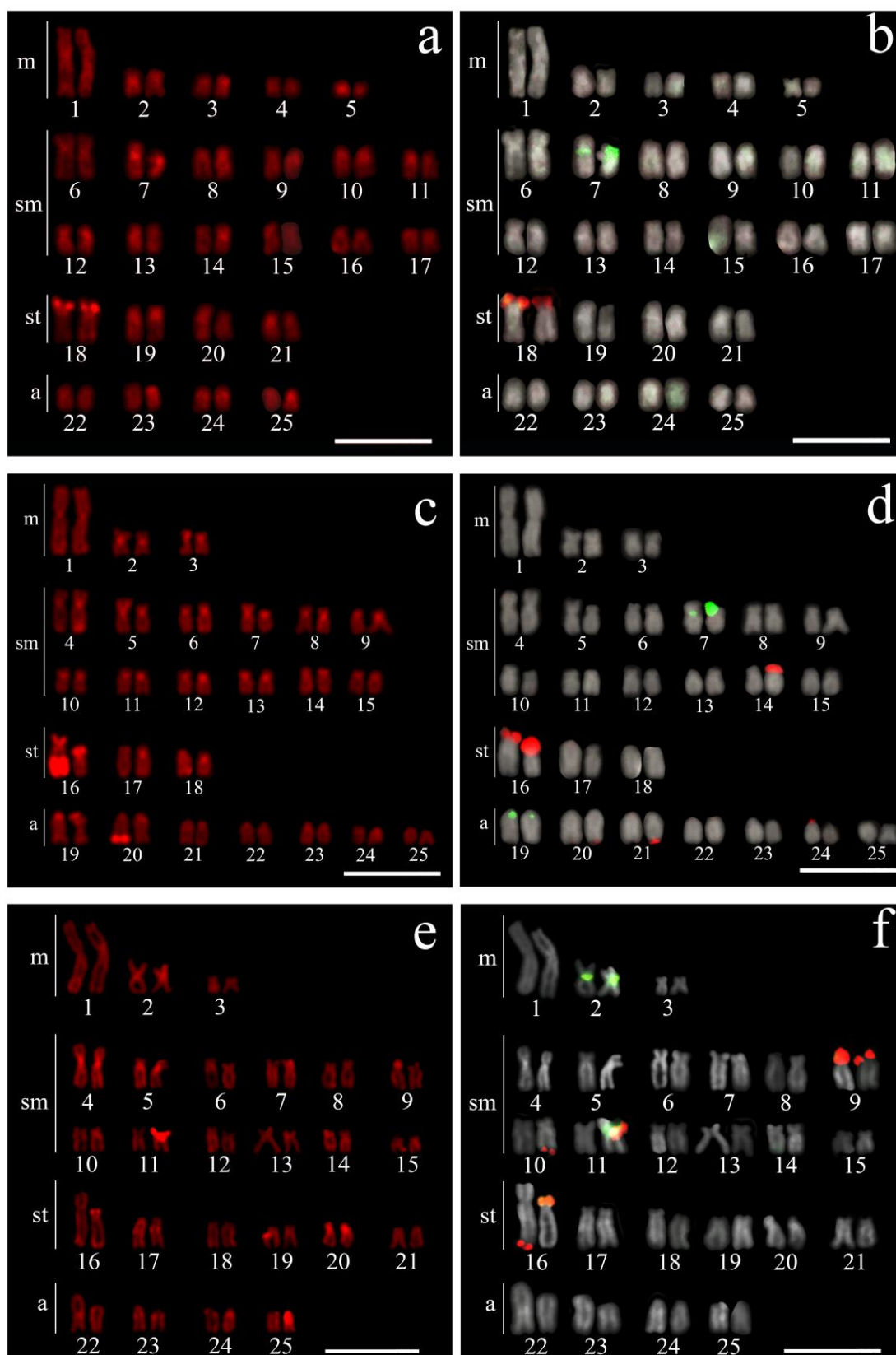


Figura 5: Cariótipos de *A. altiparanae* (a, b), *A. bifasciatus* (c, d) e *A. dissimilis* (e, f) após bandamento C (lado esquerdo) e aplicação da técnica FISH (lado direito) com sondas rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). Barra=10 μm.

