

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

DIANA CORNELIO

Biologia reprodutiva e presença de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis*
(Teleostei: Characidae)

Ponta Grossa

2013

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

DIANA CORNELIO

Biologia reprodutiva e presença de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis*
(Teleostei: Characidae)

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

Orientador: Roberto Ferreira Artoni
Co-orientador: Orlando Moreira-Filho

Ponta Grossa

2013

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

Cornelio, Diana
C814 Biologia reprodutiva e presença de
 cromossomo B em *Astyanax scabripinnis*
 (Teleostei: Characidae)/ Diana Cornelio.
 Ponta Grossa, 2013.
 100f.

 Dissertação (Mestrado em Biologia
 Evolutiva - Área de Concentração: Biologia
 Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta
 Grossa e Universidade Estadual do
 Centro-Oeste.

 Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira
 Artoni.

 Co-Orientador: Prof. Dr. Orlando
 Moreira-Filho.

 1.RGS. 2.RHS. 3.Proporção sexual.
 4.FISH. 5.Citogenética. I.Artoni, Roberto
 Ferreira. II. Moreira-Filho, Orlando.
 III. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Universidade Estadual do
 Centro-Oeste. Mestrado em Biologia
 Evolutiva. IV. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

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. 02/2013

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 **DIANA CORNELIO**.

Aos oito dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, 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) **DIANA CORNELIO**, 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), Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG) Drª Thais Saad Sczepanski (UENP). 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: "**Biologia Reprodutiva e Presença de Cromossomo B em *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae)**". 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, 08 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello

Profª Drª Thais Saad Sczepanski

Dedico esse trabalho a todos da minha família, mas em especial aos meus avós paternos e à minha tia; ao meu esposo que não mediu esforços em cuidar das nossas filhas e às minhas filhas que chegaram nesse momento importante da minha vida me proporcionando um crescimento pessoal enorme.

Agradecimentos

Aos meus avós, João Cornelio da Conceição e Zulmira Bueno da Conceição, pelo esforço e batalhas da vida. Graças a vocês cheguei até aqui. Muito obrigada por tudo. Ao meu esposo e pai das minhas filhas, por ser realmente o pai delas não apenas no vocativo, cuidando delas para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório: Patricia Barbosa, Marcela Baer Pucci, Bárbara Gardim de Melo, Michele Andressa Vier Wolski, Karina Coelho, Michelle Orane Schemberger, Tajiana Costa da Silva, Leonardo Gusso Goll, Alain Victor de Barros Barbosa e Paulo Vinicius Svidnicki pela colaboração e companheirismo. Fico grata principalmente ao Luiz Oliveira e ao Jonathan Pena Castro pela ajuda com a morfometria.

Agradeço especialmente aos meus amigos, Leonardo Gusso Goll, Vanessa Kowalski e Fernanda Maria Cordeiro de Oliveira, se não fosse a Fernanda não teria feito esse mestrado. Obrigada a vocês pelos momentos de descontração e pelos conselhos quando necessários. Vocês são pessoas em quem acredito que posso confiar sempre.

Agradeço ao técnico do laboratório Miguel Airton Carvalho, pela amizade e por estar sempre disposto a ajudar e aos professores: Marcelo Ricardo Vicari, Viviane Nogaroto Vicari e Mara Cristina de Almeida, pela amizade, paciência e explicações. Muito obrigada.

Agradeço ao meu co-orientador professor Orlando Moreira-Filho e aos técnicos do seu laboratório (UFSCAR) pela coleta dos exemplares.

Agradeço em especial ao meu orientador, Roberto Ferreira Artoni. Pela oportunidade e principalmente pela confiança depositada em mim mesmo no momento que tomou conhecimento da minha gravidez. Pela orientação, conhecimento, discussões e idéias. Mas principalmente pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo. Muito obrigada por tudo!

Agradeço às agências CNPq, CAPES e FAPESP, pelo apoio e financiamento do projeto de pesquisa e ao IBAMA pela autorização de coleta dos espécimes.

“Ser Feliz

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

Augusto Cury, 2003

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perde, o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer...e morrem como se nunca tivessem vivido.”

Dalai Lama

Resumo

Astyanax scabripinnis é uma espécie encontrada na Região Neotropical, essa espécie forma demes populacionais isolados em cabeceiras de riachos. Ela é taxonomicamente mal resolvida, mas se apresenta como interessante modelo para o estudo da presença de cromossomos B. A ocorrência desses cromossomos em *A. scabripinnis* pode estar associada a diversos fatores ambientais e populacionais, embora seja pouco esclarecido sobre a manutenção parasítica ou possíveis efeitos heteróticos desses cromossomos. A biologia reprodutiva relacionada à presença de cromossomo B em *A. scabripinnis* nunca foi abordada. Assim, foi objeto deste trabalho investigar se aspectos do processo reprodutivo, fundamental para o valor adaptativo, podem estar relacionados à presença de cromossomos B em *A. scabripinnis*. As coletas foram realizadas trimestralmente entre os anos de 2012 e 2013 na região de Campos do Jordão, São Paulo, Brasil (22°40'49,5"S, 45°23'31,9" W), no Córrego da Fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul. As gônadas foram classificadas macro e microscopicamente segundo estádios de desenvolvimento. Estabeleceu-se sazonalmente a proporção sexual da população nas diferentes amostragens. Foi calculada a relação gonadosomática (RGS) e a relação hepatossomática (RHS) separadamente para fêmeas com e sem cromossomo B. A presença de cromossomos B foi confirmada por meio da citogenética clássica e molecular com o emprego de sonda específica do cromossomo B construída por microdissecção cromossômica e amplificação por Degenerated Oligonucleotids Primers (DOP-PCR) e posterior *hibridação fluorescente in situ* (FISH). Análises de morfometria geométrica foram realizadas separadamente para fêmeas e machos com e sem a presença de cromossomos B. Os resultados indicam que a proporção sexual variou sazonalmente havendo um aumento do número dos machos em relação às fêmeas. Foram encontrados indivíduos hermafroditas na frequência de 7,7%. O período reprodutivo é caracterizado por um pico de reprodução atípico no período do inverno, além do período padrão observado a partir da primavera no mês de setembro. A presença de cromossomos B foi relacionada a possíveis estratégias reprodutivas distintas na população estudada, especialmente em relação ao aporte energético e estádios de desenvolvimento gonadal. Há diferenças morfométrica tanto entre indivíduos fêmeas e machos como entre indivíduos com e sem cromossomo B.

Palavras- chave: RGS, RHS, proporção sexual, FISH, citogenética.

Abstract

Astyanax scabripinnis is a species found in the neotropics, this species forms demes isolated populations in headwater streams. It is taxonomically unresolved, but is presented as an interesting model to study the presence of chromosomal B. The occurrence of these chromosomes in *A. scabripinnis* may be associated with various environmental factors and population, although little savvy about maintaining parasitic or possible heterotic effects of these chromosomes. The reproductive biology related to the presence of B chromosomes in *A. scabripinnis* never been addressed. Thus, the object of this study was to investigate whether aspects of the reproductive process, fundamental to the adaptive value may be related to the presence of B chromosomes in *A. scabripinnis*. Samples were collected quarterly between the years 2012 and 2013 in Campos do Jordao, Sao Paulo, Brazil (22 ° 40' 49.5 "S, 45 ° 23' 31.9 "W) at Stream Farm Lavrinha basin of the Paraíba do Sul. The gonads were classified macroscopically and microscopically second stages of development. Settled seasonally sex ratio of the population in the different samples. We calculated the gonadosomatic ratio (GSR) and the relationship hepatossomática (RHS) separately for females with and without chromosome B. The presence of B chromosomes was confirmed by classical cytogenetic and molecular with the use of chromosome specific probe B constructed by chromosome microdissection and amplification Degenerated Oligonucleotids Primers (DOP-PCR) and subsequent in situ hybridization (FISH). Geometric morphometric analysis were performed separately for males and females with and without the presence of chromosomes B. The results indicate that the sex ratio varied seasonally having an increased number of males compared to females. Hermaphrodite individuals were found at a frequency of 7.7%. The reproductive period is characterized by an atypical reproductive peak during the winter period, beyond the period observed pattern from the spring in September. The presence of B chromosomes has been linked to possible reproductive strategies in different populations studied, especially in relation to energy intake and stages of gonadal development. There morphometric differences both between individuals female and male subjects with and without chromosome B.

Keywords: GSR, HSR, sex ratio, FISH, cytogenetics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Exemplar de <i>Astyanax scabripinnis</i> macho do Córrego Fazenda Lavrinha (Campos do Jordão- SP).....	22
FIGURA 2-	Mapa com a localização da estação de coleta.....	22
FIGURA 3-	Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica..	25
FIGURA 4-	Proporção de fêmeas, machos e hermafroditas.....	36
FIGURA 5-	A) Metáfase mitótica de espécime com cromossomo B (seta). B) Núcleos de espécime que porta cromossomo B. C) Núcleos de espécime que não possui cromossomo B.....	36
FIGURA 6-	Porcentagem de fêmeas, machos e hermafroditas com cromossomo B por período de coleta.....	37
FIGURA 7-	Relação gonadossomática e hepatossomática das fêmeas e machos com e sem cromossomo B nos diferentes períodos de amostragem.....	37
FIGURA 8-	A) Relação gonadossomática (RGS) e hepatossomática (RHS) aplicada aos espécimes fêmeas de <i>Astyanax scabripinnis</i> ; B) Relação gonadossomática (RGS) e hepatossomática (RHS) aplicada aos espécimes machos de <i>Astyanax scabripinnis</i>	38
FIGURA 9-	Ovários de <i>Astyanax scabripinnis</i> - A) Estádio imaturo; B) Estádio em maturação; C) Estádio maduro; D) Estádio parcialmente esgotado; E) Estádio em repouso e F) Vista macroscópica de um ovário no estágio maduro.....	39
FIGURA 10-	Testículos de <i>Astyanax scabripinnis</i> - A) Estádio imaturo; B) Estádio em maturação inicial; C) Estádio em maturação; D) Estádio em maturação diferenciada; E) Estádio maduro; F) Estádio parcialmente esgotado. Marcações verdes indicam proporção da quantidade de espermatozóides durante o desenvolvimento do testículo.....	40
FIGURA 11-	Gônadas de espécimes hermafroditas de <i>Astyanax scabripinnis</i> : A) flecha preta= lóbulo feminino da gônada, flecha branca= lóbulo masculino da gônada; B) fotografia A ampliada; C e D) flechas pretas= ovócitos maduros, flechas brancas= espermatozóides.....	41
FIGURA 12-	Exemplar hermafrodita de <i>Astyanax scabripinnis</i> com gônadas em regressão. Seta vermelho= testículo, Seta amarelo= ovário..	41
FIGURA 13-	Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas e machos de <i>Astyanax scabripinnis</i> com e sem	

	cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de abril/maio/junho.....	42
FIGURA 14-	Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas de <i>Astyanax scabripinnis</i> com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de julho/agosto/setembro.....	42
FIGURA 15	Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas de <i>Astyanax scabripinnis</i> com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de outubro/novembro/dezembro.....	42
FIGURA 16	Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas de <i>Astyanax scabripinnis</i> com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de janeiro/fevereiro/março.....	42
FIGURA 17	Porcentagem de fêmeas e machos com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal. A) abril/ maio/junho (2012); B) julho, agosto, setembro (2012); C) outubro/novembro/dezembro (2012) e D) janeiro, fevereiro, março (2013).....	43
FIGURA 18	Células germinativas femininas: A) Ov= ovogônias, OI= ovócitos I, OII= ovócitos II; B) OII= ovócito II; C) OIII= ovócito III; D) OIV= ovócito IV; E) CA= célula atrésica e F) FA= folículo atrésico.....	51
FIGURA 19	Posição dos escores da combinação das duas variáveis (sexo e presença do cromossomo B) em <i>Astyanax scabripinnis</i> , no espaço do primeiro e do segundo eixo canônico. No eixo x= variável sexo; no eixo y= variável presença do cromossomo B...	53
FIGURA 20	Células germinativas femininas: A) Ov= ovogônias, OI= ovócitos I, OII= ovócitos II; B) OII= ovócito II; C) OIII= ovócito III; D) OIV= ovócito IV; E) CA= célula atrésica e F) FA= folículo atrésico.....	97
FIGURA 21	Células germinativas masculinas: A) OVI= ovogônia primária, OVII= ovogônias secundárias; B) SPT= espermatócitos, SPZ= espermatozoides; C) SPZ= espermatozoides; D) S= células de sertoli.....	98

SUMÁRIO

1.	Introdução geral.....	12
1.1	Diversidade de peixes com ênfase em Characiformes.....	12
1.2	Sistemática de Characiformes com ênfase em Characiformes.....	12
1.3	Caracterização morfológica e cariotípica de <i>Astyanax scabripinnis</i>	13
1.4	Cromossomos B ou supranumerários.....	14
1.5	Determinação e diferenciação do sexo (Hermafroditismo).....	16
1.6	Reprodução de peixes com ênfase no gênero <i>Astyanax</i>	16
1.7	Morfometria e sua aplicação em trabalhos com peixes.....	19
2.	Objetivo.....	21
3.	Material e métodos.....	21
3.1	Amostragem.....	22
3.2	Citogenética convencional.....	23
3.3	Citogenética Molecular.....	23
3.4	Histologia e parâmetros biométricos.....	23
3.5	Morfometria geométrica.....	24
4.	Resultados	25
	Capítulo I: Hermafroditismo e presença de cromossomo B em <i>Astyanax scabripinnis</i> (Teleostei: Characidae).....	26
	Capítulo II: Cromossomos B e diferenças morfométricas em <i>Astyanax scabripinnis</i> (Teleostei: Characidae).....	44
5.	Considerações finais.....	53
6.	Referências Bibliográficas.....	54
7.	Anexos.....	61
7.1	Protocolo de Citogenética convencional.....	61

7.2	Protocolo de Citogenética molecular.....	62
7.3	Protocolo de Histologia.....	65
7.4	Quadro 1: Escala para classificação macroscópica das gônadas segundo Vazzoler (1996).....	67
7.5	Quadro 2: Descrição das células femininas encontradas nos ovários.....	68
7.6	Quadro 3: Descrição das células masculinas encontradas nos testículos.....	69
7.7	Relatório dos dados gerados pela análise morfométrica, pelo software Morpho J 1.02J (Klingenberg, 2008) e Past 2.10 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).....	69
7.8	Tabelas com dados.....	83
7.9	Quadro 4: Dados de pluviosidade e temperatura da estação Campos do Jordão SP (OMM: 83714) Latitude (graus): -22.75 Longitude (graus): -45.6 Altitude (metros): 1642.00.....	96
7.10	Licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc.no. 15115-1).....	99

1. Introdução Geral

1.1 Diversidade de peixes com ênfase em Characiformes

Os peixes possuem cerca de 31.600 espécies descritas (FROESE; PAULY, 2010). Esses apresentam uma imensa diversidade de formas, comportamento e modos de vida, o que permite que eles ocupem os mais variados habitats. A maior diversidade e riqueza de espécies é encontrada em águas da região Neotropical, onde são conhecidas cerca de 4.475 espécies de peixes de água doce, agrupadas em 71 famílias (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Shaefer (1998) estimou que existam cerca de 8.000 espécies de peixes nessa região, considerando apenas os de água doce, o que corresponde a aproximadamente 24% da diversidade mundial (VARI; MALABARBA, 1998).

A ordem Characiformes possui aproximadamente 1674 espécies, agrupadas em 18 famílias e em aproximadamente 270 gêneros com ocorrência na África, no sul da América do Norte, na América Central e na América do Sul (NELSON, 2006).

O Brasil, localizado na região Neotropical, apresenta a maior rede hidrográfica do planeta e a maior diversidade de peixes de água doce, com mais de 2.500 espécies válidas (GRAÇA; PAVANELLI, 2007). A ordem Characiformes compreende cerca de 30% de todas as espécies neotropicais. Seus representantes variam consideravelmente em tamanho (WEITZMAN, VARI, 1988), peso, forma, comportamento, alimentação (SAZIMA, 1983) e reprodução (VAZZOLER, 1996).

O sucesso dos peixes em ambientes diversificados se deve à diversos fatores, desses fazem parte as estratégias reprodutivas por eles apresentadas. As estratégias reprodutivas são padrão para cada espécie. As táticas reprodutivas fazem parte dessas estratégias, sendo as variáveis dentro desse padrão. Em relação aos modos reprodutivos, dentre os Characiformes nenhum caso de fecundação interna é conhecida. Entretanto, todas as espécies da subfamília Glandulocaudinae e parte das espécies de Cheirodontinae possuem uma estratégia reprodutiva alternativa denominada inseminação (BURNS et al, 1995).

1.2 Sistemática de Characiformes com ênfase em Astyanax.

Greenwood et al. (1966) sugeriu 16 famílias para a ordem Characiformes e posteriormente, Géry (1977) atualizou em 14, já Nelson (2006) revisou a presença

de 18 famílias. Isso acontece não apenas pela descrição de novas espécies, mas também pela revisão das já existentes. Assim, Characidae é um grupo com muitas incertezas sobre a sua taxonomia e sistemática (VARI; CASTRO, 2007). Entre as subfamílias de Characidae, Tetragonopterinae era considerada a que possuía o maior número de espécies (NAVARRO et al., 2003). Mas, recentemente apenas as subfamílias com evidências de monofiletismo foram mantidas entre os Characidae. Com isto, uma grande quantidade de espécies, inclusive as do gênero *Astyanax* passaram a pertencer a *Incertae Sedis* (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

Embora a diversidade de *Astyanax* ultrapasse o número de 100 espécies (MIRANDE, 2009), sua distribuição seja ampla com ocorrência desde o México até a Argentina (MORRONE, 2002), a sistemática seja ainda mal definida e formem um grupo monofilético (MALABARBA; WEITZMAN, 2003), é fato que três "morfotipos" principais podem ser identificados nos chamados complexos. Complexo *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991), complexo *A. bimaculatus* (GARUTTI; BRITSKI, 2000) e complexo *A. fasciatus* (ARTONI et al., 2006; PAZZA et al., 2008). A expressão "complexo de espécies" é usada quando mais de uma espécie (conceito biológico) possam estar representadas e, devido ao alto grau de variação não podem ser delimitadas (MAYR, 1942). Estas podem estar em alopatria, parapatria e também em simpatria quando são chamadas de espécies crípticas.

Astyanax scabripinnis tem sido investigado do ponto de vista taxonômico (BERTACO; MALABARBA, 2001) e novas espécies vêm sendo descritas como *A. microschesmos* (BERTACO; LUCENA, 2006), *A. jordanensis* (ALCARAZ; PAVANELLI; BERTACO, 2009), *A. obscuros* e *A. laticeps* (BERTACO; LUCENA, 2010), *A. courensis* e *A. goyacensis* (BERTACO; CARVALHO, 2010). Esta parece ser uma tendência de foco investigativo sobre esse complexo de espécies e necessita de aporte de informações multidisciplinares na tentativa de solucionar o cenário histórico de diversificação desse táxon.

1.3 Caracterização morfológica e cariotípica de *Astyanax scabripinnis*

Os peixes desse gênero geralmente são pequenos, com linha lateral completa, discretamente curvada na região anterior; nadadeira adiposa frequentemente presente; pré-maxilar não-protrátil; dentes pré-maxilares arranjados em duas séries, sendo a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do

corpo aproximadamente três vezes o comprimento padrão e escamas de tamanho normal (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). *Astyanax scabripinnis* possui 25 ou menos raios na nadadeira anal, cabeça robusta e corpo também mais robusto na altura das nadadeiras peitorais (ABILHOA, 2007).

A tendência evolutiva em *Astyanax* aponta para cariótipos heterogêneos, morfologicamente indiferenciados entre os sexos, com diferentes tipos cromossômicos e uma diversidade do número diploide que varia de 36 a 50 cromossomos (MORELLI et al, 1983). O número diploide 50 é conservado no complexo *A. bimaculatus* e o mais frequente e considerado o ancestral para o complexo *A. scabripinnis* (KAVALCO, 2008; KAVALCO et al., 2011).

A bem das características cariotípicas gerais, cada complexo de espécies apresenta peculiaridades em sua biologia, que são acompanhadas por tendências cariotípicas. O complexo *A. scabripinnis*, dada as suas características populacionais, apresenta uma tendência à fixação de rearranjos cromossômicos que refletem na sua fórmula cariotípica diversificada interpopulacionalmente. Normalmente apresentam polimorfismos cromossômicos relacionados à ocorrência de macrocromossomos B e à distribuição da heterocromatina constitutiva (MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 2004).