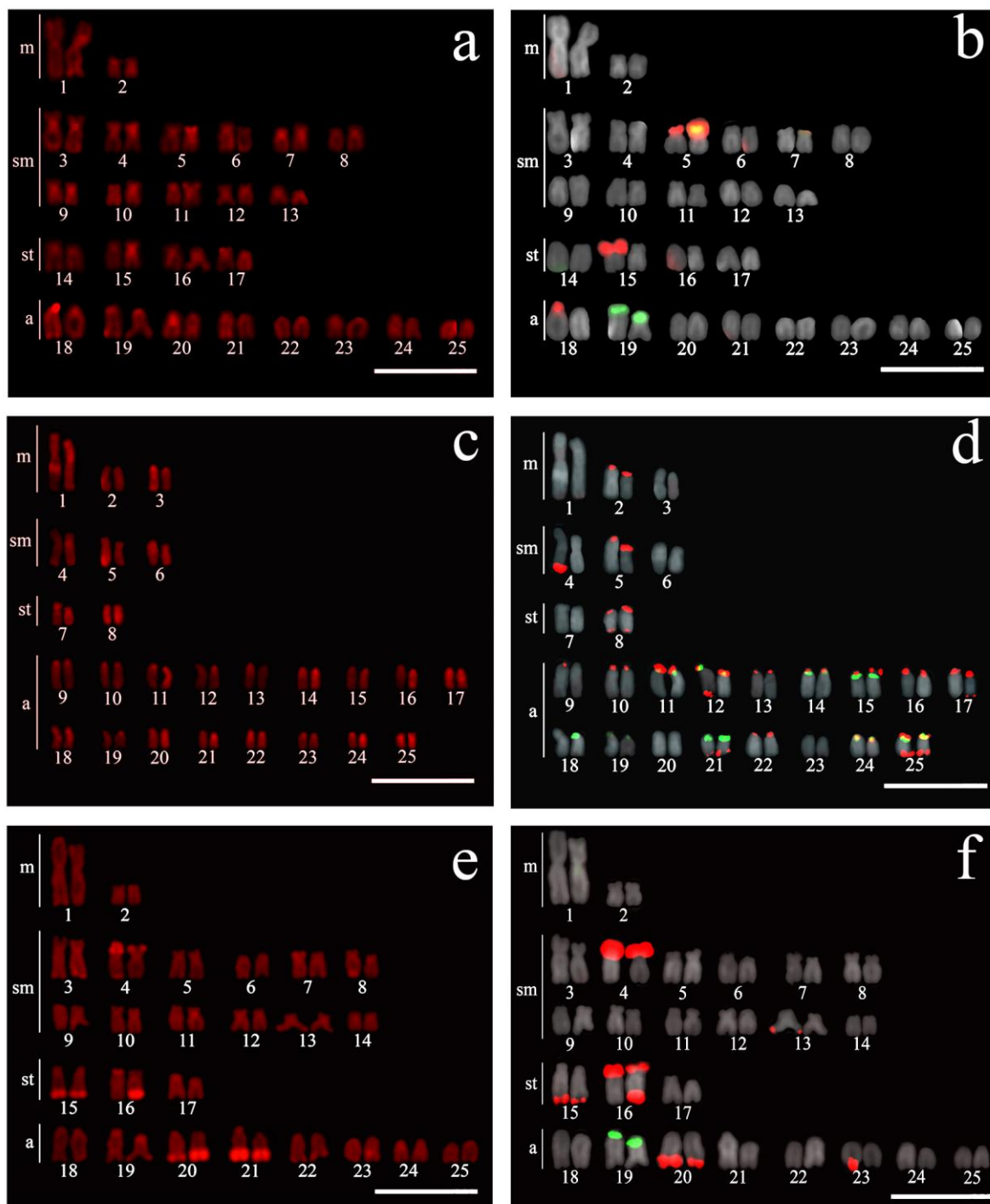


Figura 6: Cariótipos *A. minor* (a, b), *A. ribeirae* (c, d) e *A. serratus* (e, f) após bandamento C (lado esquerdo) e aplicação da técnica FISH (lado direito) com sondas rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). Barra=10 μm.

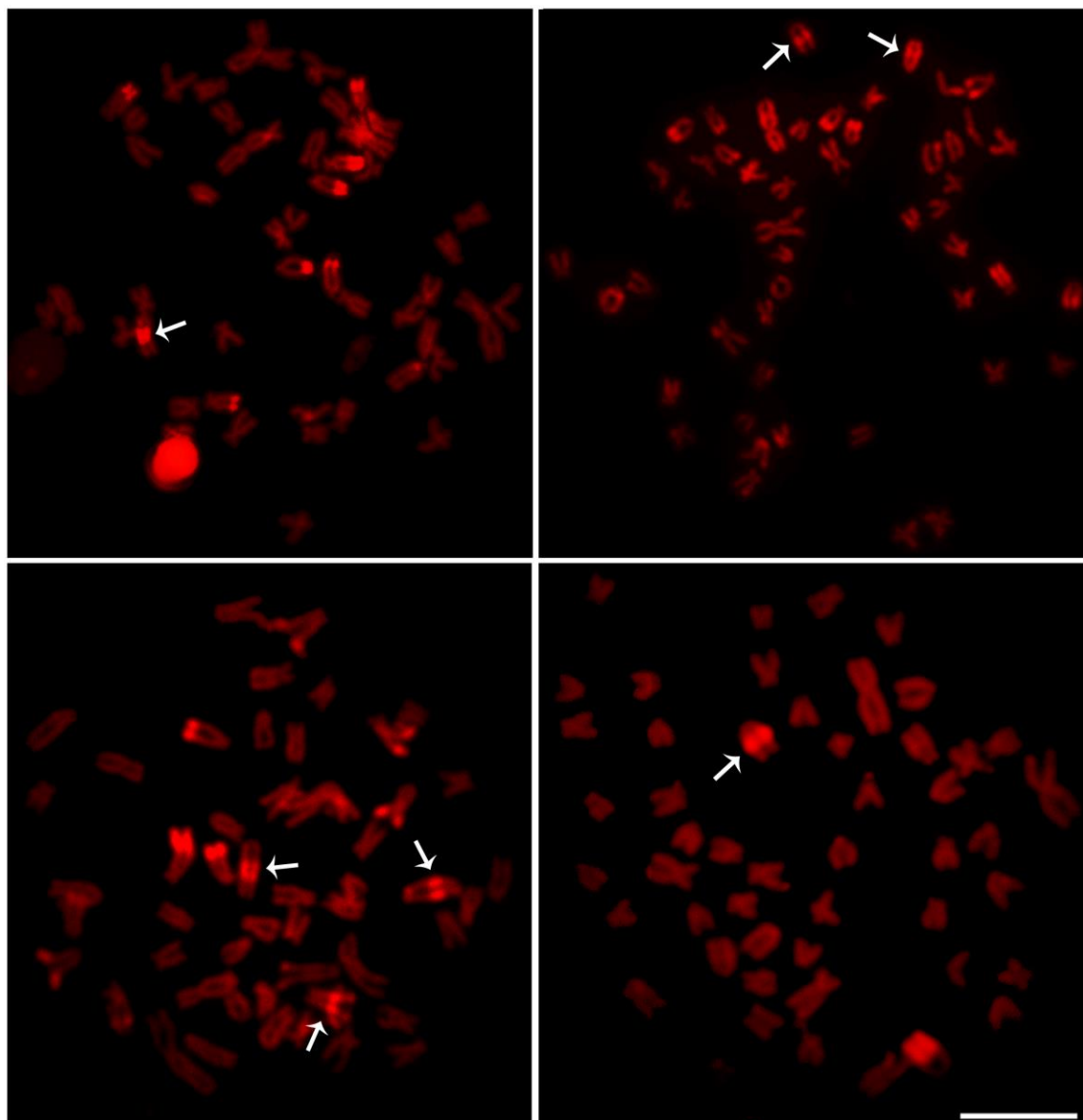


Figura 7: Metáfases de *A. serratus* submetidas à técnica de bandamento C, as setas indicam a localização dos blocos heterocromáticos intersticiais. Barra =10 μ m.

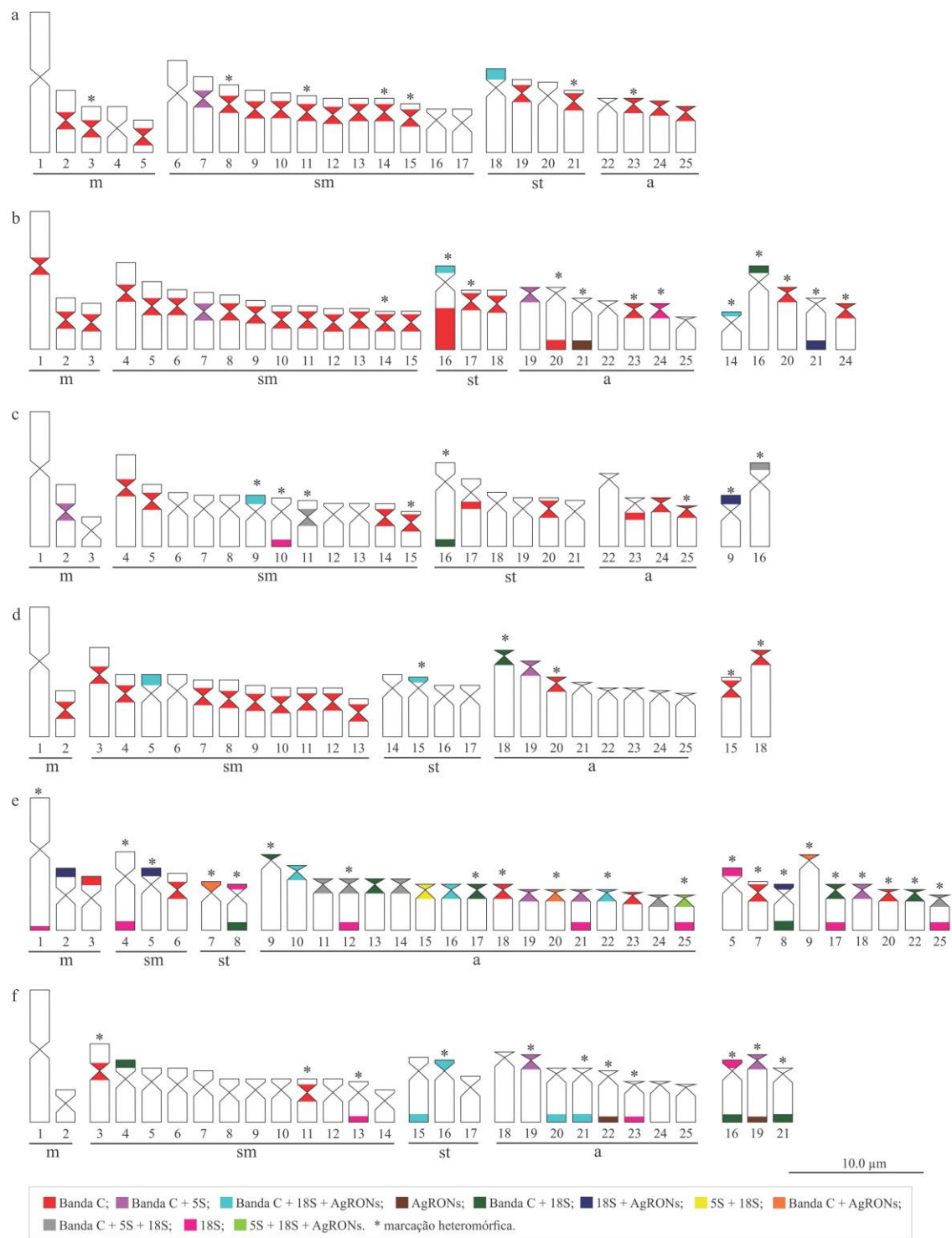


Figura 8: Idiograma: *A. altiparanae* (a), *A. bifasciatus* (b), *A. dissimilis* (c), *A. minor* (d), *A. ribeirae* (e) e *A. serratus* (f). Dados obtidos com com diferentes metodologias.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou os primeiros dados citogenéticos para o gênero *Astyanax* ocorrente na região do médio Rio Iguaçu. Foram caracterizados citogeneticamente *A. altiparanae*, *A. bifasciatus*, *A. dissimilis*, *A. minor*, *A. ribeirae* e *A. serratus*. Todos evidenciaram número diploide igual a 50 cromossomos, confirmando o conservadorismo para o gênero. Como também a presença do primeiro par cromossômico destacadamente maior que os demais do complemento, condição esta conservada para a família Characidae.