1.4 Cromossomos B ou supranumerários

Cromossomos B são cromossomos extras presentes em algumas populações em diversas espécies de animais e plantas. Sua ocorrência é esporádica (não está presente em todas as populações da espécie), embora tenha uma frequência nas populações que o possui, esse cromossomo se faz presente em alguns indivíduos da população. Possui pouca ou nenhuma homologia com os cromossomos do cariótipo padrão (JONES; REES, 1982; CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000), embora provavelmente tenha se originado deles e tomado caminho evolutivo próprio (MESTRINER et al., 2000).

Os cromossomos B ocorrem em pelo menos 61 espécies de peixes, sendo que 31 destas pertencem aos Characiformes. Essas 31 espécies de Characiformes estão agrupadas em 6 famílias (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS, 2008). Vicente (1994) observou alta frequência de cromossomos B na subfamília Tetragonopterinae, dentre as espécies que possuem esse cromossomo se faz

presente *Astyanax scabripinnis*.

Astyanax scabripinnis é considerada uma espécie modelo de estudo deste cromossomo, pela alta frequência com que é encontrado nas várias populações analisadas (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1992; FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994; MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1994; PORTO-FORESTI et al., 1997; NÉO; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000).

O primeiro cromossomo B observado em *A. scabripinnis* foi um metacêntrico grande e heterocromático, cuja origem foi postulada a não disjunção meiótica do cromossomo 1, devido a semelhança morfológica e tamanho desses cromossomos (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992). Atualmente, a teoria mais aceita é da origem por formação de um isocromossomo, a partir de um elemento semelhante ao par acrocêntrico 24 (VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996; MESTRINER et al., 2000; NÉO, MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 2004). Teoria essa que teve suas evidências comprovadas por Vicari et al. (2011).

Essa forma de cromossomo extranumerário é a mais comumente encontrada nessa espécie. Algumas populações apresentam outras formas como microcromossomos (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997), ou mesmo cromossomos submetacêntricos grandes (NÉO; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000; FERRO; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 2003). Mizoguchi e Martins-Santos (1997) propõem uma origem mais recente para os microcromossomos, já que esses foram observados em apenas três populações de *A. scabripinnis*.

Normalmente, os indivíduos apresentam apenas um macrocromossomo B, sendo a ocorrência de dois ou mais cromossomos B considerada um evento raro em *A. scabripinnis* (NÉO; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000).

A distribuição do cromossomo B em populações de *A. scabripinnis* pode estar associada a diversos fatores como a altitude (NÉO; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000) e o sexo, já que Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993) encontraram cromossomos B exclusivamente nos machos; enquanto que Mizoguchi e Martins-Santos (1997) observaram cromossomos B exclusivamente nas fêmeas. Vicente; Moreira-Filho e Camacho (1996) relatam uma distorção da razão sexual em *Astyanax scabripinnis* relacionada à presença do cromossomo B.

Cromossomos B foram verificados exclusivamente em fêmeas de ciclídeos africanos. Baseado nesta evidência Yoshida et al. (2011) sugerem que os cromossomos B podem ter um possível efeito funcional na determinação do sexo feminino nesses peixes. Adicionalmente os autores postulam que a presença de cromossomos B exclusivamente nas fêmeas pode representar uma transição evolutiva para a origem de cromossomos sexuais. Contudo, nenhuma evidência segura de efeitos fenotípicos pode ainda ser atribuída a presença de cromossomos B em peixes.

1.5 Determinação e diferenciação do sexo (hermafroditismo)

A existência de diferentes estratégias de sexualidade (gonocorismo, hermafroditismo no qual o indivíduo se auto-fertiliza, hermafroditismo seqüencial e simultâneo) sugere a existência de diferentes mecanismos de determinação do sexo. O processo de determinação do sexo em peixes acontece em um curto espaço de tempo, enquanto o processo de diferenciação pode acontecer durante toda a vida. Isso, devido à capacidade de crescimento do cérebro, a regeneração e à alta atividade da aromatase. Essa diferenciação quando acontece naturalmente pode ser influenciada por fatores ambientais, endócrinos ou por ploidia, Pandian (2012). No entanto esse processo de forma natural acontece apenas em 123 espécies de peixes (PANDIAN, 2010).

Em peixes gonocoristas após a determinação do sexo, o sexo em questão permanece para todo o ciclo de vida. Em contraste, alguns peixes hermafroditas (sequenciais) podem mudar de sexo. A mudança de sexo pode ser causada por fatores sociais (alteração na razão sexual e aumento da densidade populacional) e/ou ambientais (temperatura, pluviosidade e pH). Dessa forma os peixes fornecem um modelo animal ideal para investigar a diferenciação sexual Kobayashi et al. (2012), podendo essa ser ou não relacionada à presença dos cromossomo B nos vertebrados. O hermafroditismo foi relatado para 20 famílias taxonômicas em nove ordens de peixes, estando presente em 2% dos teleósteos Avise e Mank (2009).

1.6 Reprodução de peixes com ênfase no gênero *Astyanax*

A reprodução é o processo pelo qual uma população se perpetua, o sucesso de uma população depende da capacidade de cada indivíduo em se reproduzir,

mantendo essa população viável. Estratégia reprodutiva é o padrão geral de reprodução apresentado por uma espécie ou população, enquanto as táticas reprodutivas são aquelas características variáveis nesse padrão em resposta a flutuações do ambiente e limitadas pelo grau de plasticidade fenotípica da espécie (GOMIERO; GARUANA; BRAGA, 2008).

O sucesso dos peixes em ambientes diversificados se deve à diversos fatores, do qual fazem parte as estratégias reprodutivas por eles apresentadas. Dentre as estratégias reprodutivas podemos citar o estilo reprodutivo: ovulíparo, ovíparo, ovovíparo e vivíparo; e o dimorfismo sexual primário e secundário. E como táticas reprodutivas: o modo como a espécie se utiliza dos recursos energéticos, o desencadeamento dos processos hormonais e o tamanho de primeira maturação gonadal. *Astyanax scabripinnis* possui fecundação externa, ou seja, é ovulípara, e dimorfismo sexual, já que os machos possuem as nadadeiras peitorais e anais com espículas dando à elas um aspecto áspero ao tato (ANDRADE; MATTA; ROCHA, 1994), como encontrado em outros peixes desse gênero (NAVARRO et al., 2003).

Quando os sexos são separados possibilita-se a definição da razão sexual numa população, como o número de machos relativo ao número de fêmeas. Como para a maioria das espécies o número de fêmeas é estatisticamente igual ao número de machos, consideramos a razão sexual 1:1 a condição normal. Então, os desvios desse padrão são considerados casos especiais. Essa variação acontece em função de eventos que atuam de modo distinto sobre os indivíduos de cada sexo (RICKLEFS, 2003). Yoshida et al. (2011) encontrou uma distorção da razão sexual de 1:1 em ciclídeos africanos e sugeriu a influência dos cromossomos B neste processo, sem buscar uma explicação biológica para este fenômeno.

Na fase adulta, uma parcela da energia acumulada pelo organismo é utilizada para o desenvolvimento das gônadas, refletindo-se em mudanças na forma e estrutura dessas. Segundo Ricklefs (2003) a reprodução e o crescimento são processos que competem pelos mesmos recursos representando um modelo de *trade-off* negativo. As espécies r estrategistas alocam maior quantidade de energia para a produção de novos indivíduos e não possuem cuidado com a prole, enquanto que as espécies k estrategistas alocam mais energia para o seu crescimento e desenvolvimento, produzem poucos indivíduos e possuem cuidado parental, no entanto não existem espécies totalmente r ou totalmente k estrategistas.

Em geral, espécies migradoras apresentam desova total e alta fecundidade,

as não migradoras sem cuidado parental possuem fecundidade intermediária e aquelas com cuidado parental, baixa fecundidade. Os peixes do gênero *Astyanax* se encaixam no grupo com fecundidade externa, não migradores ou migradores de pequenas distâncias e sem cuidado parental (VAZZOLER; MENEZES, 1992). Esse é um dado importante para a piscicultura levando em conta que espécies migradoras necessitam migrar para realizar reprodução, sendo necessário indução com tratamento hormonal para ovulação, desova e espermição (BALDISSEROTO, 2009). *A. scabripinnis* se enquadra mais no grupo das espécies r estrategistas, mas não chega a ser uma espécie semélpara.

Normalmente são as fêmeas que determinam a época de desova, já que os machos costumam estar em estágio maduro por um período de tempo maior. Além disso, são elas que determinam a quantidade de novos descendentes de cada casal, pois o número de espermatozoides não é tão limitado quanto o número de ovócitos (SANTOS, 1995).

As células gonadais passam por profundas modificações durante o seu desenvolvimento. Com base nessas alterações o processo de maturação gonadal é dividido em fases ou estádios, de acordo com escalas artificiais. O método mais preciso para determinar o estágio reprodutivo de uma população é a análise histológica de suas gônadas, mas torna-se inviável analisar cada indivíduo da amostra. Dados obtidos de critérios macroscópicos são satisfatórios para o estabelecimento de padrões sazonais de desenvolvimento gonadal, já como atributo individual, esses podem levar a erros inaceitáveis, pois gônadas classificadas macroscopicamente dentro de um mesmo estágio podem encontrar-se em estados funcionais diferentes. O ideal é utilizar-se do método macroscópico em todas as gônadas e o histológico em casos de análise individual.

Para classificar os diferentes estádios de maturação por observação macroscópica é importante levar em consideração o tamanho que a gônada está em relação à cavidade abdominal, a percepção dos ovócitos, o seu aspecto, o grau de turgidez das gônadas e sua vascularização (VAZZOLER, 1996). Para isso existem várias escalas, mas essas são generalistas, não se aplicando a todas as espécies, o que leva-nos a concluir que estudos detalhados das espécies são necessários.

As diferenças entre os estádios de desenvolvimento residem na quantidade relativa das diversas células da linhagem germinativa. A determinação do estágio de maturação com bases histológicas baseia-se na proporção dessas células

germinativas presentes no tecido (VAZZOLER, 1996).

Um bom indicador quantitativo da fase em que a gônada se encontra dentro do processo de maturação é a relação gonadossomática (RGS), isso devido a estreita relação entre o avanço do processo de maturação dos ovócitos e o aumento do volume e peso dos ovários. Essa relação expressa a porcentagem que o peso das gônadas representa em relação ao peso total do indivíduo. Concomitantemente à essa relação pode ser utilizada a relação hepatossomática (RHS) que pode na maior parte dos casos ser relacionado a perda de peso do fígado com o aumento do peso da gônada, mostrando deslocamento de recursos para a reprodução durante o período reprodutivo (VAZZOLER, 1996). Abilhoa (2007) descreve para *A. scabripinnis* a reprodução acontecendo de outubro a março, por outro lado, Veregue e Orsi (2003) observaram um período de maturação gonadal de abril à agosto. Pereira- Filho et al. (2011) observou na população por ele analisada, atividade reprodutiva durante todo o ano. No entanto, essa última foi verificada em cativeiro e provavelmente em condições controladas não seguindo o padrão de populações naturais. A desova parcelada, na qual verifica-se a eliminação sucessiva de lotes de ovócitos maduros, é o tipo de desova apresentado por *A. scabripinnis* nesses trabalhos.

Há uma grande necessidade de implementação de estudos sobre a biologia reprodutiva dos Characiformes, porque esse conhecimento é essencial para o estabelecimento de medidas necessárias à conservação e exploração racional desses recursos, bem como a avaliação do impacto a ser causado pelas interferências antrópicas sob o meio aquático (VAZZOLER, 1996). Além disso, a piscicultura torna-se uma ferramenta de comercialização sem causar grandes consequências ambientais como a depleção dos recursos pesqueiros.

1.7 Morfometria e sua aplicação em trabalhos com peixes

A morfometria é o estudo da forma e do tamanho, e de como estas duas variáveis se relacionam entre si. Ela constitui uma ferramenta para entender a relação do tamanho e da forma com diversas outras variáveis, como a idade e o sexo (MORAES, 2003). Distinguem-se duas abordagens principais de análises morfométricas: a morfometria tradicional e a geométrica.

A diferença entre a morfometria tradicional e a geométrica é que a tradicional

usa distâncias lineares de medidas, empregando cálculos, taxas e ângulos. Neste caso os dados gerados são tratados estatisticamente por meio de análises estatísticas multivariadas, como análise do componente principal, análise de fator, análise de variáveis canônicas e análises de funções discriminantes (ADAMS et al., 2004). Na maioria das vezes não é possível reconstruir a forma das espécies estudadas após as diferentes análises realizadas, embora seja possível detectar diferenças com significância estatística. Por outro lado, a morfometria geométrica se propõe a ser uma metodologia que não somente permite a análise e a quantificação da variação, mas permite também a visualização gráfica dos diferentes padrões evidenciados. Essa abordagem integra dados geométricos da estrutura morfológica às análises estatísticas multivariadas já destacadas em uso na morfometria clássica (ADAMS et al., 2004). O uso dessa ferramenta une as técnicas de matemática estatística, biometria multivariada, geometria não Euclidiana e gráficos computacionais, denominada como "síntese morfométrica" por Bookstein (1996). Clabaut et al., (2007) afirmam que com a morfometria geométrica é possível reconstruir a forma consenso do grupo e visualizar as mudanças e transformações necessárias para a distinção de uma forma da outra.

A morfometria geométrica é uma ferramenta que vem sendo usada em vários estudos com peixes. Mceachran e Dewitt (2008) descrevem uma nova espécie endêmica de peixe baseado na morfometria tradicional e na morfometria geométrica. Clabaut et al., (2007) demonstraram o uso da morfometria geométrica para evidenciar caracteres adaptativos em peixes ciclídeos. Langerhans et al. (2003) encontraram diversificação morfológica em duas espécies de peixes neotropicais, sugerindo que diferenças no habitat estariam criando pressões seletivas que culminam na divergência morfológica encontrada.

A morfometria clássica tem auxiliado a identificação de grupos (espécies e populações) em *Astyanax*, especialmente quando em associação a dados cariotípicos. Moreira-Filho e Bertollo (1991) foram um dos pioneiros a empregar essa análise integradora em populações alopátricas de *Astyanax scabripinnis*. Shibatta e Artoni (2005) analisaram populações alopátricas de *A. cf. fasciatus* em região de alto endemismo nas Furnas do Parque Estadual de Vila Velha no Paraná e concluíram pela sugestão da existência de uma única espécie em isolamento recente. Mais tarde, Artoni et al. (2006) estudando as mesmas populações de *A. cf. fasciatus* em referência a constituição cariotípica sugeriram a existência de um complexo de

espécies com três cariomorfos distintos.

Assim, a morfometria geométrica se apresenta, alternativamente, como uma ferramenta interessante para o estudo de possíveis diferenças na biometria de *Astyanax scabripinnis* entre indivíduos fêmeas e machos e entre espécimes com e sem cromossomo B.

2. Objetivo

Analisar possíveis associações da presença de cromossomos B na reprodução e biometria de *Astyanax scabripinnis* bem como sua possível interferência na razão sexual.

Metas

- a) Coletar amostras trimestrais durante 12 meses visando sexagem macroscópica e microscópica das gônadas;
- b) Identificar a presença e a frequência de cromossomos B das amostras, comparando sempre com a sexagem e com o desenvolvimento gonadal;
- c) Tomar medidas biométricas (peso total, comprimento total e padrão e peso das gônadas) em toda a amostra;
- d) Identificar o período reprodutivo dessa população;
- e) Tomar medidas morfométricas e comparar se há diferença entre fêmeas e machos e entre os indivíduos com e sem cromossomo B e
- f) Analisar diferenças no dimorfismo sexual nas diferentes estações do ano e sua presença nos hermafroditas.

3. Material e Métodos

Foram amostrados um total de 151 espécimes de *Astyanax scabripinnis* (Figura 1) provenientes do Córrego da Fazenda Lavrinha (1900 m de altitude), Guaratinguetá (coordenadas S 22°40'49,5" e W 45°23'31,9") (Figura 2). Exemplares foram encaminhados para tombamento no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina MZUEL N°5654.

Figura 1- Exemplar de *Astyanax scabripinnis* macho do Córrego da Fazenda Lavrinha (Guaratinguetá- SP).



Figura 2- Mapa com a Localização da estação de coleta.



Metodologias

3.1 Amostragem

O desenho experimental contemplou quatro coletas trimestrais entre os anos de 2012 e 2013, de modo a cobrir as variações sazonais frente ao período reprodutivo a ser estabelecido para essa população de *Astyanax scabripinnis*. As coletas periódicas mantiveram o mesmo padrão de esforço com duração de 2 horas e dois coletores utilizando puçás e peneiras de malha 0,5 mm entre nós. Após, o total de peixes capturados foram acondicionados em sacos plásticos com água e oxigênio sob pressão e conduzidos até o Laboratório de Citogenética e Evolução da

Universidade Estadual de Ponta Grossa para condução imediata dos ensaios.

Todas as boas práticas em ética animal foram preservadas e o trabalho foi realizado com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (proc. No. 15115-1, anexo 7.10)

3.2 Citogenética convencional

Para obtenção de cromossomos mitóticos utilizou-se a técnica descrita por Bertollo; Takahashi e Moreira- Filho (1978) (anexo 7.1.2). Para visualização das metáfases, os cromossomos foram corados com Giemsa.

3.3 Citogenética Molecular

Para os indivíduos que não foi possível conseguir metáfases, a presença de cromossomos B foi diagnosticada por meio da citogenética molecular com o emprego de sonda específica do cromossomo B e por meio da hibridação *in situ* por FISH em núcleo interfásico (anexo 7.2.4).

As imagens dos núcleos foram capturadas com a utilização do sistema de captura de Imagens CCD Olympus DP 71[®] e software DP-Controller versão 3.2.1.276.

3.4 Histologia e parâmetros biométricos

Após o sacrifício dos exemplares, esses foram pesados em balança de precisão (g), em seguida realizou-se as medidas do comprimento total e padrão (cm). Analisou-se macroscopicamente as gônadas de acordo com os critérios estabelecidos por Vazzoler (1996) (anexo 7.4) e após, as gônadas foram retiradas cuidadosamente e pesadas em balança de precisão (g). As gônadas foram fixadas em bouin, no qual foram mantidas por um período entre 15 e 24 horas, realizou-se então uma lavagem em álcool 70% e manteve-se em álcool 70% até a preparação para inclusão.

As peças foram retiradas do álcool 70% e passadas pelos processos histológicos de rotina para inclusão em parafina (anexo 7.3.1 e 7.3.2). Após a inclusão e secagem da parafina realizou-se cortes com espessura de 5µm em micrótomo (anexo 7.3.3).

Após secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) de acordo com protocolo descrito no anexo 7.3.4 e analisadas em microscopia de campo claro.

Foram realizados os cálculos dos índices reprodutivos de acordo com as fórmulas: $RGS = \text{peso gônada (g)} / (\text{peso total}) * 100$, $RHS = \text{peso fígado (g)} / \text{peso total} * 100$; os cálculos de frequência de cromossomo B nas fêmeas e nos machos, e frequência de fêmeas e machos com e sem cromossomo B em cada estágio de desenvolvimento gonadal, bem como a razão sexual.

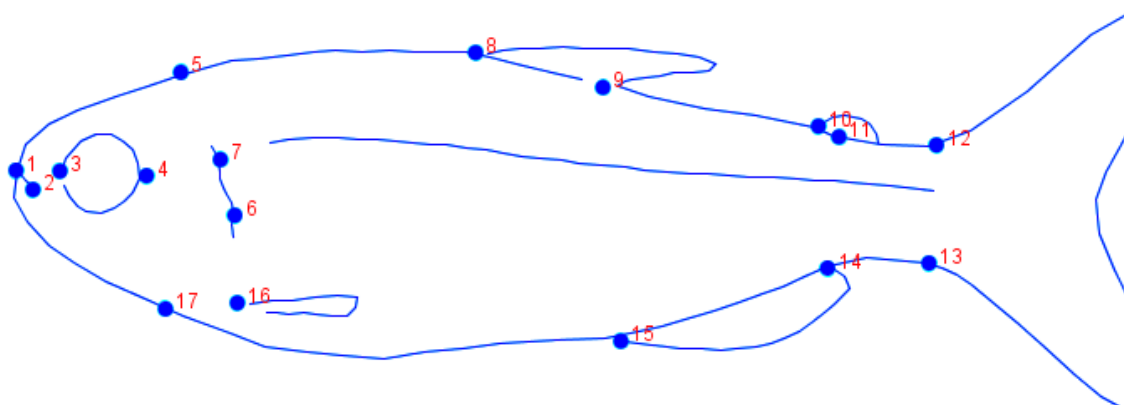
3.5 Morfometria Geométrica

Todos os exemplares foram fotografados com câmera digital Canon A495[®] a uma altura padronizada de 30 cm com 180 dpi de resolução, para posterior análise.

Foram selecionados 17 marcos anatômicos ao longo do corpo (Figura 3). O software tpsDig 2.16 (ROHLF, 2010) foi utilizado para transformar cada marco anatômico em coordenadas cartesianas. A partir da matriz gerada, foi efetuada uma superposição de Procrustes por quadrados mínimos, e as demais análises necessárias, com o uso dos softwares Morpho J 1.02j (KLINGENBERG, 2011) e Past 2.10 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Foi efetuada uma análise de função discriminante (DFA) para inferência de diferença significativa de machos com B e sem B.

Figura 3 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica: Ponto 1: Região anterior do focinho; Ponto 2: Região posterior do focinho; Ponto 3: Região orbital anterior; Ponto 4: Região orbital posterior; Ponto 5: Região dorsal da cabeça; Ponto 6: Curvatura inferior do opérculo Região anterior da inserção da nadadeira dorsal; Ponto 7: Curvatura superior do opérculo. Ponto 8: Região anterior da inserção da nadadeira dorsal; Ponto 9: Região posterior da inserção da nadadeira dorsal; Ponto 10: Região anterior da inserção da nadadeira adiposa; Ponto 11: Região posterior da inserção da nadadeira adiposa; Ponto 12: Região dorsal do início da nadadeira caudal; Ponto 13: Região ventral do início da nadadeira caudal; Ponto 14: Região posterior da inserção da nadadeira anal; Ponto 15: Região anterior da inserção da nadadeira anal; Ponto 16: Inserção da nadadeira peitoral; Ponto 17: Região ventral da cabeça.



4. Resultados

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

Capítulo I

Hermafroditismo e presença de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis* (Teleostei:
Characidae)

Resumo

Os peixes são os vertebrados com maior plasticidade na determinação e diferenciação do sexo. *Astyanax scabripinnis* é um complexo de espécies de peixes neotropicais que forma populações isoladas em cabeceiras de riachos e têm sido empregada como modelo para o estudo de cromossomos B. No presente trabalho objetivou-se investigar se características reprodutivas e a razão sexual estão de algum modo, relacionados à presença de cromossomos B nesses peixes. Amostras sazonais foram realizadas e as gônadas classificadas segundo estádios histológicos de desenvolvimento. Estabeleceu-se a razão sexual da população e foi calculada a relação gonadossomática e hepatossomática separadamente para fêmeas e machos com e sem cromossomos B. A contabilização de indivíduos com cromossomos B foi possível pelo uso da hibridação *in situ* fluorescente com sonda do cromossomo B microdissectado (pintura cromossômica). A razão sexual variou sazonalmente e ainda foram encontrados indivíduos intersexo. A ocorrência de cromossomos B foi relacionada a possíveis estratégias reprodutivas distintas na população estudada, especialmente em relação ao aporte energético e aos estádios de desenvolvimento gonadal. Contudo, o hermafroditismo parece estar relacionado a variações das condições ambientais como a diminuição da temperatura e a densidade populacional, mas não com a presença/ausência do cromossomo B.

Palavras-chave: Peixes, diferenciação sexual, inversão sexual, proporção sexual.

Abstract

The fish are vertebrates with a higher plasticity and differentiation in the determination of the sex. *A. scabripinnis* is a complex of Neotropical fish species that form isolated populations in headwater streams and have been used as a model for the study of chromosomes B. In the present study aimed to investigate whether reproductive characteristics and sex ratio are somehow related to the presence of B chromosomes in these fish. Seasonal samples were taken and the gonads classified according to histological stages of development. Established the sex ratio of the population and the ratio was calculated gonadosomatic and hepatosomatic separately for males and females with and without B chromosomes. Accounting for individuals with B chromosomes was possible by the use of fluorescence in situ hybridization with probe B chromosome painting. The sex ratio varied seasonally and still found intersex individuals. The occurrence of B chromosomes was related to possible different reproductive strategies in the population studied, especially in relation to energy intake and stages of gonadal development. However, the hermaphroditic seems to be related to changes in environmental conditions such as temperature and the decrease in density, but not the presence / absence of chromosome B.

Keywords: Fish, sexual differentiation, sexual inversion, sex ratio.

Introdução

Os peixes estão entre os vertebrados com a maior variabilidade e plasticidade na determinação e diferenciação do sexo (PANDIAN 2012). A existência de diferentes estratégias de sexualidade (gonocorismo, hermafroditismo seqüencial e simultâneo) sugere a existência de diferentes mecanismos de determinação do sexo nesse grupo de vertebrados. Em peixes gonocoristas após a determinação, o sexo estabelecido permanece para todo o ciclo de vida, contudo, alguns peixes hermafroditas (sequenciais) podem inverter o sexo. O hermafroditismo é um evento recorrente em peixes e já foi relatado para 20 famílias em nove ordens diferentes, ocorrendo em 2% dos teleósteos (AVISE; MANK, 2009). Contudo, somente em 123 espécies ocorre mudança natural de sexo ao menos uma vez ao longo da vida (PANDIAN, 2010). O processo de determinação do sexo em peixes acontece em um curto espaço de tempo, enquanto o processo de diferenciação gonadal pode ocorrer ao longo da vida do animal sob a influência de fatores ambientais (PANDIAN, 2012).

O gênero *Astyanax* é um táxon de peixes neotropicais bastante especioso (mais de 100 espécies reconhecidas) e amplamente distribuído (MIRANDE, 2009). *Astyanax scabripinnis* habita cabeceiras de rios e riachos (CASTRO; CASATTI, 1997), formando populações endêmicas, reconhecidas como um complexo de espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). Frequentemente essa espécie apresenta polimorfismo relacionado à ocorrência de cromossomos B (MOREIRA-FILHO et al. 2004), suscitando muitas perguntas a cerca da origem, diferenciação e manutenção desses cromossomos em algumas populações. Embora alguns autores tenham sugerido efeitos fenotípicos relacionados à presença de cromossomos B em *A. scabripinnis* (NÉO et al., 2000), nenhum trabalho ainda demonstrou claramente tais associações, de modo que estes são admitidos permanecerem nas populações como reflexo de um balanço entre sua taxa de transmissão e efeitos adaptativos sobre o hospedeiro (CAMACHO et al., 2000).

Curiosamente, algumas populações de *A. scabripinnis* são relacionadas como tendo cromossomos B restritos ao sexo masculino (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993), ou ao sexo feminino (MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997). Yoshida et al. (2011) sugerem que cromossomos B podem ter um efeito funcional na determinação do sexo feminino em ciclídeos africanos.

Pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva de *A. scabripinnis* e nenhum

estudo relaciona a presença de cromossomos B a parâmetros reprodutivos neste complexo de espécies. Alguns estudos têm sugerido que *A. scabripinnis* possui desova parcelada (Melo et al. 2005; Pereira-Filho et al. 2011) e tendência a ser uma espécie “r” estrategista (Veregue e Orsi 2003). A relação gonadosômática (RGS) e a relação hepatossômática (RHS) são indicadores do estágio de maturação gonadal e da relação energética com o desenvolvimento das gônadas respectivamente (Vazzoler 1996). Estes índices são bons candidatos à verificação da relação entre cromossomos B e características reprodutivas em *A. scabripinnis*.

Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar possíveis interferências da presença de cromossomos B em características reprodutivas de *Astyanax scabripinnis* bem como na razão sexual.

Material e Métodos

Foram realizadas quatro coletas trimestrais entre maio de 2012 e fevereiro de 2013 de *Astyanax scabripinnis* do Córrego da Fazenda Lavrinha a 1900 m de altitude, no município de Guaratinguetá, São Paulo, Brasil (coordenadas S 22°40'49,5" e W 45°23'31,9"). Exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar A. Shibatta e tombados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL= 5654).

Após o sacrifício dos exemplares, foram tomados dados biométricos; peso(g); comprimento total e padrão (cm). Analisou-se macroscopicamente as gônadas de acordo com os critérios estabelecidos por Vazzoler (1996), essas foram retiradas e pesadas em balança de precisão (g). As gônadas foram fixadas em bouin por 24h e mantidas em álcool 70% até serem processadas. Foram realizados cortes histológicos com 5µm de espessura em micrótomo rotativo (LEICA RM 2125 RT). O material foi corado com hematoxilina-eosina (HE) e analisado em microscopia de campo claro para determinação do estágio de maturação gonadal.

A proporção sexual foi calculada pela frequência porcentual de fêmeas, machos e hermafroditas para o período como um todo e por período de coleta. Os cálculos dos índices reprodutivos (relação gonadosômática – RGS e relação hepatossômática – RHS) foram efetuados de acordo com as fórmulas: $RGS = (\text{peso gônada (g)} / \text{peso total (g)}) * 100$, $RHS = (\text{peso fígado (g)} / \text{peso total}) * 100$.

Para obtenção de cromossomos mitóticos utilizou-se a técnica descrita por Bertollo; Takahashi e Moreira- Filho (1978). Para os indivíduos que não foi possível

identificar os cromossomos, seguiu-se a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) sobre núcleos interfásicos mitóticos a fim de diagnosticar a presença do supranumerário, utilizando uma sonda de cromossomo B microdissectado (VICARI et al, 2011). A sonda do cromossomo B microdissectado foi marcada em reação de DOP-PCR com biotina 14-dATP (Invitrogen). A reação da PCR consistiu de: tampão 1x da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM $MgCl_2$, 400 μM dTTP, dGTP e dCTP, 200 μM de dATP, 200 μM de dATP 14- biotina, 2 μM DOP *primer* e 2 U de Taq DNA polimerase. A FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/ μL sonda, 50 % formamida, 2x SSC, 10 % sulfato dextrano) seguiu o protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986). A detecção do sinal foi realizada com anti digoxigenina-rodamina (Roche). Os núcleos interfásicos foram contra corados com DAPI (0,2 $\mu g/mL$) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens CCD Olympus DP 71® e software DP-Controller versão 3.2.1.276.

Os cálculos de frequência de cromossomo B nas fêmeas e nos machos, na amostra total e em cada estágio de desenvolvimento gonadal, foram realizados considerando o número total de exemplares da amostra ou de cada coleta em cada sexo portador de cromossomo B em separado, dividido pelo número total de exemplares da amostra e multiplicados por 100 (n° total ♀, ♂ ou hermafroditas com B/ n° total de peixes da amostra ou de cada coleta) *100.

As comparações entre a relação gonadosômática (RGS) e hepatossômática (RHS) foram realizadas pelo teste ANOVA um critério (Fisher, 1918) no pacote de programas Bioedit v. 5.3 (Ayres et al. 2007). Essa análise foi desenvolvida a fim de verificar se existe alguma diferença estatística entre os tratamentos. Dessa maneira as amostras foram agrupadas em relação ao sexo (machos e fêmeas) e em relação à presença de cromossomo B. As amostras também foram agrupadas em relação às coletas em quatro períodos de três meses cada, representando todo o período amostrado. Quando valores significativos do teste ANOVA, a correção de Bonferroni (Howell 1987) foi realizada para confirmação dos resultados.

A variação na razão sexual foi testada pelo teste do Qui-Quadrado (aderência) com proporções esperadas iguais (Pearson 1900) utilizando o pacote estatístico Bioestat v. 5.3 (Ayres et al. 2007). A variação da razão sexual foi testada para cada coleta, agrupando machos e fêmeas sem discriminação da presença ou ausência do cromossomo B. Também foram testados se a presença de hermafroditas estaria

compensando a razão sexual e para isso foi calculado o teste Qui-Quadrado (aderência) considerando os exemplares hermafroditas, em um primeiro momento machos e depois fêmeas.

Resultados

A proporção sexual (RS) nos meses de abril/maio/junho foi de 1 fêmea para cada macho. Nos meses de julho/agosto/setembro foi de 0,24:1, nos meses de outubro/novembro/dezembro foi de 0,35:1 e nos meses de janeiro, fevereiro e março foi de 0,9:1 (Figura 4). A RS para todos os exemplares coletados foi de 0,62:1. Nos meses de julho/agosto/setembro, se considerarmos os hermafroditas fêmeas (já que os hermafroditas amostrados nessa coleta tinham característica macroscópica de fêmeas) a proporção de fêmeas e machos nesse caso é estatisticamente igual a 1:1 (ANOVA).

A análise de cromossomos mitóticos (Figura 5A) indicou a ocorrência de apenas 1 macrocromossomo B do tipo submetacêntrico compatível em tamanho com o maior par do complemento. O emprego adicional da *hibridação fluorescente in situ* (FISH) em núcleos interfásicos (Figura 5B) permitiu contabilizar 7,53% de espécimes hermafroditas do total coletado (Figuras 4). Na amostra de abril/maio/junho de 2012, 42,1% das fêmeas e 21,05% dos machos tinham cromossomo B. Na amostra de julho/agosto/setembro, 50% das fêmeas e 23,5% dos machos apresentaram esse cromossomo. Na amostra de outubro/novembro/dezembro 36,6% das fêmeas, 29,03% dos machos e todos os hermafroditas portavam cromossomo B e na amostragem de janeiro/fevereiro/março, 21,05% das fêmeas, 14,29% dos machos e 33,33% das fêmeas apresentaram cromossomo B (Figura 6).

Destes, os hermafroditas da amostragem de abril/maio/junho (2,6% do total coletado nessa amostragem) e julho/agosto/setembro (16% dessa amostragem) tinham característica macroscópica de fêmeas e não portavam cromossomo B. Os espécimes hermafroditas dos meses de outubro/novembro/dezembro (4,55% dessa amostragem) eram macroscopicamente machos e portavam cromossomo B, enquanto que os hermafroditas da amostragem de janeiro/fevereiro/março (6,98% da respectiva amostragem) 66,66% não portavam esse cromossomo e tinham característica macroscópica dos dois sexos, sendo um dos lóbulos feminino e o outro masculino e 33,33% portavam cromossomo B e apresentavam característica

macroscópica de macho (Figura 4 e 6).

A relação gonadossomática e hepatossomática para as fêmeas e os machos com e sem cromossomo B nos diferentes períodos de amostragem podem ser observados na Figura 7 e 8.

Os estudos histológicos mostraram fêmeas e machos em todos os estádios de desenvolvimento gonadal: imaturo, em maturação, maduro, parcialmente esgotado e em repouso (Figura 9 e 10). As fêmeas sem cromossomo B apresentam o desenvolvimento do ovário em sincronia com o desenvolvimento dos testículos dos machos com e sem cromossomo B. Todos esses indivíduos apresentam um pico reprodutivo se estendendo de julho até dezembro, apesar de apresentarem atividade reprodutiva durante todo o ano. Enquanto que as fêmeas com cromossomo B apresentam um pico de reprodução no verão, mas também apresentam atividade reprodutiva durante todo o ano.

A distribuição em porcentagem pelos estádios de maturação gonadal dos exemplares fêmeas e machos de *Astyanax scabripinnis* com e sem cromossomo B por período de amostragem pode ser observada nas figuras 13, 14, 15, 16 e 17.

Discussão

No conjunto de todas as amostragens foram evidenciados exemplares em todos os estádios de desenvolvimento gonadal, tanto em machos como em fêmeas, portadores e não portadores de cromossomos B. Contudo, claramente pode ser observado um crescente temporal de preparação das gônadas masculinas e femininas para a reprodução a partir do outono, com a ocorrência de reprodução atípico para a maioria das espécies de peixes no período do inverno, além do período padrão observado a partir da primavera no mês de setembro para a maioria dos teleósteos e distensão desse período até o fim do verão. Esta ocorrência é acompanhada pelo aumento da relação gonadossomática (RGS) nas fêmeas com e sem cromossomo B e decréscimo da relação hepatossomática (RHS) nas fêmeas com cromossomo B, demonstrando um aumento relativo das gônadas em detrimento do gasto energético com pelo menos parte dos recursos provenientes do fígado. Essa é uma condição clássica estabelecida para a caracterização do desenvolvimento reprodutivo em peixes e também válida para diferentes espécies de *Astyanax* (MELO et al., 2005; HIRT; ARAYA; FLORES, 2011; VEREGUE; ORSI,

2003; PEREIRA-FILHO et al, 2011). Por outro lado, nas fêmeas sem cromossomo B, os recursos energéticos para o desenvolvimento do ovário foi alocado pelo menos em parte de outros locais que não o fígado, pois a relação entre RGS e RHS não seguiu o padrão em dois períodos amostrados. Vazzoler (1996) relata que além do fígado pode haver transporte de recursos energéticos de outros locais como da musculatura e das vísceras. Enquanto que as fêmeas com cromossomo B apresentam um pico de reprodução no verão. Ainda há assincronia: fêmeas sem B sempre estão preparadas para reprodução um pouco antes do que as fêmeas com cromossomo B o que pode ser observado tanto na distribuição dos espécimes pelos estádios de desenvolvimento gonadal como na RGS e RHS.

A caracterização do período reprodutivo em *A. scabripinnis* é bastante variável. Abilhoa (2007) descreve para *A. scabripinnis* a reprodução acontecendo de outubro a março, Veregue e Orsi (2003) observaram um período de maturação gonadal de abril a agosto. Pereira- Filho et al. (2011) e de Melo et al. (2005) observaram nas populações por eles analisadas, atividade reprodutiva durante todo o ano, no entanto essas populações são de cativeiro e provavelmente estão sob condições controladas não seguindo o padrão de populações naturais.

O complexo *Astyanax scabripinnis* agrega populações isoladas em cabeceiras de riachos onde ocorrem significativas mudanças repentinas no sistema hidrológico ao longo do ano (VEREGUE; ORSI, 2003). O estabelecimento de reprodução parcelada (um ou mais picos de reprodução) em um período mais longo do ano pode ser uma importante estratégia adaptativa para as populações de *A. scabripinnis*, como aqui observada em adição às observações de Veregue e Orsi (2003).

A proporção sexual é um importante indicativo do estado de equilíbrio das populações, especialmente quando esta tende a igualdade (1:1), como o padrão geral observado em peixes (NIKOLSKY, 1969) e adaptativo a maioria das espécies Ricklefs (2003). O levantamento das quatro coletas realizadas indicam proporção sexual de 0,62 fêmeas:1 macho para a população de *A. scabripinnis* do Córrego da Fazenda Lavrinha. Contudo, considerando as amostras em separado é possível verificar uma inversão com aumento do número de machos em relação ao número de fêmeas na segunda (julho, agosto e setembro) e terceira coleta (outubro, novembro e dezembro) em relação à primeira (abril, maio e junho). Na quarta coleta (outubro, novembro e dezembro) o número de fêmeas volta a aumentar parecendo se tratar de um ciclo. Veregue e Orsi (2003) sugerem que o aumento da proporção

de machos de *A. scabripinnis* durante o período reprodutivo poderia representar um ajuste às condições ambientais locais, demonstrando uma tendência à capacidade R estrategista.

Os resultados indicam a presença de 7,53% de hermafroditas corroborando com os dados de Sá et al. (2008) para diferentes populações de *A. scabripinnis* isoladas em cabeceiras de riachos, onde se verificou uma variação de 1,9% a 9,8% de intersexualidade. A recorrência da intersexualidade em *A. scabripinnis* em condições de alopatria sugere que este evento seja comum e talvez inerente à própria biologia da espécie. Um caso extremo foi observado pelo nosso grupo para um exemplar de *A. scabripinnis* da localidade do Córrego das Pedras (1590 m), município de Campos do Jordão, Brasil, onde se verificou a presença de uma gônada com um dos lóbulos feminino e o outro masculino, sendo ambos em estágio maduro. Outro caso foi aqui constatado para a população do Córrego Lavrinha, na mesma bacia hidrográfica e em altitude acima de 1900 m (Figura 12).

Raros exemplos de intersexualidade ou hermafroditismo têm sido descritos em peixes. Um peixe ciprinídeo do complexo *Squalius alburnoides* possui um interessante caso de hermafroditismo evidenciado ao nível microscópico das gônadas e sua origem ainda não foi totalmente definida entre causas ambientais e genéticas (MATOS et al., 2010). Sá et al. (2008) relatam em seu trabalho vários componentes que causam a intersexualidade em peixes, como: estrógenos, substâncias químicas usadas na indústria e agricultura, e temperatura.

A segunda coleta (julho, agosto e setembro), período de baixas temperaturas mínimas médias mensais (BDMEP- INMET, 2013), foi a com a maior proporção de hermafroditas. De acordo com Harrington (1967) apud Price (1984) temperatura ambiente baixa tende a transformar hermafroditas em machos. Assim, no primeiro momento o aumento no número de hermafroditas pode ser que também esteja relacionado à baixa temperatura no período de inverno (junho, julho e agosto). Esse período coincidiu também com os menores valores de precipitação total com o consequente aumento da densidade populacional.