Foram verificadas variações interespecíficas, no que se refere à fórmula cariotípica e número fundamental, confirmando a diversidade cariotípica encontrada para o gênero *Astyanax* e indicando que possíveis rearranjos não Robertsonianos estejam envolvidos no processo evolutivo deste grupo.

Evidenciou-se elevado número de cromossomos tipo submetacêntricos para a maioria das espécies, com exceção de *A. ribeirae*, predominando cromossomos tipo acrocêntricos. Tal espécie esta descrita como endêmica da Bacia do Rio Ribeira de Iguape, no entanto foi encontrada pela primeira vez na região do médio Rio Iguaçu, este fato reforça a ideia de intercâmbio de fauna entre os rios do planalto do cristalino e regiões costeiras no sul do Brasil.

O bandamento C mostrou-se heterogêneo para a maioria das espécies, ocorrendo tanto em regiões pericentroméricas e teloméricas, como também blocos intersticiais em *A. dissimilis*, o qual foi estudado citogeneticamente pela primeira vez. Em *A. serratus*, ocorreram variações intrapopulacionais quanto ao número e a posição destes blocos, possivelmente devido inversões paracêntricas.

As seis espécies apresentaram Ag-RONs localizadas na região telomérica do braço curto de um par cromossômico tipo subtelocêntrico, considerado uma característica conservada para o gênero. Apesar de ocorrerem Ag-RONs simples, na grande parte das espécies estudadas elas foram evidenciadas em multiplicidade, sendo na maioria das vezes confirmadas pela rDNA 18S.

Entre as espécies analisadas verificaram-se genes ribossomais 5S localizados nas regiões intersticiais dos cromossomos, o que também acontece com frequência em outras espécies de peixes.

Astyanax ribeirae destacou-se por apresentar um elevado número de sítios de rDNA 18S e 5S, que mostraram-se em sintonia e co-localizados. Possivelmente estes sítios estejam associados a elementos transponíveis, tornando-os dispersos pelo genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L. F. A new species of freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v.1587, p. 43-52, 2007.
- AGOSTINHO, et al. Riscos da implantação de cultivos de espécies exóticas em tanques-redes em reservatórios do Rio Iguaçu. **Opinião**, v.2, n.2, 1999.
- ALCARAZ, H. S. V.; PAVANELLI, C. S.; BERTACO, V. A. *Astyanax jordanensis* (Ostariophysi, Characidae), a new species from the rio Iguaçu basin, Paraná, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.2, p. 185-190, 2009.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Research**, v.97, p. 229-233, 2002.
- ALMIRÓN, A. D.; AZPELIQUETA, M. L. M.; CASCIOITTA, J. R., *Astyanax ita* sp. n., a new species from the Rio Iguazú basin, in Argentina (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum**, v.52, p. 3-10, 2002.
- ARAI, R. Fish Karyotype. **Check List**, 2011. 340 p.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. **Biological and Health Sciences**, v.6, n.1, p. 43-60, 2000.
- ARTONI, R. F. et al. Cytogenetics of two sympatric *Corydoras* species (Pisces, Siluriformes, Channichthyidae) of southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v.1, n.1b, p. 191-198, 2004.
- BAUMGARTNER, D. et al. Fish, Salto Osório Reservoir, Iguaçu River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v.2, n.1, p. 1-4, 2006.
- BAUMGARTNER, G., et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 2012. 203p.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, n.2, p. 103-120, 1978.
- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. Cytogenetics and taxonomy: consideration baseado n chromosome studies of freshwater fish. **Journal Fish Biology**, v.28, p. 153-159, 1986.

BIFF, A. G. et al. Composição específica e abundância da ictiofauna do rio dos Padres, bacia do rio Iguaçu, Brasil. **Biological Sciences**, v.28, n.3, p. 203-211, 2006.

BOISVERT, F. M. et al. The multifunctional nucleolus. **Molecular Cell Biology**, v.8, p. 574-585, 2007.

BRASIL. Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica**. Curitiba, 2010.

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 do São Francisco)**. 3 ed. Minas Gerais: Codesvasf, 1988. 115p.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. **Ecologia de peixes de riachos**, v.6, Rio de Janeiro: Série Oecologia Brasiliensis, 1999.

CHAO, L. N. et al. Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro basin, Amazonia, Brazil. Manaus. In: **Copeia: American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, Amazonas: Universidade do Amazonas. 2001. 310 p.

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, n.3, 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. **Cytogenetic and Genome Research**, v.109, p. 497-501, 2005.

DINIZ, D.; MELO, P. X. Easy Idio, version 1.0, 2006.

DOMINGUES, M. S.; et al. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**. v.5, n.1, p. 37-44, 2007.

DOUDNA, J. A.; RATH, V. L. Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier. **Cell**, v.109, p.153–156, 2002.

EIGENMANN, C. H. New characins in the collection of the Carnegie Museum. **Annals of the Carnegie Museum**, v.8, n.1, p. 164-180, 1911.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, v.43, n.3, p.209-310, 1921.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, v.43, n.4, p.311-428, 1927.