Em conclusão, a presença de cromossomos B foi relacionada a possíveis estratégias reprodutivas distintas, especialmente em relação ao aporte energético e estádios de desenvolvimento gonadal. Os cromossomos B não tem associação pelo menos direta com o hermafroditismo. O mecanismo de diferenciação do sexo nessa espécie parece ser dependente da temperatura.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e FAPESP.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Figura 4: Proporção das fêmeas, machos e hermafroditas

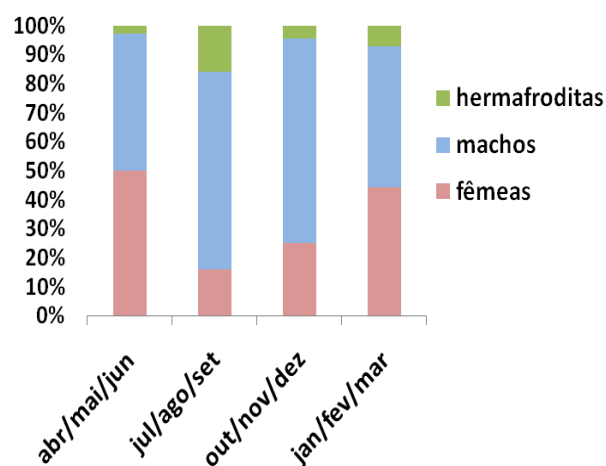


Figura 5 A) Metáfase mitótica de espécime de *Astyanax scabripinnis* com cromossomo B (seta). B) Núcleos de espécime que porta cromossomo B. C) Núcleos de espécime que não possui cromossomo B.

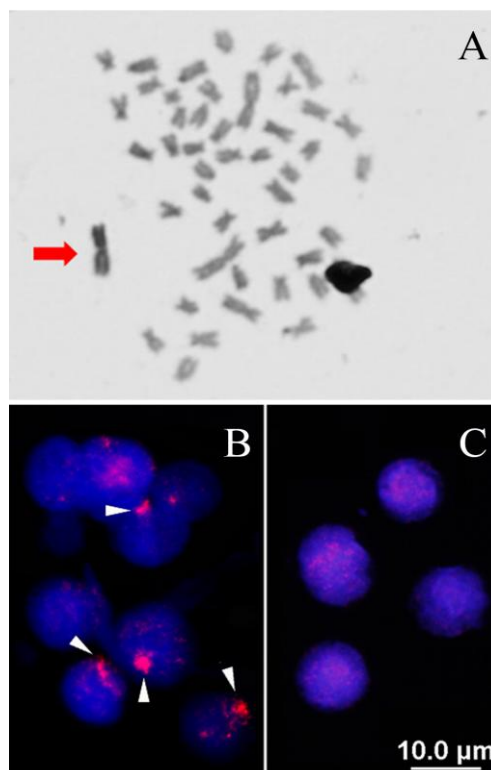


Figura 6: Porcentagem de fêmeas, machos e hermafroditas com cromossomo B por período de coleta.

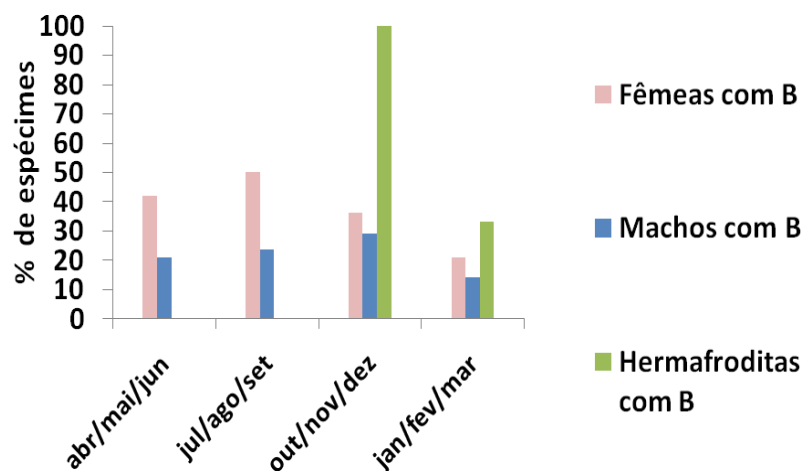


Figura 7: Relação gonadossômática e hepatossômática das fêmeas e machos com e sem cromossomo B nos diferentes períodos de amostragem.

Parâmetro	Período da amostragem	Com B	Sem B
		Fêmeas e Machos	Fêmeas e Machos
RGS	Abril/maio/junho	0,617	1,757
	Julho/agosto/setembro	3,63	8,05
	Outubro/novembro/dezembro	14,82	9,68
	Janeiro/ fevereiro/ março	2,82	2,96
RHS	Abril/maio/junho	1,607	0,503
	Julho/agosto/setembro	0,96	0,639
	Outubro/novembro/dezembro	0,52	0,66
	Janeiro/ fevereiro/ março	0,77	0,52

Figura 8: A) Relação gonadossomática (RGS) e hepatossomática (RHS) aplicada aos espécimes fêmeas de *Astyanax scabripinnis*; B) Relação gonadossomática (RGS) e hepatossomática (RHS) aplicada aos espécimes machos de *Astyanax scabripinnis*.

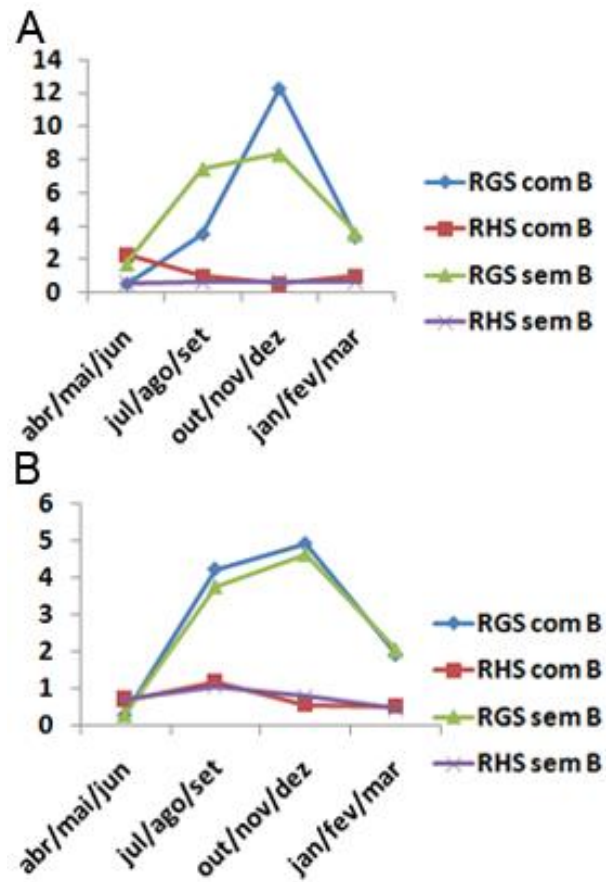


Figura 9: Ovários de *Astyanax scabripinnis* - A) Estádio imaturo; B) Estádio em maturação; C) Estádio maduro; D) Estádio parcialmente esgotado; E) Estádio em repouso e F) Vista macroscópica de um ovário no estágio maduro.

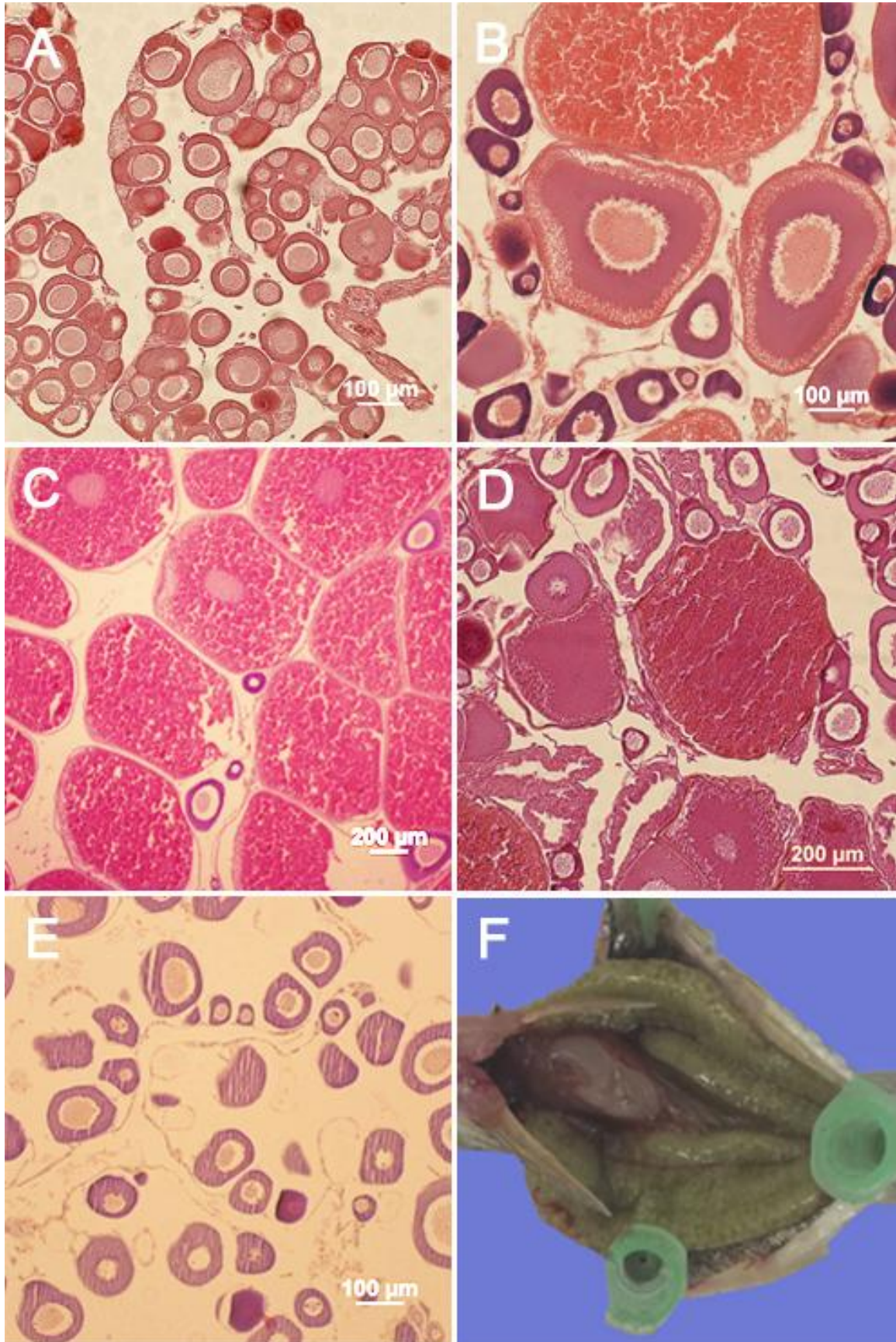


Figura 10: Testículos de *Astyanax scabripinnis*- A) Estádio imaturo; B) Estádio em maturação inicial; C) Estádio em maturação; D) Estádio em maturação diferenciada; E) Estádio maduro; F) Estádio parcialmente esgotado. Marcações verdes indicam proporção da quantidade de espermatozóides durante o desenvolvimento do testículo.

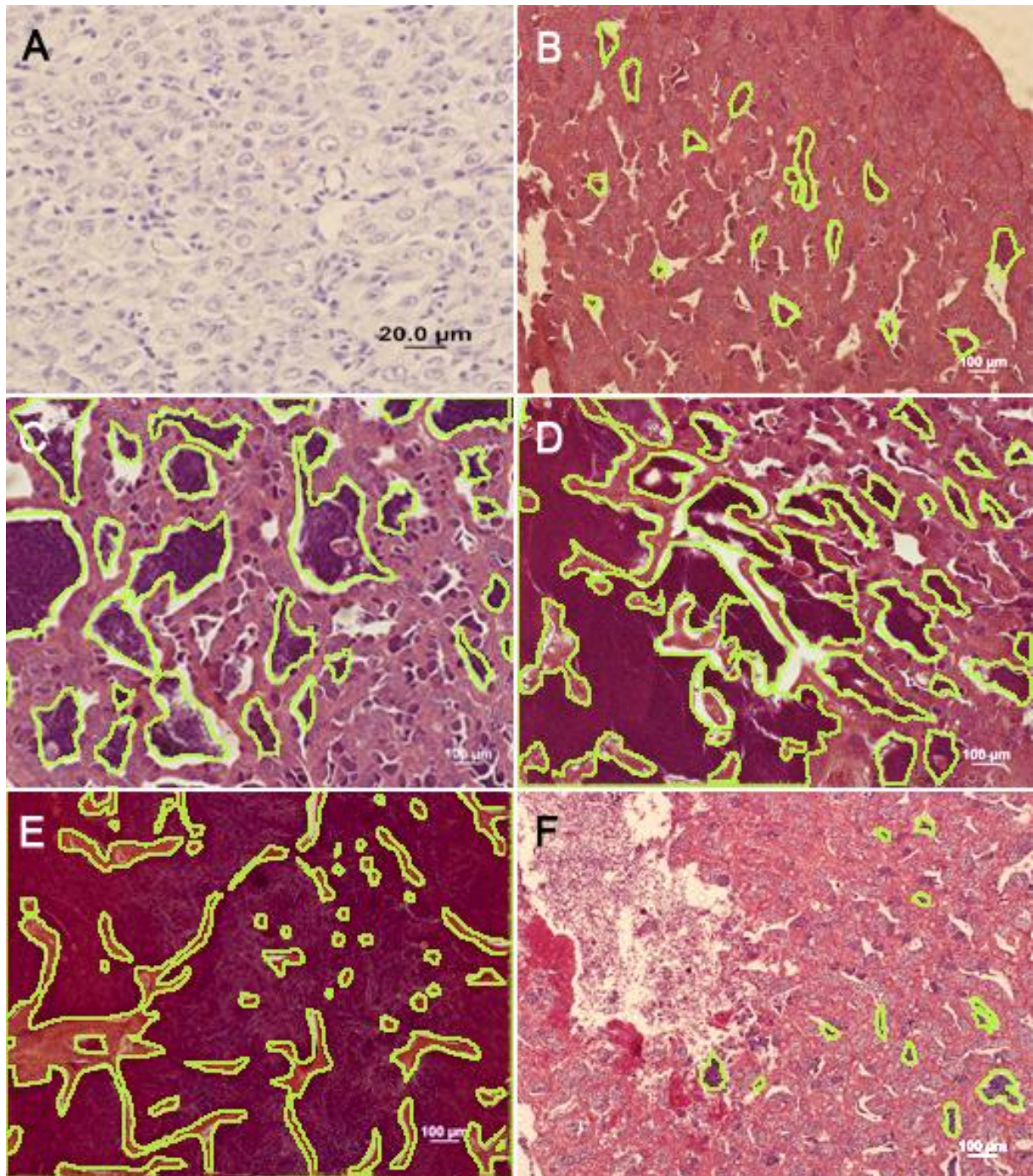


Figura 11: Gônadas de espécimes hermafroditas de *Astyanax scabripinnis*: A) flecha preta= lóbulo feminino da gônada, flecha branca= lóbulo masculino da gônada; B) fotografia A ampliada; C e D) flechas pretas= ovócitos maduros, flechas brancas= espermatozóides.

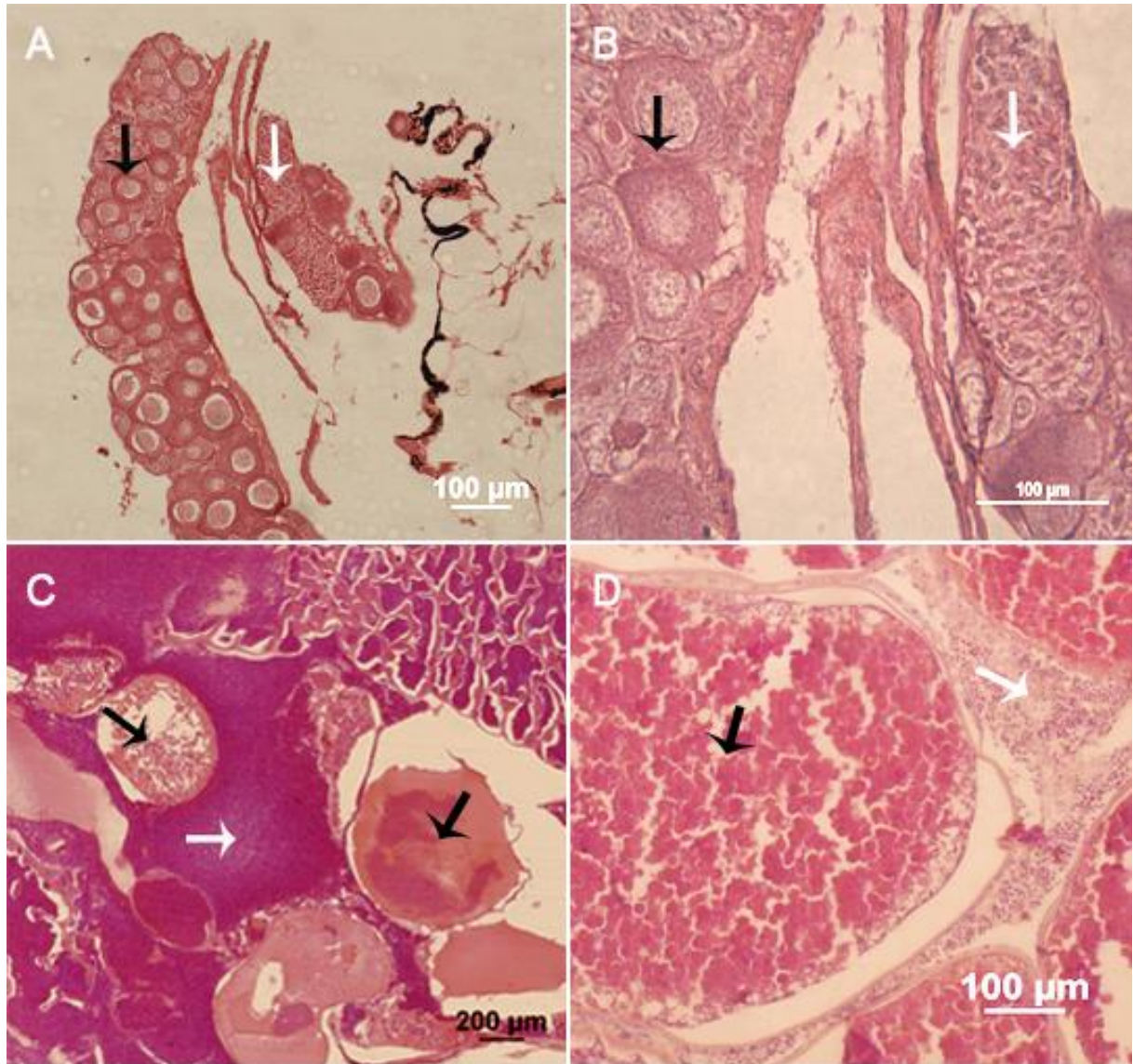


Figura 12: Exemplar hermafrodita de *Astyanax scabripinnis* com gônadas em regressão. Seta vermelho= testículo, Seta amarelo= ovário.

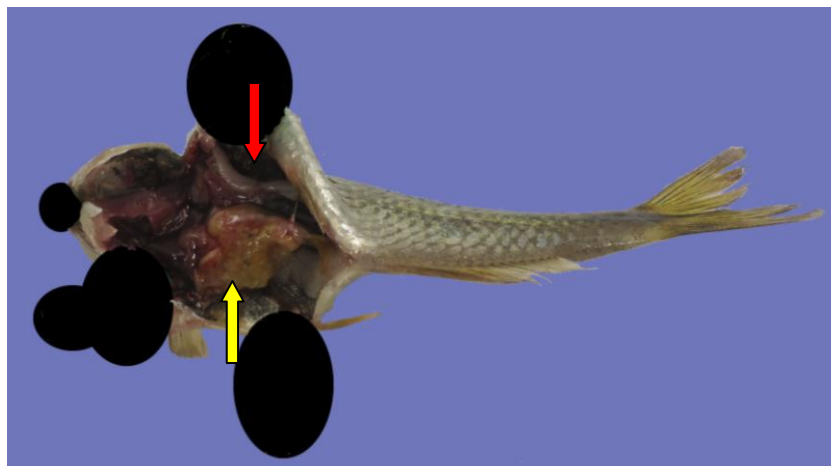


Figura 13: Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas e machos de *Astyanax scabripinnis* com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de abril/maio/junho.

abr/mai/jun	Fêmeas		Machos	
Estádios de maturação	% Sem B	% Com B	% Sem B	% Com B
imaturo	8,3	14,3	6,7	0
maturação	50,0	28,6	60,0	75
maduro	8,3	0,0	20,0	0
parcialmente esgotado	25,0	28,6	13,4	0
repouso	8,3	28,6	0,0	25
	100	100	100,0	100

Figura 14: Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas de *Astyanax scabripinnis* com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de julho/agosto/setembro.

jul/ago/set	Fêmeas		Machos	
Estádios de maturação	% Sem B	% Com B	% Sem B	% Com B
imaturo	0,0	0	0,0	0,0
maturação	0,0	50,0	53,8	25,0
maduro	0,0	0	46,2	75,0
parcialmente esgotado	100,0	50,0	0,0	0,0
repouso	0,0	0	0,0	0,0
	100,0	100	100,0	100,0

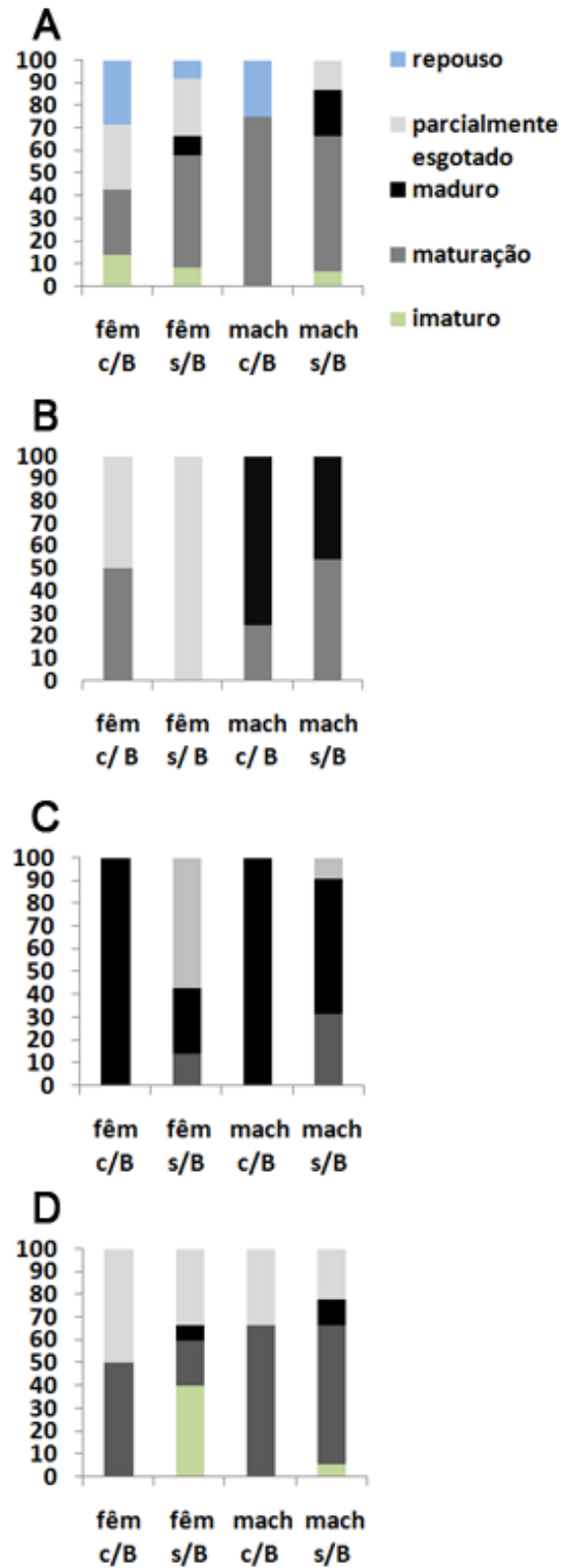
Figura 15: Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas de *Astyanax scabripinnis* com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de outubro/novembro/dezembro.

out/nov/dez	Fêmeas		Machos	
Estádios de maturação	% Sem B	% Com B	% Sem B	% Com B
imaturo	0,0	0,0	0,0	0
maturação	14,3	0,0	31,8	0
maduro	28,6	100,0	59,1	100,0
parcialmente esgotado	57,1	0,0	9,1	0,0
repouso	0,0	0,0	0,0	0
	100,0	100,0	100,0	100

Figura 16: Tabela com a porcentagem da ocorrência dos exemplares fêmeas de *Astyanax scabripinnis* com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal no período de janeiro/fevereiro/março.

Jan/fev/mar	Fêmeas		Machos	
Estádios de maturação	% Sem B	% Com B	% Sem B	% Com B
imaturo	40	0	5,56	0
maturação	20	50	61,11	66,67
maduro	6,67	0	11,11	0
parcialmente esgotado	33,33	50	22,22	33,33
repouso	0	0	0	0
	100,0	100,0	100,0	100

Figura 17: Porcentagem de fêmeas e machos com e sem cromossomo B em cada estágio de maturação gonadal. A) abril/ maio/junho (2012); B) julho, agosto, setembro (2012); C) outubro/novembro/dezembro (2012) e D) janeiro, fevereiro, março (2013).



Capítulo II

Cromossomos B e diferenças morfométricas em *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae)

Resumo

Os cromossomos B ocorrem em 31 espécies de Characiformes. *Astyanax scabripinnis* é um Characiforme modelo para o estudo da presença desse cromossomo. O habitat de *A. scabripinnis* é extremamente instável, com mudanças repentinas. É uma incógnita a resposta de como populações isoladas dessa espécie se perpetuam. Desconfia-se que o cromossomo B têm papel na determinação do sexo em ciclídeos africanos, assim esse elemento poderia estar resultando em efeito fenotípico. A morfometria geométrica foi aplicada para comparar diferenças na forma de fêmeas com e sem cromossomo B; machos com e sem cromossomo B, fêmeas e machos com cromossomo B e fêmeas e machos sem cromossomo B. Houve diferença significativa em todos os casos. As fêmeas têm forma que as proporciona melhor aproveitamento hidrodinâmico.

Palavras- Chave: morfometria geométrica, variáveis canônicas, forma, sexo.

Abstract

The B chromosomes occur in 31 species of Characiformes. *A. scabripinnis* Characiform is a model for the study of the presence of this chromosome. The habitat of *A. scabripinnis* is extremely unstable, with sudden changes. It is an unknown response as isolated populations of this species are perpetuated. One suspects that the B chromosome play a role in sex determination in African cichlids, so that element could be resulting in phenotypic effect. The geometric morphometry was used to compare differences in the way females with and without B chromosome, males with and without B chromosome, females and males with B chromosome and males and females without chromosome B. There were significant differences in all cases. Females have a way that provides better utilization hydrodynamic.

Keywords: geometric morphometric, canonical variables, shape, sex.

Introdução

Os cromossomos B são cromossomos extras presentes em diversas espécies de animais e plantas. Ocorrem em pelo menos 61 espécies de peixes, sendo que 31 destas pertencem aos Characiformes. Vicente (1994) observou alta frequência de cromossomos B na subfamília Tetragonopterinae, da qual *Astyanax scabripinnis* faz parte.

Astyanax scabripinnis é uma espécie modelo para estudos evolutivos e da presença de cromossomos B por causa da alta frequência com que esse elemento extranumerário é encontrado nas várias populações analisadas (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1992; FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994; MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1994; PORTO-FORESTI et al., 1997; NÉO; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000). Essa espécie habita cabeceiras de rios (CASTRO; CASATTI, 1997), locais instáveis, o que dificulta a sobrevivência das espécies. Apesar dessa dificuldade, populações “isoladas” de *Astyanax scabripinnis* conseguem se perpetuar nessas localidades.

Um importante marcador para inferências evolutivas é a análise morfométrica. A morfometria multivariada relaciona forma e tamanho, e constitui uma importante ferramenta para entender a relação destas variáveis com outras, como a idade e o sexo (MORAES, 2003). Distinguem-se duas formas principais de análises morfométricas: a morfometria tradicional e a geométrica. A morfometria tradicional vem perdendo espaço para a morfometria geométrica porque essa última permite reconstruir a forma consenso do grupo e visualizar as mudanças e transformações necessárias para a distinção de uma forma da outra (CLABAUT et al.; 2007).

A morfometria geométrica vem sendo aplicada em diversos estudos desde 1996, após a publicação do “livro branco” (MONTEIRO e REIS, 1999). Desde então essa técnica também é empregada em vários estudos com peixes (MCEACHRAN; DEWITT, 2008; CLABAUT et al., 2007; LANGERHANS et al., 2003; ARTONI; SHIBATTA, 2005; ARTONI et al., 2006), inclusive com o complexo *Astyanax scabripinnis* relacionando diferenças morfológicas acompanhadas por diferenças cariotípicas (MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998) entre outros trabalhos com *Astyanax scabripinnis* (NAVARRO et al., 2006; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). Essa ferramenta pode então, ser útil no propósito de relacionar a presença de cromossomos B a padrões morfológicos diagnosticados entre os sexos.

Material e Métodos

Foram realizadas quatro coletas trimestrais entre maio de 2012 e fevereiro de 2013 de *Astyanax scabripinnis* (Figura 1) do Córrego da Fazenda Lavrinha a 1900 m de altitude, no município de Guaratinguetá, São Paulo, Brasil (coordenadas S 22°40'49,5" e W 45°23'31,9") (Figura 2). Exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar Akio Shibatta e tombados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL= 5654).

Para a morfometria geométrica 294 exemplares (33 fêmeas com cromossomo B, 72 fêmeas sem cromossomo B, 54 machos com cromossomo B e 135 machos sem cromossomo B) foram fotografados a uma altura padronizada de 30 cm com 180 dpi de resolução. Foram selecionados 17 marcos anatômicos ao longo do corpo (Figura 3). O software tpsDig 2.16 (ROHLF, 2010) foi utilizado para transformar cada marco anatômico em coordenadas cartesianas. A partir da matriz gerada, foi efetuada uma superposição de Procrustes por quadrados mínimos, e as demais análises necessárias com o uso dos softwares Morpho J 1.02j (KLINGENBERG, 2011) e Past 2.10 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Para as análises entre as fêmeas e entre as fêmeas e os machos fez-se a análise levando em consideração o marco anatômico referente a região abdominal e não levando em consideração esse marco anatômico. Isso para se ter a certeza que as diferenças encontradas no primeiro caso não sejam resultado da diferença da maturação gonadal entre as fêmeas analisadas.

Resultados

Na análise da morfometria geométrica a existência de erro de medição (alocação dos marcos) indicou que não existem erros evidenciando a confiabilidade da amostra. A análise da população, utilizando as deformações relativas como variáveis independentes nas análises multivariadas (MANOVA/CVA) indicou que (Figura 18):

Entre as fêmeas com e sem cromossomo B há diferença significativa mesmo quando o marco anatômico referente à região abdominal não é levado em consideração. Sanando assim, a hipótese de dar diferença entre esses indivíduos devido a não uniformidade de distribuição de indivíduos com e sem cromossomo B pelos estádios de desenvolvimento gonadal (teste com 10.000 permutações para distância de Mahalanobis e distância de Procrustes entre os grupos, todos com $p <$

0,0001).

Há diferença significativa entre os machos com e sem cromossomo B. Sendo a região da cabeça e da nadadeira caudal as que sofrem as maiores deformações, tanto entre as fêmeas como entre os machos.

Houve diferenças também entre fêmeas e machos com cromossomo B. A deformação relativa a essas diferenças continuou sendo na cabeça e na nadadeira caudal, no entanto nesse caso a deformação foi mais marcante. Ainda, houve diferença entre fêmeas e machos sem esse elemento.

Na figura 19 podemos observar a posição dos escores da combinação das variáveis sexo e presença do cromossomo B. No eixo canônico x temos a separação de fêmeas (eixo canônico +) e machos (eixo canônico -). No eixo canônico y temos a separação de indivíduos com cromossomo B (eixo canônico +) e indivíduos sem cromossomo B (eixo canônico -).

Discussão

As fêmeas possuem corpo mais fusiforme em relação aos machos, sugerindo um melhor aproveitamento hidrodinâmico na competição contra predadores e na busca de alimento (SIBBING; NAGELKERKE, 2001), podendo ter dessa forma uma vantagem na tentativa de obtenção de recursos energéticos os quais poderão ser aproveitados para a reprodução. As fêmeas com cromossomo B, apesar de mais fusiformes que os machos, possuem morfologia semelhante aos machos sem cromossomo B.

Conclusão

Há diferenças morfométricas entre espécimes com e sem cromossomo B, tanto entre as fêmeas como entre os machos e entre as fêmeas e os machos. Assim, parece haver no mínimo associação entre a presença do cromossomo B e diferenças na morfometria geométrica. É necessário mais estudos para o entendimento do cromossomo B e se ele beneficia de alguma forma os indivíduos que o portam.

Agradecimentos

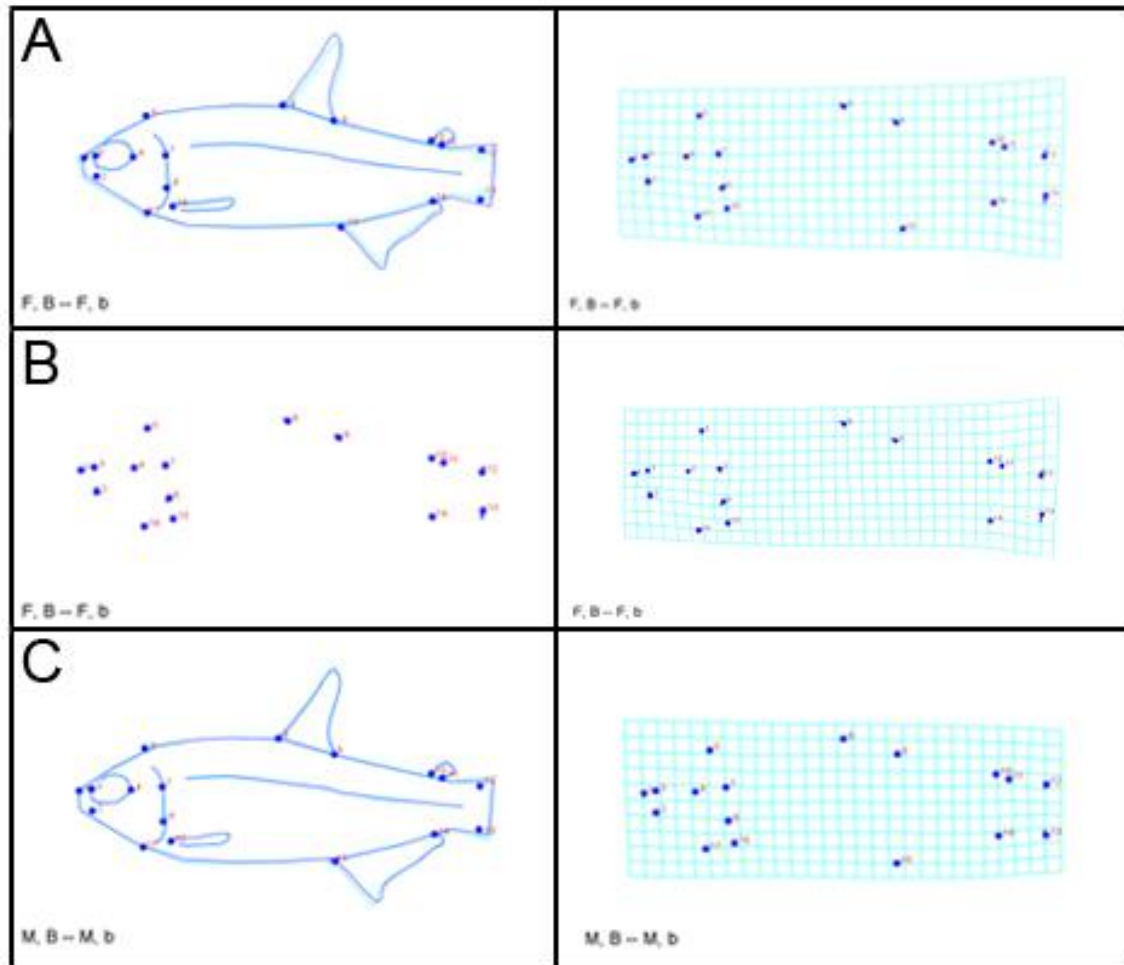
Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior-CAPES e FAPESP.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Figura 18: Prancha da morfometria geométrica e das deformações em *Astyanax scabripinnis* entre: A) Fêmeas com e sem cromossomo B levando em consideração o marco anatômico referente à região abdominal; B) Fêmeas com e sem cromossomo B não levando em consideração o marco anatômico referente à região abdominal; C) Machos com e sem cromossomo B; D) Fêmeas e machos com cromossomo B levando em consideração o marco anatômico referente a região abdominal; E) Fêmeas e machos com cromossomo B não levando em consideração o marco anatômico referente a região abdominal; F) Fêmeas e machos sem B levando em consideração o marco anatômico referente à região abdominal e G) Fêmeas e machos sem B não levando em consideração o marco anatômico referente à região abdominal. A deformação de cada CV em relação à configuração de referência é representada pela linha azul escuro e a configuração de referência pela linha azul claro.



(Continua)

(Conclusão)

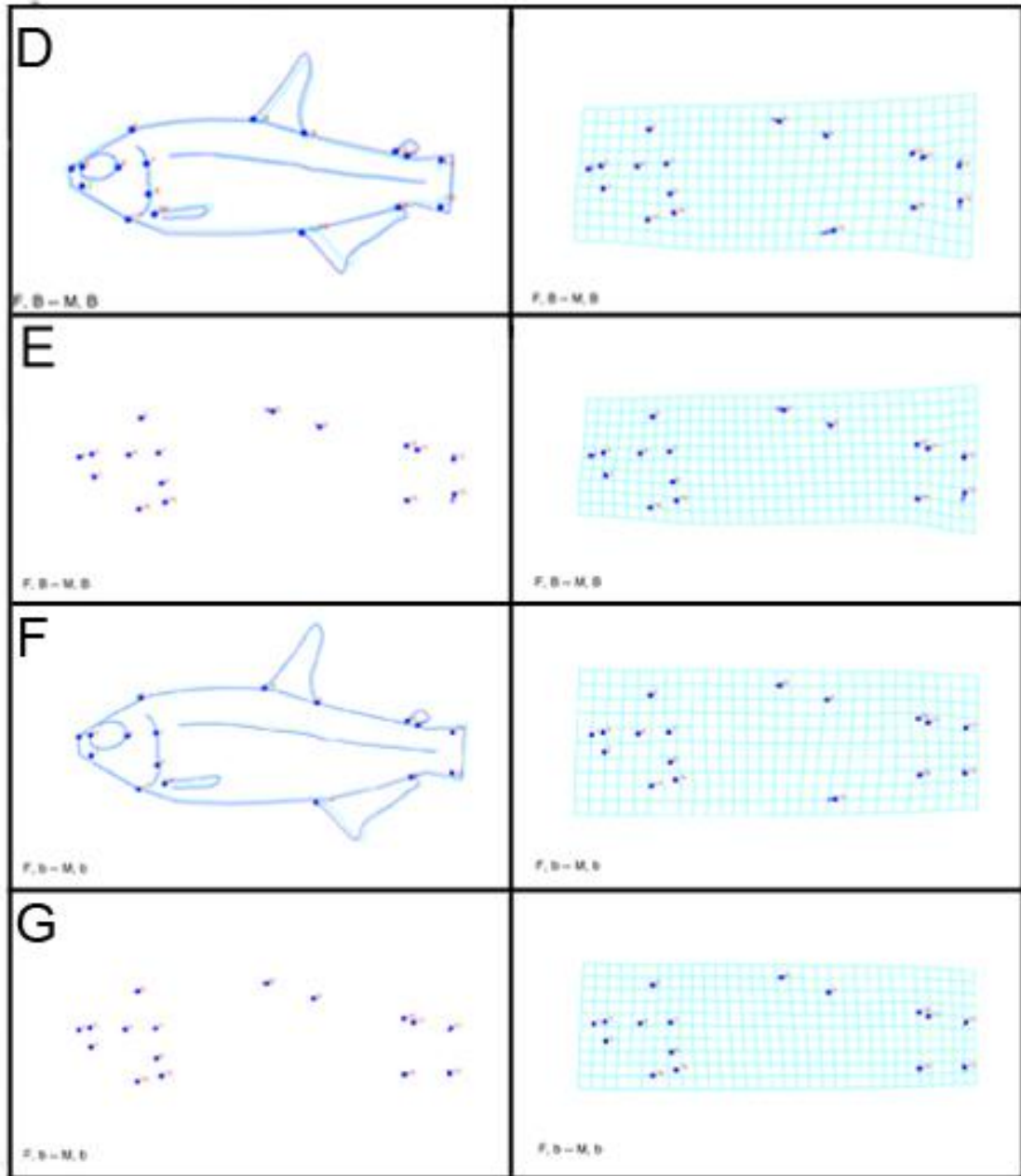
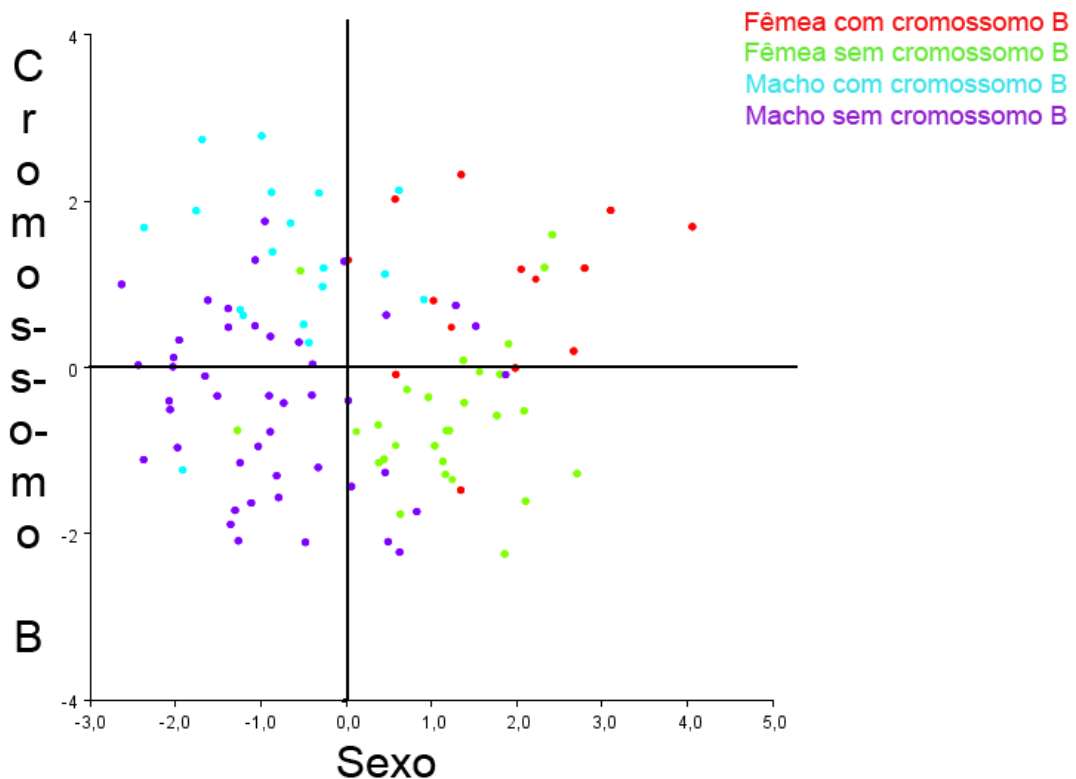


Figura 19: Posição dos escores da combinação das duas variáveis (sexo e presença do cromossomo B) em *Astyanax scabripinnis*, no espaço do primeiro e do segundo eixo canônico. No eixo x= variável sexo; no eixo y= variável presença do cromossomo B.