ELETROSUL. **O impacto ambiental da ação do homem sobre a natureza – rio Iguaçu, Paraná, Brasil – reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios**. Florianópolis: Eletrosul, 1978. 33 p.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, R. (Eds.). 2014. Catalog of Fishes, California Academy of Sciences. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>> acesso em: 15 out. 2014.

FAZOLI, L. C. et al. Chromosome characterization of *Astyanax* sp. B (Characidae, Tetragonopterinae), na endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brazil. **Cytologia**, v.68, n.4, p. 389-394, 2003.

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

FERNANDES, C.A. Cytogenetic and Morphometric Analysis in the Species *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Iguatemi River Basin, Brazil. **Folia Biologica**, v.62, n.3, p. 193-201, 2014.

FERREIRA-NETO, M.; et al. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.4, p. 792-796, 2009.

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

FROESE R.; PAULY D. (Eds). FishBase. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. acesso em: 18 jun. 2014.

GALETTI-JR., P. M. Chromosome diversity in Neotropical fishes NOR studies. **Italian Journal of Zoology**, v.65, p. 53-56, 1998.

GALETTI JR., P. M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização in situ para conhecimento dos cromossomos de peixes. In: GUERRA, M. (Org). **FISH: Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 61-88,

GARAVELLO, J. C. Descrição de *Apareiodon vittatus* sp. n. do Rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, n. 2, p. 447-455, 1977.

GARAVELLO, J. C.; PAVANELLI, C. S.; SUZUKI, H. Caracterização da ictiofauna do Rio Iguaçu. In AGOSTINHO, A. A.; GOMES, LC. (Eds.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM. p. 61-84. 1997.

GARAVELLO, J. C.; SAMPAIO, F. A. A. Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.3, p. 847-865, 2010.

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

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 Ciências e Tecnologia da PUCRS, **Série Zoológica**. v.13, p. 65-88, 2000.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. New Jersey ou Neptune, T. F. H. Publications, 1977, 672p.

GODOY, M. P. **Rio Iguaçu, Paraná, Brasil, Reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios**. Florianópolis: Eletrosul, 1979. 33 p.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal Fish Biology**, v.57, n.6, p. 1453-1464, 2000.

HALUCH, C. F.; ABILHOA, V. *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei: Characidae) from the upper Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.3, n.3, p. 383-388, 2005.

HASEMAN, J. D. Some new species of fishes from the Rio Iguassu. **Annals Carnegie Museum**, v.7, n.3-4, p. 374-387, 1911.

HASHIMOTO, D. T. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, p. 64-71, 2011.

HATANAKA, T.; GALETTI JR.R.; P. M. Mapping of the 18S and 5S Ribosomal RNA Genes in the Fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, n.3, p. 239-244, 2004.

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

INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L. F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** - Umuarama, v.7, n.1, p. 23-36, 2004.

INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L. F. A new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.12, n.2, p. 281-290, 2014.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Caryologia**, v.56, p. 281-287, 2003.

JIM, S. M.; TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Ciência e. Cultura**, v.27, p. 1122-1124, 1975.

JOHN, B. **Heterochromatin**: molecular and structural aspects. United State: Cambridge University, 1988. 147 p.

JÚLIO JR., H. F.; BONECKER, C. C.; AGOSTINHO, A. A. Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L.C. (Ed.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997. p. 1-17.

KANTEK, D. L. Z.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M. Cytogenetic characterization and NOR polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from the First Plateau of the Iguaçu River (Paraná State, Brazil). **Cytologia**, v.68, n.1, p. 19-24, 2003.

KANTEK, D. L. Z. et al. Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu river basin. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.50, n.1, p. 67-74, 2007.

KANTEK, D. L. Z. et al. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei: Characiformes) species endemic to the Iguaçu River. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p. 239–242, 2008a.

KANTEK, D. L. Z. et al. Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Upper Iguaçu River Basin: confirmation of the occurrence of distinct evolutionary units. **Journal of Fish Biology**, v.73, p. 2012–2020, 2008b.

KANTEK, D. L. Z. et al. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**, v.75, p. 408–421, 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, p. 453-461, 2003.

KAVALCO, K. L. et al. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 529-535, 2007.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest. **Nucleus**, v.53, n1-2, p. 51-44, 2010.

LEVAN, A. FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclatura for Centromeric Position on Chromosomes. **Hereditas**, v.25, n.2, p. 201-220, 1964.

LIMA, F. C. T. et al. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 729.

LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. Polimorphim of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalemus petersi* (Anfibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescent in situ hybridization. **Chromosome Research**, v.6, p. 621-628, 1998.

LUI, R. L. et al. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**, v. 40, n.5-6, p.552-559, 2009.

LUCCHINI, S.; et al. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S +28S AND 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, v.36, p.762-773, 1993.

MAACK, R. **Geografia física do estado do Paraná**. 2. ed. Rio de Janeiro: Livraria José Olympio, 1981. 442 p.

MAACK, R. Breves Notícias Sobre a Geologia dos Estados do Paraná e Santa Catarina **Brazilian Archives of Biology and Technology**, p.169-288, 2001.

MALABARBA, L. R. Monophyly of Cheirodontinae, characters and major clades. 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, 1998. p. 603.

MANTOVANI, M.; et al. 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.; et al. O Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** v.123, p.211-216, 2005.