5. Considerações finais

Em conclusão, a presença de cromossomos B foi relacionada a possíveis estratégias reprodutivas distintas, especialmente em relação ao aporte energético e estádios de desenvolvimento gonadal. Há diferenças morfométricas na população estudada de *Astyanax scabripinnis* tanto em relação ao sexo como para a presença de cromossomo B. Ainda há muito a ser respondido sobre a presença desse cromossomo e no que ele pode ou não estar implicado nas espécies que o possuem.

6. Referências Bibliográficas

- ABILHOA, V. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 997–1005, 2007.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, v. 71, p. 5 – 16, 2004.
- 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.
- ANDRADE, D. R.; MATTA, S. L. P.; ROCHA, J. S. Observação sobre as espículas da nadadeira anal do lambari- prata (*Astyanax scabripinnis*) (Pisces- Characidae) em cativeiro. In: XI Encontro anual de aquicultura. Resumos, 1994.
- ARTONI R. F. et al. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Parana, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 197–202, 2006.
- AVISE, J. C.; MANK, J. E. Evolutionary Perspectives on Hermaphroditism in Fishes. **Sexual development**, v. 3, p. 152–163, 2009.
- BALDISSEROTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria. Rio Grande do Sul. Editoraufsm, 2009, 352p.
- BERTACO, V. A.; CARVALHO, F. R. New species of Hasemania (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from Central Brazil, with comments on the endemism of upper rio Tocantins basin, Goiás State. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n.1, p. 27-32, 2010.
- BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Redescription of the *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 1, p. 7-20, 2010.
- BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 53-60, 2006.
- BERTACO, V. A.; MALABARBA, L. R. Description of new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the “*A. scabripinnis* species complex”. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 12, n. 3, p. 221-234, 2001.
- BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BOOKSTEIN, F. L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis.

Bulletin of Mathematical Biology. v. 58, p. 313-365, 1996.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de Identificação de peixes da região de Três Marias:** com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco. Brasília: CODEVASF, 1988, 115 p.

BURNS, J. R. et al. Internal fertilization, testis and sperm morphology in Glandulocaudinae fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). **Journal of Morphology**, v. 224, n. 42, p. 131-145, 1995.

CAMACHO, J.P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B chromosome evolution. **The royal society**, v. 355, p. 163-178, 2000.

CARAMASCHI, E. P. **Estudos da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, Botucatu, SP, 1986.

CARVALHO, R. A.; MARTINS- SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. B Chromosomes: na update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of fish biology**, v. 72, p. 1907- 1932, 2008.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin, southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 7, n. 4, p. 337-352, 1997.

CLABAUT, C. et al. Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptative character of the tanganyikan cichlid fish radiations. **Evolution**, v. 3, n.61, p.560-578, 2007.

DADOS METEOROLÓGICOS. Disponível em:<
<http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/>>. Acesso em 15/04/2013.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, p. 157-163, 1994.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, n. 119, p. 147–153, 2003.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). **FishBase**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. acesso em: 10 fev. 2010.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Serie Zoologia**. v. 13, p. 65–88, 2000.

GERY, J. **Characids of the World**. New Jersey, T. F. H. Publications, 1977, 672 p.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes. **Maringá: EDUEM**, 2007.

GREENWOOD, P. H. et al. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 131, n. 4, p.339 - 456, 1966.

GOMIERO, L. M.; GARUANA, L.; BRAGA, F. M. S. Reproduction of *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) (Characiforms) in the Serra do Mar State Park, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 187-192, 2008.

HAMMER; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D.; PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, n.1, p. 1-9, 2001.

HIRT, L. M.; ARAYA, P. R.; FLORES, S. A. Populacion structure, reproductive biology and feeding of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) in na Upper Paraná River tributary, Misiones, Argentina. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 1, p. 1- 12, 2011.

JONES, R. N.; REES, H. **B Chromosomes**. 1982. 266p.

KAVALCO, K. F. **Estudos evolutivos no gênero Astyanax (Pisces, Characidae)**. 2008. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KAVALCO, K. F. et al. Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax aff. Bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, p.108-119, 2011.

KLINGENBERG, C. P.; MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**, v. 11; p. 353-357, 2011.

KOBAYASHI, Y.; NAGAHAMA, Y.; NAKAMURA M. Evolutionary Perspectives on Hermaphroditism in Fishes. **Sexual Development**, v. 7, p.115–125, 2012.

LANGERHANS, R. B. et al. Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 80, p. 689-698, 2003.

LIMA, F. C. T. et al. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: **Reis, R. E.; S. O. Kullander; Ferraris JR. C. J. (Org.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurence of a macro b-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, n. 2, p. 153-156, 1994.

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

MALABARBA, L. R. E.; WEITZMAN, S. H. Description a new genus with six new species form southern brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (teleostei: characiformes: characidae). **Comunicações do Museu de**

Ciência e Tecnologia PUC-RS. Série Zoologia, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p. 67-151, 2003.

MATOS, I. et al. Evidence for Hermaphroditism in the *Squalius alburnoides* Allopolyploid Fish Complex. **Sexual Development**, v.4, p. 170-175, 2010.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University press, 1942.

MCEACHRAN, J. D.; DEWITT, T. J. A new livebearing fish, *Heterandria tuxtlaensis*, from Lake Catemaco, Veracruz, Mexico (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Zootaxa**, 1824, p. 45-54, 2008.

MELO, F. C. S. A de. et al. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari- prata (*Astyanax scabripinnis*) (Characidae, tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, v. 52, n. 304, p. 811- 829, 2005.

MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v.85, p. 1-9, 2000.

MIRANDE, J. M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v. 25, n. 6, p. 574-613, 2009.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, n. 127, p. 249-253, 1997.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n.1, 1998.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. dos. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 1999, 189p.

MORAES, D. A de. A morfometria geométrica e a “revolução na morfometria” localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim**, n.3, 2003.

MOREIRA, C. L. R. **Relações filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei, Ostariophisi)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2007.

MOREIRA-FILHO, O. ; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. **Brazil J. Genet**, v. 14, p. 331–357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenet Genome Res**, n. 106, p. 230- 234, 2004.

MORELLI S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces,

Characidae). **Karyotypic Variability**. *Caryologia*, v. 36, p. 235-244, 1983.

MORRONE J. J. Biogeographical regions under track and cladistics scrutiny. **Journal of Biogeography**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2002.

NAVARRO, R. D. et al. Influência do sexo no desempenho de lambari prata (*Astyanax scabripinnis*, Jenyns, 1842). **Zootecnia Tropical**, v. 21, n. 4, p. 359-369, 2003.

NAVARRO, R. D. et al. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis*- Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. **Zootecnia Tropical**, v. 24, n. 2, p. 165-176, 2006.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4 ed., Hoboken, John Wiley & Sons, 2006. 624p.

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

NIKOLSKI, G. V. 1969. **Theory of fish population dynamics**. Edinburgh: Ed. Oliver e Boyd. 323 p.

PANDIAN, T. J. 2012. **Genetic sex differentiation in fish**. Taylor e Francis Group. 135p.

PAZZA, R. et al The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): A multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 2002–2010, 2008.

PEREIRA- FILHO et al. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari- prata, *Astyanax scabripinnis* Jenyns, 1842 (Characidae; Tetragonopterinae; Teleostei) em condições de cativeiro. **Ci. Anim. Bras.**, v. 12, n. 4, p. 626- 634, 2011.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

PORTO-FORESTI, F. et al. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a smallstream. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 377-380, 1997.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. L. (EDS.). **Checklist of the freshwater fishes of the South and Central America**. Porto Alegre: Ed. pucrs, 2003, 729 p.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 2003, 503p.

ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supernumerary B chromosome

restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 601– 615, 1993.

ROHLF, F. J.; *tpsDig*, version 2.16. Departament of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>), acessado em 10/Janeiro/2013), 2010.

SÁ, M. F. P. de et al. Occurrence of intersexuality in “lambaris”, *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842), small characids from the brazilian streams. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 51, n. 2, p. 315- 322, 2008.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B c hromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p. 50- 56, 1992.

SANTOS, H. S. L. dos. **Histologia de peixes**. Jaboticabal: Funep, 1995. 153p.

SAZIMA, I. Scale eating in characoids and other fishes. **Environmental Biology of fishes**, v. 9, n.2, p.87-101, 1983.

SHIBATTA, O. A., ARTONI, R. F. Sobre a identidade das populações alopátricas de *Astyanax* (Characiformes, Characidae) das formações Furna 1 e Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11, n.2, p.7-12, 2005.

SIBBING, F. A.; NAGELKERKE, L. A. J. Resource partitioning by Lake Tana barbs predicted from fish morphometrics and prey characteristics, **Reviews in Fish Biology and Fisheries** n. 10, p. 393–437, 2001.

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

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: **Phylogeny and Classification of neotropical Fishes** (Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. Porto Alegre: ed. edipucrs, 1998. p. 1-11.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes telósteos**: teoria e prática. Maringá: Eduem, 1996. 169 p.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei; Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, n. 4, p. 627- 640, 1992.

VEREGUE, A. M. L.; ORSI, M. L. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Ostheichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 97- 105, 2003.

VICARI, M. R. et al. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, p. 1073 – 1081, 2011.

VICENTE, V. E.; MOREIRA- FILHO, O.; CAMACHO, P. M. Sex- ratio distortion associated with the presence of B- chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 74, p. 70- 75, 1996.

VICENTE, V. E. Estudos sobre cromossomo B em três populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos, São Paulo, Brasil.

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

YOSHIDA, K. et al. B Chromosomes have a funcional effect on female sex determination in lake Victoria cichlid fishes. **Plos genetics**, v. 7, ed. 8, 2011.

7. Anexos

7.1 Protocolos de Citogenética Convencional

1.1) Sacrifício do animal (peixe):

Colocar o peixe em solução de benzocaína 1% até anestesia profunda.

Fazer incisura abdominal do poro genital em direção à cabeça expondo assim os órgãos.

1.2) Preparação de cromossomos mitóticos (método direto) segundo Bertollo; Takahashi e Moreira- Filho (1978)

Retirar o rim (anterior e/ou posterior).

Lavar rapidamente o material retirado em solução hipotônica de KCl a 0,075 M e transferi-lo para tubos de ensaio contendo 5ml de solução hipotônica.

Divolucionar bem o material com uma seringa desprovida de agulha, aspirando e expirando suavemente para separar as células e obter uma suspensão celular homogênea.

Colocar a suspensão obtida em estufa a 36-37° C, durante cerca de trinta minutos.

Ressuspender o material com auxílio de uma pipeta de Pasteur e descartar pedaços de tecido ainda não desfeitos.

Acrescentar algumas gotas de fixador (metanol e ácido acético 3:1), recém preparado, ressuspender o material, transferir para tubos Falcon.

Centrifugar por dez minutos, a 1700 rpm, descartando o sobrenadante.

Adicionar vagarosamente, 5ml de fixador recém preparado, deixando escorrer pela parede do tubo Falcon.

Ressuspender o material cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Centrifugar por dez minutos a 1700 rpm e descartar o sobrenadante.

Repetir os itens h, i e j por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar cerca de 1ml de fixador, ressuspender bem o material. Este poderá ser guardado então em freezer, acondicionado em tubos tipo Ependorff até a preparação das lâminas.

Pingar 3-4 gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e seca, previamente mergulhada em água a 60° C formando uma fina camada de água sobre esta.

Deixar secar ao ar.

Corar em solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (pH= 6,8), durante 7-8 minutos.

Lavar a lâmina em água destilada ou água corrente e deixar secar ao ar.

7.2.1 Protocolos de Citogenética Molecular

2.1) Microdissecção e amplificação e marcação da sonda

A suspensão celular deve ser gotejada sobre uma lamínula, posteriormente corada em Giemsa 2% (v/v) por 5 minutos e lavada em água destilada. As microdissecções cromossômicas foram realizadas em microscópio invertido (Olympus) equipado com microdissector mecânico (Eppendorf). Foram microdissectados 20 cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7 µm. Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo, onde foi realizada a primeira amplificação por DOP-PCR.

2.2) Amplificação e Marcação da sonda por DOP- PCR

Primeira DOP-PCR

14,5 µl de água mili-Q;

2,0 µl tampão da thermo;

0,5 µl primer DOP 10pM e

2,0 µl DNTPs 2mM

Colocar no thermobloco a 100°C por 10 minutos.

Diluir 0,32 µl da enzima em 1,68 µl de tampão e adicionar à reação.

Hold 94°C por 3 minutos

12 ciclos 94°C por 1' 30"

37°C por 2'

37°C por 1'

72°C por 2'

30 ciclos 94°C por 1'30"

56°C por 1'

72°C por 1'30''

Preparação do gel de agarose 1% para observação do tamanho dos fragmentos de DNA.

2.3) Preparação do gel de agarose 1%

Pesar 0,3g de agarose em um erlenmeyer, medir 30ml de TBE 1 vez para gel na proveta. Juntar os dois no erlenmeyer e levar ao microondas por 30''. Observar se a solução se tornou translúcida, caso isso não ocorra, colocar no microondas por mais 10' observado sempre. Repetir esse último processo até a solução torna-se translúcida. Esperar esfriar a solução a temperatura ambiente, despejá-la na cubeta pequena já montada e deixar secando por aproximadamente 15'. Montar a cubeta maior, colocar TBE 1 vez para corrida. Quando o gel já estiver com a consistência adequada (como gelatina) colocar a cubeta menor com o gel na maior e retirar o pente com cuidado.

Misturar 3 µl da amostra com 1 µl de azul de bromofenol, aplicá-los em 3 µl de gel red e depois no gel de agarose 1%. Ligar os eletrodos na cuba e a fonte na corrente elétrica a 100 voltz, esperar por 30 a 40 minutos. Analisar se formou um arrasto.

Segunda DOP-PCR

29,6 µl de água mili Q;

1,0 µl do produto da primeira DOP-PCR;

10 µl de tampão 5 vezes;

3,0 µl MgCl₂ 50mM;

4,0 µl dNTPs 2mM;

2,0 µl primer DOP 100mM e

0,4 µl taq.

1 ciclo 94°C por 5'

35 ciclos 94°C por 1'30''

52°C por 1'30''

72°C por 45''

1 ciclo 72°C por 5'

4°C forever

Preparação do gel de agarose 1% para observação do tamanho dos fragmentos de DNA.

Terceira DOP-PCR

28,3 µl de água mili Q;
2,0 µl da amostra da segunda DOP-PCR;
10,0 µl de tampão 5 vezes;
3,0 µl de MgCl₂;
1,0 µl de dCTP;
1,0 µl de dGTP;
1,0 µl de dATP;
0,7 µl de dTTP;
0,6 µl de dUTP digoxigenina;
2,0 µl de primer DOP 100mM e
0,4 µl de taq.

2.4) Hibridação fluorescente in situ (FISH)

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

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

Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;

Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;

Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez;

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

Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação;

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

Desnaturar a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente para o gelo;

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

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

2.5) Preparar câmara úmida à 37°C;

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

VI - Lavagens

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

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

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

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

Montar um mix de anticorpos com 994µl NFDm+ 1µL de avidina FITC conjugada+ 5µl de anti digoxigenina rodamina conjugada;

Incubar as lâminas com 100 µl de do mix de anticorpos durante uma hora em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

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

Desidratar em série alcoólica, 70, 85 e 100% por 5 minutos cada e secar;

Montagem da lâmina

Misturar 400 µl de antifading mais 1 µl de DAPI (0,2mg/mL);

Colocar 50 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

2.6) Análise dos Marcadores citogenéticos

As preparações foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 40 e capturadas com câmera digital CCD Olympus DP71 13 mp. Para a análise com DAPI foi utilizado filtro de comprimento de onda variando de 360 a 390 nm.

7.3 Protocolo de Histologia

3.1) O processo de preparação para inclusão:

Álcool a 70% por uma hora.

Álcool a 80% por uma hora.

Álcool a 90% por uma hora.

Álcool a 100% por uma hora.

Álcool a 100% por uma hora.
Álcool a 100% por 30 minutos.
Xilol por 30 minutos.
Xilol por 30 minutos.
Parafina por uma hora.
Parafina por uma hora.

3.2) O processo de inclusão:

Inclusão em parafina líquida. Orienta-se a peça com o auxílio de uma pinça.
Após solidificação completa as peças foram moldadas com uma navalha de micrótomo.
Os blocos foram mantidos em geladeira até o momento de serem cortados.

3.3) O processo de corte e colagem:

Foram feitos cortes de 5µm de espessura em micrótomo.
As fitas que saíram do micrótomo foram colocadas em álcool 50% e “pescadas” com lâmina limpa.
Em seguida, esses cortes foram colocados em água aquecida à 47°C e “pescados” com lâminas previamente preparadas com esfregaço de albumina e aquecidas.
As lâminas foram secas ao ar livre de um dia para o outro.

3.4) O processo de coloração:

Xilol por cinco minutos.
Xilol por cinco minutos.
Álcool a 100% por cinco minutos.
Álcool a 90% por cinco minutos.
Álcool a 80% por cinco minutos.
Álcool a 70% por cinco minutos.
Três banhos em água destilada.
Hematoxilina de Harris por um minuto.
Lavagem em água destilada por dez minutos.
Eosina por 40 segundos.
Três banhos em água destilada
Álcool a 70% por um minuto.

Álcool a 100% por dois minutos.

Álcool a 100% por dois minutos.

Álcool a 100% por dois minutos.

Xilol por cinco minutos.

Xilol por cinco minutos.

3.5) O processo de montagem:

Colocou-se uma gota de Permount sobre a lamínula e pressionou-se a lâmina com o corte sobre esta. Esperar secar.

Observação: A morfologia macroscópica dos ovários de *Astyanax scabripinnis* segue o padrão da maioria dos teleósteos, sendo órgãos pares, alongados que sofrem modificações durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo.