MARTINEZ, E. R. M.; Cytogenetic analysis in the *Incertae Sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti , Britzki, *Hyphessobrycon eques* Steindachner, (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin **Comparative Cytogenetic**, v.6, p. 41–51, 2012.

MARTINS, C.; GALETTI JR., R., P M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v.7, p. 363-367, 1999.

MARTINS, C.; GALETTI-JR.R, P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica**, v.111, p. 439-446, 2001.

MARTINS, C.; WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S Ribosomal DNA in the fish genome. In Williams, C.R. (Ed). Focus on Genome Research. **Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge**, p. 335-363, 2004.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B.G. **Fish Cytogenetics**, New Hampshire: Science Publisher, p. 421-453. 2007.

MENEZES, N. A.; GÉRY, J. Seven new acestrorhynchin characid fishes (Osteichthyes, Ostariophysi, Characiformes) with comments on the systematics of the group. **Revue Suisse Zoologie**, v.90, n.3, p. 563-592, 1983.

MIRANDE, J. M.; AGUILERA, G.; AZPELICUETA, M.M. A new genus and species of small characid (Ostariophysi, Characidae) from the upper rio Bermejo basin, northwestern Argentina. **Revue Suisse Zoology**, v.111,p. 715-728, 2004.

MIRANDE, J. M.; AGUILERA, G.; AZPELICUETA, M.M. Nomenclatural note on the genus Nans (Ostariophysi, Characidae). **Revue Suisse Zoology**, v.113, p. 305, 2006.

MIRANDE, J. M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v.25, p. 574-613, 2009.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n.3, p. 385-568, 2010.

MINEROPAR. Serviço Geológico do Paraná. **Geologia e geomorfologia do Paraná**. Disponível em: <<http://www.mineropar.pr.gov.br>>. Acesso em 23 jul. 2010.

MINEROPAR. Serviço Geológico do Paraná. **Geologia e geomorfologia do Paraná**. Disponível em: <<http://www.mineropar.pr.gov.br>>. Acesso em 20 out. 2014.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish. **Brazilian Journal Genetics**, v.14, p.1085-1090, 1991.

MORELLI, S. et al. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v.36, n.3, p. 235-244, 1983.

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

OLIVEIRA, C.; et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **Evolutionary Biology**, v.11, p. 1-25, 2011.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology**, v.46, p.75-100, 1997.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Ribeira de Iguape basin, with descriptions of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v.921, p. 1-27, 2005.

OYAKAWA, O. T., et al. **Peixes de riachos da Mata Atlântica**. São Paulo: Editora Neotropical, 2006.

PAIVA, M. P. **Grandes Represas do Brasil**. Brasília: Editerra, 1982. 304p.

PACHECO A. B.; et al. Cytogenetic comparison between two allopatric populations the *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *Comp. Cytogen*, v.5, p.237-246, 2011.

PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetraodoninae) **Hereditas**, v.137, p. 107-112, 2002.

PARANÁ. Resolução nº49, de 20 de dezembro de 2006. Dispõe sobre a instituição de Regiões Hidrográficas, Bacias Hidrográficas e Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado do Paraná. **SEMA: Secretaria do Estado do Meio Ambiente e de Recursos Hídricos**. Conselho Estadual de Recursos Hídricos.

PAVANELLI, S. C.; OLIVEIRA, C. A. O. A redescription of *Astyanax gymnodontus* (Eigenmann, 1911), new combination, a polymorphic characid fish from the rio Iguaçu basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.4, p. 569-578, 2009.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the Neotropical characin *Astyanax* (teleostei, Characidae). **The nucleus**, v.50, n.3, p. 519-543, 2007.

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.

PENDÁS, A. M. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.67, p. 31-36, 1994.

PERES, W. A. M.; et al. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, v.137, p. 305-311, 2009.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washignton, v.83, n.9, p. 2934-2938, 1986.

PHILLIPS, R. B.; REED, K. M. Application of fluorecence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics. **Aquaculture**, v.40, p. 197-216, 1996.

PORTO, F. E.; MARTINS-SANTOS, I. C. Diversidade cariotípica em populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae) das bacias do rio Paraná e Iguaçu. **IX Simpósio de. Citogenética e Genética de Peixes**, Maringá, PR, p. 3, 2002.

PRIOLI, S. M. A. P. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p. 421-430, 2002.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucs, 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.

SAMPAIO, F. A. A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysii) da bacia do rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo dessa fauna**. 1988, 175 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1988.

SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia.IV.Differentiation of GC-and AT-Rich Chromosome Regions in Anura. **Chromosoma**, v.77, p. 83-103, 1980.

SCHWEIZER, D.; LOID, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band pattern. **Chromosome Today**, v.9, p.61-74, 1987.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A. A. M. **Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçu**. Curitiba. 1994. 118 p.

SILVA, D. Z. A. et al. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**, v.141, p. 329-336, 2013.

SUMNER A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, n.1. p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990. 434 p.

SUMNER, A. T. **Chromosome organization and function**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003, 287 p.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat 5s rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.72, n.19, p. 1-4, 1996.

TENÓRIO, R. C. C. O. et al. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n. 3, p. 553-564, 2013.

VAZZOLER, A. E. A., MENEZES, N. A. Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Brasil Biologia** v. 52 p. 627-640, 1992.

VICARI, M. R.; et al. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, vol.28, n.1, p. 103-110, 2005.

VICARI, M. R. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p. 621-625, 2006.

WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A.; WEITZMAN, M. J. Phylogenetic biogeography of the glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: VANZOLINI, P. E.; HEYER, W. R. **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 488.

WEITZMAN, S. H., VARI, R. P. Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. v.101, n.2, p. 444-465, 1988.

WEITZMAN, S.H. et al. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.3, p. 329-360, 2005.

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, v. 69, n.6, p. 790-798, 2014.

ZANATA, A. M.; AKAMA, A. *Myxiops aphos*, new characid genus and species (Characiformes: Characidae) from the rio Lencóis, Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.2, p.45–54, 2004

ZARSKE, A.; GÉRY, J. Beschreibung einer neuen Salmier-Gattung und zweier neuer Arten (Teleostei: Characiformes: Characidae) aus Peru und Brasilien. **Zoologische Abhandlungen**, v.55, p. 31-49, 2006.

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; BINI, L.M. Genetic and morphometric análisis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). **Revue Suisse de Zoologie**, v.106, p. 91-105, 1999.

ANEXOS

Anexo 1: Licença permanente para a coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 1511-1



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2

Anexo 2: Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade de Ponta Grossa



PARECER Nº 02/2008
Protocolo: 04509/08

Em reunião ordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **"Biodiversidade, Citogenética e Preservação dos Peixes dos Campos Gerais II"** de responsabilidade do Pesquisador Roberto Ferreira Artoni.

Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAL - SCEEa

.....
Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus
Coordenador substituto da SCEEa

Anexo 3: OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS: PREPARAÇÕES DIRETAS (*in vivo*) (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA- FILHO, 1978).

Todos os exemplares foram anestesiados antes de serem sacrificados, através da administração de óleo de cravo (GRIFFTHIS, 2000).

1. Injetar intra-abdominalmente uma solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso do animal. Manter o peixe em aquário bem aerado durante 30 - 40 minutos.

2. Anestesiá-lo com óleo de cravo, sacrificando-o em seguida.

3. Retirar uma porção do rim anterior, transferindo-a para uma cuba contendo cerca de 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), pré-aquecida à 37°C e dissociar as células com pinças de dissecação e seringa hipodérmica desprovida de agulha.

4. Incubar o material em estufa à 37°C durante 25 - 30 minutos.

5. Retirar a suspensão celular da estufa e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur transferir o material para um tubo de ensaio, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.

6. Adicionar de 5 a 10 gotas de fixador Carnoy (3 partes de metanol para uma parte de ácido acético) recém preparado, ressuspender levemente o material com a pipeta de Pasteur. Centrifugar durante 10 minutos à 1200 rpm.

7. Descartar o material sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Adicionar de 5 a 7 mL de fixador, ressuspender o material e centrifugar por mais 10 minutos.

8. Repetir o passo 7 mais duas vezes.

6. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, retirar o sobrenadante e acrescentar 7- 10 mL de fixador. Ressuspender o material e centrifugar durante 10 minutos.

7. Repetir o passo 6 mais duas vezes.

8. Após a última centrifugação eliminar o sobrenadante, adicionar de 1 a 2 mL de fixador (dependendo da quantidade material obtido) e ressuspender o material.

9. Acondicionar em tubos de plástico tipo Eppendorf, e armazená-los no freezer.

Anexo 4: OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS: PREPARAÇÕES INDIRETAS (*in vitro*) (FORESTI; OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO, 1993)

Todos os exemplares foram anestesiados antes de serem sacrificados, através da administração de óleo de cravo (GRIFFTHIS, 2000).

1. Anestesiado o animal com óleo de cravo, sacrificando-o em seguida.
2. Retirar uma porção do rim anterior, transferindo-a para uma cuba contendo cerca de 6 mL de meio de cultura celular RPMI, dissociar as células com pinças de dissecação e seringa hipodérmica desprovida de agulha.
3. Transferir a suspensão celular para um tubo de centrífuga, utilizando uma pipeta de Pasteur, adicionar de 1-3 gotas de solução aquosa de colchicina (0,025%) homogeneizando-as bem com o material.
4. Incubar o material à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, centrifugá-lo durante 10 minutos à 1200 rpm.
5. Descartar o sobrenadante e adicionar 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M), com auxílio de uma pipeta de Pasteur e ressuspender bem o material. Incubá-lo em uma estufa à 37°C, por mais 30 minutos.
6. Retirar a suspensão celular da estufa e adicionar de 5 a 10 gotas de fixador Carnoy (3 partes de metanol para uma parte de ácido acético) recém preparado, ressuspender levemente o material com a pipeta de Pasteur. Levar à centrífuga durante 10 minutos à 1200 rpm.
7. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 7-10 mL de fixador. Centrifugar por 10 minutos à 1200 rpm.
8. Repetir o passo 7 por mais duas vezes.
9. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar de 1-2 mL de fixador e ressuspender o material.
10. Acondicionar o material em tubos plásticos tipo Eppendorf e guardá-los no freezer.

PREPARO DE LÂMINAS

Obtenção das metáfases por meio do procedimento de coloração convencional com Giemsa:

- 1- Pingar de uma a três gotas de suspensão celular sobre uma lâmina recém lavada e escaldada com água à 60°C, permitindo que o excesso de material escorra sobre papel absorvente.
- 2- Colocar as lâminas em um suporte, para que sequem em temperatura ambiente.
- 3- Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), pH= 6,8, por 7 a 10 minutos.
- 4- Lavar as lâminas com água destilada e secar naturalmente.