7.4 Quadro 1: Escala para classificação macroscópica das gônadas segundo Vazzoler (1996).

Estádios de maturação	Descrição
Imaturo	Muito pequenas, ocupam menos de 1/3 da cavidade celomática; filamentosos e translúcidos, sem sinais de vascularização; no ovário não se observam ovócitos.
Em maturação	Gônadas ocupam de 1/3 à 2/3 da cavidade celomática, vascularizados; nos ovários dá-se para observar ovócitos opacos, pequenos e médios.
Maduro	Os testículos e ovários apresentam-se túrgidos, ocupam de 2/3 à toda a cavidade celomática; são visíveis um grande número de ovócitos grandes opacos ou translúcidos; a vascularização é reduzida.
Esgotado	Gônadas flácidas com membranas distendidas; ocupam menos da metade da cavidade celomática; observam-se poucos ovócitos, muitas vezes formando grumos esbranquiçados; a característica mais marcante é a presença de zonas hemorrágicas
Em repouso	As gônadas apresentam tamanho reduzido, ocupando cerca de 1/3 da cavidade celomática, sendo claramente maiores que os imaturos; são translúcidos com pouca vascularização, não se observam ovócitos a olho nu.

7. 5 Quadro 2: Descrição das células femininas encontradas nos ovários

Pré-Vitelogênese	Ovócito I	Citoplasma basófilo, homogeneamente pouco granulado, núcleo grande e hialino, célula aproximadamente esférica de tamanho reduzido. A cromatina se distribui por todo o nucleoplasma. Presença de nucléolos arredondados e basófilos localizados perifericamente ao envoltório nuclear nos ovócitos dessa fase um pouco mais desenvolvidos. Células visíveis em ovários imaturos, em repouso e nas últimas etapas dos ovários em recuperação.
	Ovócito II	Redução da basofilia citoplasmática quando comparado com o ovócito I, citoplasma com aspecto mais granular. Núcleo grande com muitos nucléolos na sua periferia em contato com o envoltório nuclear. Nessa fase já dá para observar a membrana vitelínica envolvendo o ovócito. Células presentes em gônadas em todas as fases de maturação.
Vitelogênese	Ovócito III	Vacúolos claros distribuídos uniformemente por todo o citoplasma. Núcleo grande, claro e basófilo, a cromatina possui aspecto granular distribuído de forma heterogênea. Envoltório nuclear irregular com muitos nucléolos que parecem migrar para o citoplasma. Membrana vitelínica mais espessa e já consegue-se observar as células foliculares pavimentosas.
	Ovócito IV	Maiores ovócitos observados. Em algumas células ocorre o alvéolo cortical localizado mais externamente ao ooplasma. A vitelogênese se completa, estes ovócitos estão prontos para serem eliminados e ocorre em ovários maduros.

Fonte: A autora

Outras estruturas presentes no ovário:

Folículos pós-ovulatórios: originam-se a partir dos folículos vazios (pós-desovados), as células foliculares se hipertrofiam penetrando no espaço antes ocupado pelo citoplasma, apresentando um aspecto de cordões dobrados.

Folículos atrésicos em absorção: por não terem sido eliminados ou por outras razões fisiológicas, alguns ovócitos sofrem processos degenerativos, sendo desintegrados e absorvidos.

Corpos residuais: Pequenos corpos maciços de células poliédricas grandes, com núcleos excêntricos e citoplasma de cor marrom, rodeados por delgada lâmina de células conjuntivas.

7. 6 Quadro 3: Descrição das células masculinas encontradas nos testículos.

Espermatogônia I	Maiores células da linhagem germinativa, elas aparecem isoladas. Citoplasma abundante, levemente corado de rosa, núcleo grande e arredondado, nucléolo único.
Espermatogônia II	Núcleo grande e mais corado (um pouco menor do que o da espermatogônia I). Essas células não aparecem isoladamente, e possuem o citoplasma um pouco menos evidente.
Espermatócito I	Ocorrem agrupados em cistos, citoplasma pouco corado, núcleo fortemente corado e com aspecto granular.
Espermatócito II	Citoplasma escasso, núcleo fortemente corado, células um pouco maiores que as espermátides.
Espermátide	Semelhantes aos espermatozoides, no entanto são localizados mais periféricamente e encistados. Pouco citoplasma com núcleo esférico.
Espermatozóide	Não ocorre encistado, o núcleo é fortemente corado. São as menores células da linhagem germinativa.
Célula de Sertoli	Possui núcleo achatado levemente triangular. Essa célula faz parte do tecido intersticial e os prolongamentos do seu citoplasma forma os cistos.

Fonte: A autora

7. 7 Relatório dos dados gerados pela análise morfométrica, pelo software Morpho J 1.02j (Klingenberg, 2008) e Past 2.10 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

17 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0,29014727	0,01227105
2	-0,26879253	-0,01953617
3	-0,27032901	0,01592947
4	-0,20687498	0,01457585
5	-0,18504699	0,08124836
6	-0,15335310	-0,03508802
7	-0,15605692	0,01908472
8	0,03468052	0,09788137
9	0,12170533	0,07237295
10	0,27916527	0,04062556
11	0,29724828	0,03346879
12	0,35948045	0,02218982
13	0,35867057	-0,05175861
14	0,28312113	-0,05717098
15	0,12620721	-0,10049687
16	-0,14251638	-0,06770066

17 -0,18716158 -0,07789664

Procrustes sums of squares: 0.4281384999419825

Tangent sums of squares: 0.426099592291552

Data matrices in this dataset:

- newDataset, raw data
- newDataset, centroid size
- newDataset, Procrustes coordinates

Principal Component Analysis: PCA: CovMatrix, newDataset, Procrustes coordinates

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	0,00040256	27,681	27,681
2.	0,00021381	14,702	42,383
3.	0,00016019	11,015	53,399
4.	0,00012614	8,674	62,073
5.	0,00010886	7,485	69,558
6.	0,00007154	4,920	74,477
7.	0,00006260	4,305	78,782
8.	0,00005760	3,961	82,743
9.	0,00004411	3,033	85,776
10.	0,00003738	2,570	88,346
11.	0,00002590	1,781	90,127
12.	0,00002294	1,577	91,705
13.	0,00002174	1,495	93,199
14.	0,00001698	1,168	94,367
15.	0,00001328	0,913	95,280
16.	0,00001295	0,891	96,171
17.	0,00000939	0,645	96,816
18.	0,00000897	0,617	97,433
19.	0,00000749	0,515	97,948
20.	0,00000613	0,421	98,369
21.	0,00000506	0,348	98,717
22.	0,00000487	0,335	99,052
23.	0,00000316	0,217	99,269
24.	0,00000289	0,198	99,467
25.	0,00000202	0,139	99,606
26.	0,00000187	0,129	99,735
27.	0,00000131	0,090	99,825
28.	0,00000111	0,077	99,902
29.	0,00000082	0,056	99,958
30.	0,00000061	0,042	100,000

Total variance: 0,00145426

Dataset 'PC scores, CovMatrix, newDataset, Procrustes coordinates'

17 landmarks in 1 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Data matrices in this dataset:

- PC scores, CovMatrix, newDataset, Procrustes coordinates

Canonical Variate Analysis: CVA ...Presen軋B_Sexo

Dataset: newDataset

Classification criterion: Sexo, Presen軋B

Groups Observations

1.	F, B	33
2.	F, b	72
3.	M, B	54
4.	M, b	135

Variation among groups, scaled by the inverse of the within-group variation

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	1,21218483	58,504	58,504
2.	0,56832873	27,429	85,933
3.	0,29146587	14,067	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	2,2682		
M, B	3,1211		2,7106
M, b	3,1354		2,2218
			1,9149

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	<.0001		
M, B	<.0001		<.0001
M, b	<.0001		<.0001
			<.0001

Procrustes distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	0,0153		
M, B	0,0239		0,0162
M, b	0,0193		0,0133
			0,0093

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Procrustes distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	0,0016		
M, B	<.0001		<.0001

M, b 0,0013 <.0001 0,0149

Canonical coefficients:

	CV1	CV2	CV3
x1	-88,9937	-99,8583	-121,1942
y1	-130,9798	-24,9711	53,8708
x2	52,5954	4,8295	7,6023
y2	61,6849	48,0315	-34,7968
x3	86,9627	71,9018	72,4078
y3	228,1750	179,1123	-131,4216
x4	-146,8640	141,2815	141,6007
y4	-175,1320	-175,9029	178,0393
x5	-36,9057	63,4346	41,1544
y5	-11,2042	-31,4361	-45,8350
x6	106,4525	291,9966	-77,7641
y6	50,9256	31,2504	-56,4333
x7	64,3474	-451,8158	-164,5032
y7	-36,6123	-28,7068	7,5796
x8	68,5331	79,1692	1,6405
y8	-40,8103	-111,0784	186,4315
x9	-34,1905	-0,7314	15,6341
y9	-0,6742	186,7867	-250,8390
x10	34,7576	-79,1090	11,7014
y10	84,3310	88,7829	-86,2362
x11	-65,5174	95,9757	3,3297
y11	-87,4221	-38,5428	43,8188
x12	0,5205	-111,5298	-70,9260
y12	1,3996	-37,9320	1,1525
x13	19,6813	113,5055	91,5019
y13	5,1976	-46,6550	26,3416
x14	-21,1710	-35,9405	-19,4930
y14	-9,7410	30,3644	29,2047
x15	61,6844	-42,1535	-1,2465
y15	48,5159	-34,6312	52,3145
x16	-37,1656	1,2289	44,6849
y16	27,0029	-74,3231	77,5944
x17	-64,7269	-42,1849	23,8693
y17	-14,6565	39,8511	-50,7856

Dataset 'CVA ...Presen軋B_Sexo, scores'

17 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0,29014727	0,01227105
2	-0,26879253	-0,01953617

3	-0,27032901	0,01592947
4	-0,20687498	0,01457585
5	-0,18504699	0,08124836
6	-0,15335310	-0,03508802
7	-0,15605692	0,01908472
8	0,03468052	0,09788137
9	0,12170533	0,07237295
10	0,27916527	0,04062556
11	0,29724828	0,03346879
12	0,35948045	0,02218982
13	0,35867057	-0,05175861
14	0,28312113	-0,05717098
15	0,12620721	-0,10049687
16	-0,14251638	-0,06770066
17	-0,18716158	-0,07789664

Data matrices in this dataset:

- CVA ...Presen軋B_Sexo, scores

Canonical Variate Analysis: CVA ...Presen軋B

Dataset: newDataset

Classification criterion: Presen軋B

Groups	Observations
1. B	87
2. b	207

Variation among groups, scaled by the inverse of the within-group variation

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	0,57932538	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	B
b	1,6618

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups:

	B
b	<.0001

Procrustes distances among groups:

	B
b	0,0063

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Procrustes distances among groups:

B
b 0,0938

Canonical coefficients:

	CV1
x1	-120,9557
y1	-43,8251
x2	14,2539
y2	55,7775
x3	90,1241
y3	207,5785
x4	122,4448
y4	-192,4763
x5	58,6065
y5	-35,6546
x6	301,0524
y6	36,0950
x7	-443,7402
y7	-34,0942
x8	89,8199
y8	-105,0643
x9	-5,6473
y9	168,5652
x10	-71,2016
y10	96,6697
x11	83,4330
y11	-50,3112
x12	-114,0153
y12	-37,0343
x13	120,6799
y13	-43,4418
x14	-40,2044
y14	29,9917
x15	-30,9765
y15	-22,5850
x16	-2,4666
y16	-63,8260
x17	-51,2069
y17	33,6353

Dataset 'CVA ...Presen軋B, scores'

17 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0,29014727	0,01227105
2	-0,26879253	-0,01953617
3	-0,27032901	0,01592947
4	-0,20687498	0,01457585
5	-0,18504699	0,08124836
6	-0,15335310	-0,03508802
7	-0,15605692	0,01908472
8	0,03468052	0,09788137
9	0,12170533	0,07237295
10	0,27916527	0,04062556
11	0,29724828	0,03346879
12	0,35948045	0,02218982
13	0,35867057	-0,05175861
14	0,28312113	-0,05717098
15	0,12620721	-0,10049687
16	-0,14251638	-0,06770066
17	-0,18716158	-0,07789664

Data matrices in this dataset:

- CVA ...Presen軋B, scores

Canonical Variate Analysis: CVA ...Sexo

Dataset: newDataset

Classification criterion: Sexo

Groups	Observations
1. F	105
2. M	189

Variation among groups, scaled by the inverse of the within-group variation

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	1,16590835	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	F
M	2,2458

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups:

	F
M	<.0001

Procrustes distances among groups:

M F
0,0143

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Procrustes distances among groups:

M F
<.0001

Canonical coefficients:

	CV1
x1	-60,6739
y1	-132,3466
x2	50,2057
y2	59,1017
x3	68,0006
y3	218,7761
x4	-178,7259
y4	-172,6936
x5	-48,9622
y5	-1,6331
x6	78,9241
y6	53,1863
x7	137,8525
y7	-33,4606
x8	57,6340
y8	-49,4640
x9	-35,4373
y9	7,3942
x10	42,2944
y10	82,7261
x11	-76,4082
y11	-86,6539
x12	22,6200
y12	5,8125
x13	-5,5042
y13	7,5272
x14	-14,1027
y14	-16,8040
x15	65,8910
y15	45,5022
x16	-42,1425
y16	26,0549
x17	-61,4656
y17	-13,0255

Dataset 'CVA ...Sexo, scores'

17 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0,29014727	0,01227105
2	-0,26879253	-0,01953617
3	-0,27032901	0,01592947
4	-0,20687498	0,01457585
5	-0,18504699	0,08124836
6	-0,15335310	-0,03508802
7	-0,15605692	0,01908472
8	0,03468052	0,09788137
9	0,12170533	0,07237295
10	0,27916527	0,04062556
11	0,29724828	0,03346879
12	0,35948045	0,02218982
13	0,35867057	-0,05175861
14	0,28312113	-0,05717098
15	0,12620721	-0,10049687
16	-0,14251638	-0,06770066
17	-0,18716158	-0,07789664

Data matrices in this dataset:

- CVA ...Sexo, scores

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...' **Comparison: F, B -- F, b**

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01531892

Mahalanobis distance: 6,6409

T-square: 997,9530, P-value (parametric): <.0001

P-values for permutation tests (1000 permutation runs):

Procrustes distance: 0,0010

T-square: <.0001

(Note: The permutation test using the T-square statistic is equivalent to a test using Mahalanobis distance.)

Classification/misclassification tables

Group 1: F, B

Group 2: F, b

From discriminant function:

True	Allocated to		
Group	Group 1	Group 2	Total
Group 1	33	0	33
Group 2	0	72	72

From cross-validation:

True	Allocated to		
Group	Group 1	Group 2	Total

Group 1	32	1	33
Group 2	3	69	72

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...' **Comparison: F, B -- M, B**

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02394497

Mahalanobis distance: 90,9776

T-square: 169534,0537, P-value (parametric): <.0001

P-values for permutation tests (1000 permutation runs):

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

(Note: The permutation test using the T-square statistic is equivalent to a test using Mahalanobis distance.)

Classification/misclassification tables

Group 1: F, B

Group 2: M, B

From discriminant function:

True Group	Allocated to		Total
	Group 1	Group 2	
Group 1	33	0	33
Group 2	0	54	54

From cross-validation:

True Group	Allocated to		Total
	Group 1	Group 2	
Group 1	31	2	33
Group 2	0	54	54

Dataset 'Scores: Discriminant function ...'

17 landmarks in 1 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Data matrices in this dataset:

- Discriminant scores
- Cross-validation scores

Dataset 'Antrise sem 15'

16 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0,28611848	0,01043192
2	-0,26495423	-0,02215323
3	-0,26596648	0,01383371

4	-0,20164805	0,01148119
5	-0,17848379	0,07874492
6	-0,14814243	-0,03970622
7	-0,15004681	0,01526530
8	0,04458589	0,09222929
9	0,13243064	0,06502019
10	0,29160211	0,03039920
11	0,30982830	0,02286421
12	0,37276051	0,01046092
13	0,37079101	-0,06450312
14	0,29410445	-0,06883137
15	-0,13765945	-0,07294427
16	-0,18308319	-0,08259263

Procrustes sums of squares: 0.3856621329417688

Tangent sums of squares: 0.3836984781613774

Data matrices in this dataset:

- An疔ise sem 15, raw data
- An疔ise sem 15, centroid size
- An疔ise sem 15, Procrustes coordinates

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: An疔ise sem 15

Classification criterion: Sexo, Presen軋B

Groups	Observations
1. F, B	33
2. F, b	72
3. M, B	54
4. M, b	135

Variation among groups, scaled by the inverse of the within-group variation

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	0,99892020	56,599	56,599
2.	0,48768352	27,632	84,231
3.	0,27830730	15,769	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	2,2495		
M, B	2,7535	2,2951	
M, b	3,0043	2,0288	1,8237

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	<.0001		
M, B	<.0001		<.0001
M, b	<.0001	<.0001	<.0001

Procrustes distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	0,0151		
M, B	0,0182		0,0101
M, b	0,0154	0,0102	0,0085

P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Procrustes distances among groups:

	F, B	F, b	M, B
F, b	0,0013		
M, B	<.0001		0,0004
M, b	0,0069	0,0011	0,0321

Canonical coefficients:

	CV1	CV2	CV3
x1	-116,8809	-72,4559	-122,1352
y1	-68,7368	-57,6388	62,8539
x2	40,1007	6,9494	-0,6253
y2	42,8500	60,3576	-48,5165
x3	134,1089	19,1012	74,5070
y3	265,9560	105,5433	-119,3861
x4	-148,1667	216,2963	117,8338
y4	-212,7323	-118,6527	166,4240
x5	-31,1944	82,6416	30,9292
y5	-51,1202	5,9577	-69,8566
x6	200,1916	219,6225	-81,6325
y6	27,0848	41,3901	-65,3661
x7	-49,4731	-449,6568	-117,2241
y7	-49,3281	-2,4237	17,9863
x8	123,5862	13,3206	-4,2402
y8	-64,2276	-90,7572	192,3104
x9	-32,3508	10,1130	22,3587
y9	66,6965	142,2871	-235,1500
x10	24,0536	-91,6986	9,9427
y10	104,8201	59,1292	-119,9201
x11	-39,6381	105,6765	4,9059
y11	-93,0198	-14,5842	54,4921
x12	-29,6671	-106,4675	-67,7167
y12	-12,8968	-28,9322	2,4982
x13	57,6799	93,5125	93,4911
y13	-10,3890	-42,4148	25,5851
x14	-41,1521	-15,6510	-32,5649

y14	37,6096	-10,8969	72,8291
x15	-30,5950	5,1787	44,3145
y15	46,9251	-117,5381	95,2954
x16	-60,6025	-36,4824	27,8561
y16	-29,4915	69,1736	-32,0792

Dataset 'CVA ..., scores'

16 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0,28611848	0,01043192
2	-0,26495423	-0,02215323
3	-0,26596648	0,01383371
4	-0,20164805	0,01148119
5	-0,17848379	0,07874492
6	-0,14814243	-0,03970622
7	-0,15004681	0,01526530
8	0,04458589	0,09222929
9	0,13243064	0,06502019
10	0,29160211	0,03039920
11	0,30982830	0,02286421
12	0,37276051	0,01046092
13	0,37079101	-0,06450312
14	0,29410445	-0,06883137
15	-0,13765945	-0,07294427
16	-0,18308319	-0,08259263

Data matrices in this dataset:

- CVA ..., scores

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, B -- F, b

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01510200

Mahalanobis distance: 3,5700

T-square: 288,4006, P-value (parametric): <.0001

P-values for permutation tests (1000 permutation runs):

Procrustes distance: 0,0010

T-square: <.0001

(Note: The permutation test using the T-square statistic is equivalent to a test using Mahalanobis distance.)

Classification/misclassification tables

Group 1: F, B

Group 2: F, b

From discriminant function:

True Group	Allocated to		
	Group 1	Group 2	Total
Group 1	32	1	33
Group 2	3	69	72

From cross-validation:

True Group	Allocated to		
	Group 1	Group 2	Total
Group 1	24	9	33
Group 2	4	68	72

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...' Comparison: F, B -- M, B

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01815274

Mahalanobis distance: 23,4503

T-square: 11263,7810, P-value (parametric): <.0001

P-values for permutation tests (1000 permutation runs):

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

(Note: The permutation test using the T-square statistic is equivalent to a test using Mahalanobis distance.)

Classification/misclassification tables

Group 1: F, B

Group 2: M, B

From discriminant function:

True Group	Allocated to		
	Group 1	Group 2	Total
Group 1	33	0	33
Group 2	0	54	54

From cross-validation:

True Group	Allocated to		
	Group 1	Group 2	Total
Group 1	33	0	33
Group 2	0	54	54

Dataset 'Scores: Discriminant function ...'

16 landmarks in 1 dimensions.

The dataset contains 294 observations, of which 294 are included for analyses.