Anexo 5: DETERMINAÇÃO DE HETEROCROMATINA COSTITUTIVA (SUMNER, 1972), COM MODIFICAÇÕES (LUI et al., 2009)

- 1- Incubar a lâmina em solução de HCl 0,2N à 42°C por aproximadamente 10 min.
- 2- Lavar em água corrente e deixar secar.
- 3- Colocar a lâmina em solução aquosa de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 5% recém preparado durante 2 a 3 min em temperatura ambiente.
- 4- Mergulhar três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar.
- 5- Incubar a lâmina em solução salina 2xSSC (pH=6,8) à 60°C por aproximadamente 45 min.
- 6- Lavar em água corrente e deixar secar.
- 7- Corar as lâminas com iodeto de propídio, em uma proporção de 50 µg/mL diluído em 200 µL “antifade” (1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid) e cobri-las com uma lamínula.

Anexo 6: DETERMINAÇÃO DAS Ag-RONS (HOWELL; BLACK,1980)

- 1- Colocar sobre uma lâmina previamente preparada duas ou três gotas de solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina incolor + 50 mL de H_2O + 0,5 mL de ácido fórmico).
- 2- Adicionar sobre cada gota de gelatina uma gota de água destilada e 2 gotas de AgNO_3 50%3- Cobrir com lamínula e colocar em estufa á 60°C durante três a seis minutos.
- 4- Lavar em água corrente, retirando a lamínula.
- 5- Secar a lâmina e observar ao microscópio de campo claro.

Anexo 7: HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM SONDAS FLUORESCENTES (FISH) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986)**Preparações das sondas**

A obtenção da sonda de DNA ribossômico 18S ocorreu a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (Prochilodontidae) (HATANAKA; GALETTI, 2004) e a sonda de rDNA 5S a partir de DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) (MARTINS; GALETTI, 1999). Para a marcação da sonda rDNA 18S foi utilizado biotina-16-dUTP (*kit nick translation Biotin-Nick Translation Mix*) e para a sonda do rDNA 5S, digoxigenina -11-dUTP (*kit DIG-Nick Translation Mix*), segundo as orientações do fabricante (Roche Applied Science). As misturas de hibridização tiveram a estringência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 horas). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos anti-digoxigenina conjugada com rodamina e streptavidina conjugada com FITC (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contra corados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector).

Tratamento com RNase

- 1- Lavar as lâminas, contendo as preparações cromossômicas, em tampão PBS 1X durante 3 minutos, em temperatura ambiente e com agitação.
- 2- Desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) durante 3 minutos e secá-las ao ar livre.
- 3- Incubar as lâminas em solução com 100 μL de RNase (0,4% RNase/2xSSC), sob lamínula, à 37°C por 1 hora em câmara úmida com água mili-Q.
- 4- Lavar as lâminas em solução de 2xSSC três vezes, durante 3 minutos cada vez;
- 5- Em seguida, lavar em PBS 1X durante 5 minutos;

Tratamento com Pepsina

- 6- Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCL) em temperatura ambiente.
- 7- Lavar em PBS 1x durante 5 minutos com agitação, em temperatura ambiente.

Fixação

- 8- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1X / 50mM MgCl₂ 50mM durante 10 minutos à temperatura ambiente.

9- Lavar em PBS 1X por 5 minutos, com agitação.

10- Desidratar das lâminas em série de alcoólica (70%, 85% e 100%) por 3 minutos e secá-las ao ar livre.

Pré-hibridação

11- Simultaneamente a desidratação em série de alcoólica, desnaturar a solução de hibridação à 100°C durante 10 minutos e passá-los imediatamente ao gelo até sua utilização.

12- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC à 70°C por 5 minutos.

13- Desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos e deixar secar.

Hibridação

14- Preparar a câmara úmida 37°C.

15- Aliquotar sobre cada lâmina 50 µL de solução de hibridação, cobrir com uma lamínula e deixar durante 16 horas à 37° C.

Lavagens (Segundo dia)

16- Lavar 2 vezes em formamida 15% / 0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10 minutos cada, com agitação.

17- Lavar as lâminas durante 3 minutos em solução de Tween 0,05%/ 4xSSC, em temperatura ambiente, com agitação.

Bloqueio

18- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM / 4xSSC por 15 minutos.

19- Lavar as lâminas duas vezes por 3 minutos cada com Tween 0,05%/ 4xSSC, em temperatura ambiente, com agitação.

Deteção de duas sondas DOUBLE FISH

20- Incubar as lâminas com 100 µL cada do mix de anticorpos streptavidina conjugada com FITC e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science) durante 1 hora em câmara úmida e escura em temperatura ambiente.

21- Lavar as lâminas por três vezes com Tween 0,05%/ 4xSSC em temperatura ambiente, durante 3 minutos cada, com agitação.

22- Desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada banho e secá-las ao ar livre.

Montagem das lâminas com DAPI

23- Misturar 400 µL de antifading mais 1µL de DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector).

24- Colocar 50 µl da mistura e cobrir com laminula. Guardar em local escuro.

ESTUDOS CARIOTÍPICOS (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964)

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes). As metáfases foram capturadas com câmera digital Olympus DP71 acoplada ao microscópio de Olympus BX 41, com a utilização do programa DP- Controller-BSW. As preparações com fluorocromos ocorreram em um microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels.

As melhores imagens foram utilizadas para montar os cariótipos, nos quais os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico), através de utilização de software Adobe Photoshop (versão PSD 14). A classificação cromossômica adotada foi proposta por Levan, Fredga e Sandberg (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido segue:

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).

Para a determinação do número fundamental os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados contendo dois braços e os cromossomos acrocêntricos contendo apenas um braço.