Data matrices in this dataset:

- Discriminant scores
- Cross-validation scores

7. 8 Tabelas com dados:

Tabela 1- Frequências: Coleta abril/maio/junho de 2012 (Fêmeas)						
Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	2	10,5	1	8,3	1	14,3
maturação	8	42,1	6	50,0	2	28,6
maduro	1	5,3	1	8,3	0	0,0
parcialmente esgotado	1	5,3	1	8,3	0	0
esgotado	4	21,1	2	16,7	2	28,6
repouso	3	15,8	1	8,3	2	28,6
	19	100	12	100	7	100
Tabela 2: Frequências: Coleta abril/maio/junho de 2012 (Machos)						
	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	1	5,3	1	6,7	0	0
maturação	12	63,2	9	60,0	3	75
maduro	3	15,8	3	20,0	0	0
parcialmente esgotado	1	5,3	1	6,7	0	0
esgotado	1	5,3	1	6,7	0	0
repouso	1	5,3	0	0,0	1	25
	19	100,0	15	100,0	4	100

Tabela 3- Frequências: Coleta julho/agosto/setembro de 2012 (Fêmeas)						
Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	0	0	0	0,0	0	0
maturação	1	25	0	0,0	1	50,0
maduro	0	0	0	0,0	0	0
parcialmente esgotado	3	75	2	100,0	1	50,0
esgotado	0	0	0	0,0	0	0,0
repouso	0	0	0	0,0	0	0
	4	100	2	100,0	2	100

Tabela 4: Frequências: Coleta julho/agosto/setembro de 2012 (Machos)						
Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	0	0	0	0,0	0	0
maturação	8	47,1	7	53,8	1	25
maduro	9	52,9	6	46,2	3	75
parcialmente esgotado	0	0	0	0,0	0	0
esgotado	0	0	0	0,0	0	0
repouso	0	0	0	0,0	0	0
	17	100,0	13	100,0	4	100

Tabela 5- Frequências: Coleta outubro/novembro/dezembro de 2012 (Fêmeas)						
Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	0	0	0	0,0	0	0
maturação	1	9,09	1	14,3	0	0
maduro	6	54,55	2	28,6	4	100
parcialmente esgotado	4	36,36	4	57,1	0	0
esgotado	0	0	0	0,0	0	0,0
repouso	0	0	0	0,0	0	0
	11	100	7	100,0	4	100
Tabela 6: Frequências: Coleta outubro/novembro/dezembro de 2012 (Machos)						
Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	0	0	0	0,0	0	0
maturação	7	22,6	7	31,8	0	0
maduro	22	71,0	13	59,1	9	100,0
parcialmente esgotado	2	6,5	2	9,1	0	0,0
esgotado	0	0	0	0,0	0	0
repouso	0	0	0	0,0	0	0
	31	100	22	100,0	9	100

Tabela 7- Frequências: Coleta janeiro/fevereiro/março de 2013 (Fêmeas)

Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% Com B
imaturo	6	31,58	6	40,00	0	0,00
maturação	5	26,32	3	20,00	2	50,00
maduro	1	5,26	1	6,67	0	0,00
parcialmente esgotado	7	36,84	5	33,33	2	50,00
repouso	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	19	100	15	100	4	100

Tabela 8- Frequências: Coleta janeiro/fevereiro/março de 2013 (Machos)

Estádios de maturação	Total no estádio	% do total no estádio	sem B	% sem B	com B	% com B
imaturo	1	4,76	1	5,56	0	0,00
em maturação	13	61,90	11	61,11	2	66,67
maduro	2	9,52	2	11,11	0	0,00
parcialmente esgotado	5	23,81	4	22,22	1	33,33
repouso	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	21	100	18	100,0	3	100

Tabela 9- Frequência de cromossomos B

abr/mai/jun			jul/ago/set			out/nov/dez			jan/fev/mar		
Fêm	Mach	Herm	Fêm	Mach	Herm	Fêm	Mach	Herm	Fêm	Mach	Herm
42,11	21,05	0,00	50,00	23,53	0,00	36,36	29,03	100,00	21,05	14,29	33,33

Tabela 10: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas e machos com B (abril/maio/junho 2012)

mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	RHS	2n
3335	♀	8,194	0,116	1,436	0,975	11,899	51
3336	♀	3,112	0,047	1,533	0,006	0,193	51
3352	♀	4,354	0,001	0,023	0,027	0,620	51
3365	♀	7,04	0,039	0,557	-	0,000	51
3371	♀	5,889	0,08	1,377	0,047	0,798	51
3375	♀	6,548	0,0001	0,002	0,011	0,168	51
3376	♀	2,319	0,0001	0,004	0,015	0,647	51
3385	♀	3,669	0,0001	0,003	0,005	0,136	51
3386	♂	3,473	0,013	0,000	0,014	0,000	51
3369	♂	4,25	0,013	0,000	0,025	0,001	51
3372	♂	3,903	0,009	0,000	0,035	0,001	51
3379	♂	3,314	0,006	0,000	0,028	0,001	51
				Somatória RGS	Somatória RHS		
				4,936	14,464		
				Média RGS	Média RHS		
				0,411	1,205		

Tabela 11: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas e machos com B julho/agosto/setembro 2012)

mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	RHS	2n (B)
3423	♀	16,469	0,604	3,807	0,164	0,996	51
3434	♀	11,042	0,369	3,457	0,103	0,933	51
3427	♂	6,042	0,269	4,660	0,073	1,208	51
3429	♂	11,212	0,535	5,011	0,163	1,454	51
3437	♂	3,761	0,135	3,723	0,021	0,558	51
3432	♂	4,184	0,17	4,235	0,06	1,434	51
				Somatória RGS	Somatória RHS		
				24,893	6,583		
				Média RGS	Média RHS		
				4,149	1,097		

Tabela 12: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas com B (outubro/novembro/dezembro 2012)							
mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	IHS	2n (B)
3476	♀	7,022	0,528	8,131	0,037	0,527	51
3479	♀	10,3	1,887	22,430	0,073	0,709	51
3500	♀	9,504	1,971	26,165	0,04	0,421	51
3510	♀	6,095	0,153	2,575	0,025	0,410	51
3480	♂	5,382	0,31	5,760	0,04	0,743	51
3481	♂	4,942	0,259	5,241	0,024	0,486	51
3482	♂	5,382	0,289	5,370	0,022	0,409	51
3485	♂	5,007	0,387	7,729	0,036	0,719	51
3486	♂	3,012	0,143	4,748	0,018	0,598	51
3499	♂	5,606	0,186	3,318	0,057	1,017	51
3503	♂	5,162	0,217	4,204	0,014	0,271	51
3504	♂	6,544	0,307	4,691	0,02	0,306	51
3506	♂	6,037	0,192	3,180	0,028	0,464	51
Somatória RGS				103,541	Somatória RHS	7,078	
Média RGS				7,965	Média RHS	0,544	

Tabela 13: Relação gonadosomática e Relação hepatossomática das fêmeas e machos com B (janeiro, fevereiro, março)

mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	IHS	2n (B)
3579	macho	2,63	0,0380	1,4660	0,011	0,418	51
3581	macho	3,983	0,1140	2,9465	0,026	0,653	51
3589	macho	5,018	0,0710	1,4352	0,021	0,418	51
3580	fêmea	26,329	0,7570	2,9603	0,137	0,520	51
3582	fêmea	8,417	0,3760	4,6760	0,124	1,473	51
3584	fêmea	23,678	1,3980	6,2747	0,343	1,449	51
3611	fêmea	2,27	0,0001	0,0044	0,01	0,441	51
Somatória RGS				19,7632	Somatória RHS	5,3722	
Média RGS				2,82331	Média RHS	0,7675	

Tabela 14: Índice gonadossomático e Índice hepatossomático das fêmeas e machos sem B (abril/maio/junho 2012)							
mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	RHS	2n (B)?
3339	♀	8,834	0,222	2,578	-	0,000	50
3341	♀	6,366	0,079	1,257	0,043	0,675	50
3370	♀	24,567	0,514	2,137	0,200	0,814	50
3374	♀	6,714	0,063	0,947	0,027	0,402	50
3377	♀	2,155	0,0001	0,005	0,009	0,418	50
3378	♀	6,386	0,0001	0,002	0,040	0,626	50
3380	♀	5,636	0,233	4,312	0,040	0,710	50
3383	♀	4,995	0,133	2,735	0,014	0,280	50
3387	♀	8,042	0,145	1,836	0,048	0,597	50
3333	♂	4,368	0,08		0,033	0,755	50
3337	♂	5,437	0,075		0,022		50
3343	♂	3,417	0,025	0,737	0,007	0,205	50
3351	♂	3,486	0,019	0,548	0,027	0,775	50
3367	♂	3,565	0,035	0,992	0,015	0,421	50
3368	♂	2,607	0,02	0,773	0,026	0,997	50
3373	♂	4,316	0,0001	0,002	0,003	0,070	50
3384	♂	3,356	0,016	0,479	0,013	0,387	50
3342	♂	2,428	0,011	0,455	0,009	0,371	50
Somatória RGS				19,795	Somatória RHS	8,503	
Média RGS				1,237	Média RHS	0,500	

Tabela 15: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas sem B (julho/agosto/setembro 2012)

mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	IHS	2n
3431	♀	26,580	2,171	8,894	0,287	1,080	50
3442	♀	13,674	0,919	7,205	0,027	0,197	50
3428	♂	5,393	0,234	4,536	0,069	1,279	50
3430	♂	9,489	0,236	2,551	0,071	0,748	50
3435	♂	6,522	0,372	6,049	0,116	1,779	50
3436	♂	6,974	0,254	3,780	0,056	0,803	50
3438	♂	6,118	0,19	3,205	0,066	1,079	50
3439	♂	6,410	0,186	2,988	0,063	0,983	50
3440	♂	6,411	0,283	4,618	0,076	1,185	50
3444	♂	15,187	0,413	2,795	0,083	0,547	50
3445	♂	6,043	0,139	2,354	0,07	1,158	50
3446	♂	6,800	0,219	3,328	0,07	1,029	50
3447	♂	9,406	0,334	3,682	0,11	1,169	50
Somatória RGS				55,985	Somatória RHS	13,037	
Média RGS				4,307	Média RHS	1,003	

Tabela 16: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas sem B (outubro/novembro/dezembro 2012)							
mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	RHS	2n (B)?
3466	♀	3,931	0,352	9,835	0,033	0,839	50
3468	♀	10,102	2,177	27,470	0,055	0,544	50
3473	♀	6,55	0,144	2,248	0,057	0,870	50
3498	♀	11,564	0,444	3,993	0,051	0,441	50
3502	♀	9,794	0,332	3,509	0,113	1,154	50
3505	♀	7,665	1,053	15,926	0,032	0,417	50
3497	♀	9,915	0,45	4,754	0,032	0,323	50
3462	♂	6,002	0,35	5,831	0,04	0,666	50
3464	♂	6,992	0,307	4,391	0,015	0,215	50
3465	♂	5,833	0,289	4,955	0,041	0,703	50
3467	♂	5,398	0,253	4,687	0,027	0,500	50
3469	♂	4,159	0,245	5,891	0,02	0,481	50
3470	♂	5,057	0,14	2,768	0,025	0,494	50
3472	♂	4,276	0,252	5,893	0,113	2,643	50
3474	♂	2,288	0,129	5,638	0,097	4,240	50
3475	♂	7,028	0,58	8,253	0,045	0,640	50
3477	♂	4,343	0,19	4,375	0,027	0,622	50
3478	♂	5,719	0,316	5,525	0,034	0,595	50
3483	♂	4,897	0,146	2,981	0,022	0,449	50
3484	♂	5,841	0,31	5,307	0,04	0,685	50
3493	♂	7,092	0,353	4,977	0,06	0,846	50
3494	♂	6,643	0,176	2,649	0,029	0,437	50
3495	♂	5,416	0,128	2,363	0,031	0,572	50

(continua)

Tabela 16: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas sem B (outubro/novembro/dezembro 2012)

(conclusão)

mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	RHS	2n (B)?
3496	♂	10,655	0,178	1,671	0,04	0,375	50
3501	♂	5,054	0,17	3,364	0,01	0,198	50
3507	♂	5,929	0,114	1,923	0,015	0,253	50
3508	♂	7,594	0,372	4,899	0,016	0,211	50
3509	♂	6,937	0,765	11,028	0,027	0,389	50
3511	♂	5,108	0,098	1,919	0,018	0,352	50
Somatória RGS				169,023	Somatória RHS	21,155	
Média RGS				5,828	Média RHS	0,729	

Tabela 17: Relação gonadosomática e Relação hepatossomática das fêmeas e machos sem B (janeiro, fevereiro, março)

mitose	sexo	peso total	peso gônada	RGS	peso fígado	RHS	2n (B)
3587	♀	18,534	2,9540	18,9602	0,129	0,696	50
3590	♀	10,191	0,3820	3,8944	0,098	0,962	50
3592	♀	3,706	0,0010	0,0270	0,018	0,486	50
3594	♀	4,103	0,0180	0,4406	0,026	0,634	50
3595	♀	9,01	0,3560	4,1137	0,066	0,733	50
3596	♀	6,935	0,0650	0,9461	0,048	0,692	50
3597	♀	11,52	0,2240	1,9830	0,083	0,720	50
3600	♀	2,986	0,0001	0,0033	0,006	0,201	50
3602	♀	13,324	0,2060	1,5704	0,057	0,428	50
3604	♀	17,983	0,1850	1,0394	0,136	0,756	50
3606	♀	12,576	0,6610	5,5476	0,1	0,795	50
3607	♀	9,255	1,5360	19,8990	0,048	0,519	50
3612	♀	4,623	0,0640	1,4038	0,027	0,584	50
3624	♀	5,436	0,0001	0,0018	0,042	0,773	50
3626	♀	3,979	0,0001	0,0025	0,016	0,402	50
3583	♂	6,289	0,1630	2,6608	0,024	0,382	50
3585	♂	6,462	0,0630	0,9845	0,03	0,464	50
3586	♂	5,897	0,1910	3,3474	0,005	0,085	50
3591	♂	4,1	0,1220	3,0669	0,014	0,341	50
3593	♂	3,749	0,0210	0,5633	0,019	0,507	50
3598	♂	3,827	0,0400	1,0562	0,02	0,523	50
3605	♂	3,522	0,1000	2,9223	0,01	0,284	50
3608	♂	3,7	0,1520	4,2841	0,019	0,514	50

(continua)

Tabela 17: Relação gonadossomática e Relação hepatossomática das fêmeas e machos sem B (janeiro, fevereiro, março)

(conclusão)

3609	♂	6,082	0,1280	2,1498	0,03	0,493	50
3610	♂	3,164	0,0760	2,4611	0,005	0,158	50
3615	♂	3,566	0,0600	1,7114	0,01	0,280	50
3616	♂	1,771	0,0110	0,6250	0,014	0,791	50
3617	♂	6,135	0,1680	2,8155	0,018	0,293	50
3619	♂	5,687	0,1280	2,3026	0,051	0,897	50
3621	♂	6,857	0,3610	5,5573	0,03	0,438	50
3622	♂	13,463	0,1580	1,1875	0,066	0,490	50
3623	♂	10,274	0,0001	0,0010	0,057	0,555	50
3628	♂	2,776	0,0001	0,0036	0,006	0,216	50
Somatória RGS				97,5332	Somatória RHS	17,090	
Média RGS				2,9556	Média RHS	0,518	

Tabela 18: Proporção das fêmeas, dos machos e dos hermafroditas nos três períodos estudados

abr/mai/jun			jul/ago/set			out/nov/dez		
fêmeas	machos	hermafroditas	fêmeas	machos	hermafroditas	fêmeas	machos	hermafroditas
50,00	47,37	2,6	16	68	16	25	70,45	4,55

7.9 Quadro 4: Dados de Pluviosidade e temperatura da Estação: Campos do Jordao SP (OMM: 83714) Latitude (graus): -22.75 Longitude(graus): -45.6 Altitude (metros): 1642.00.

Data	Hora	Nºdiasprecipitação	Precipitação total	Temperatura máxima média	Temperatura Mínima média
29/02/2012	00:00	16	171.8	23,34	10,63
31/03/2012	0000	17	99	22.203226	11.512903
30/04/2012	0000	17	167	20.263333	10.948276
31/05/2012	0000	12	79.9	15.903226	7.115385
30/06/2012	0000	15	149	16.246667	8.089286
31/07/2012	0000	9	66.9	16.341935	5.541935
31/08/2012	0000	1	9.8	18.174194	5.576667
30/09/2012	0000	5	39.7	21.23	7.786667
31/10/2012	0000	12	165.3	23.777419	
30/11/2012	0000	15	155.8	21.653333	10.613333
31/12/2012	0000	24	291.3	24.429032	
31/01/2013	0000	29	419		
28/02/2013	0000	21	294.2		

Fonte: BDMEP - INMET

Figura 20: Células germinativas femininas: A) Ov= ovogônias, OI= ovócitos I, OII= ovócitos II; B) OII= ovócito II; C) OIII= ovócito III; D) OIV= ovócito IV; E) CA= célula atrésica e F) FA= folículo atrésico.

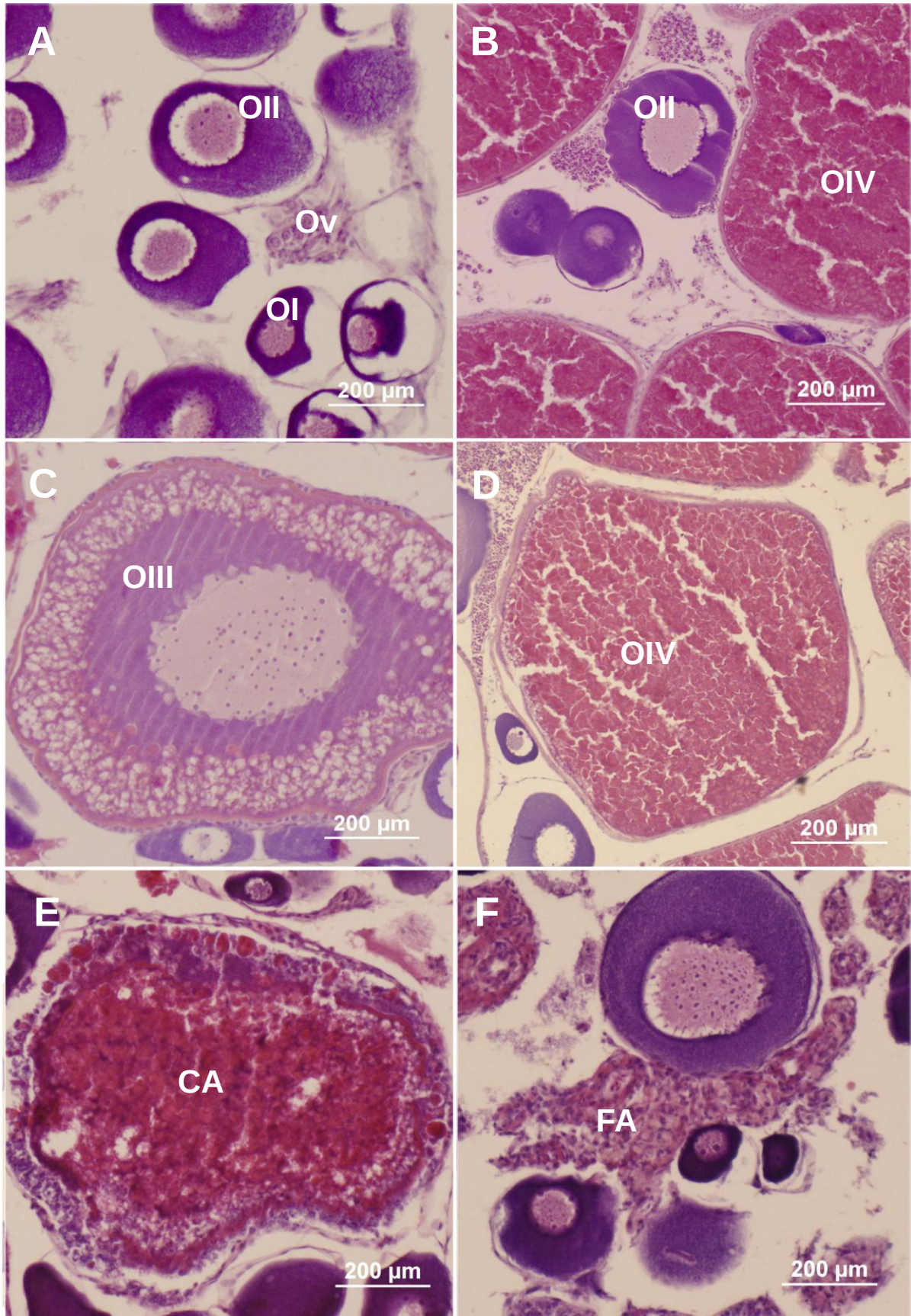
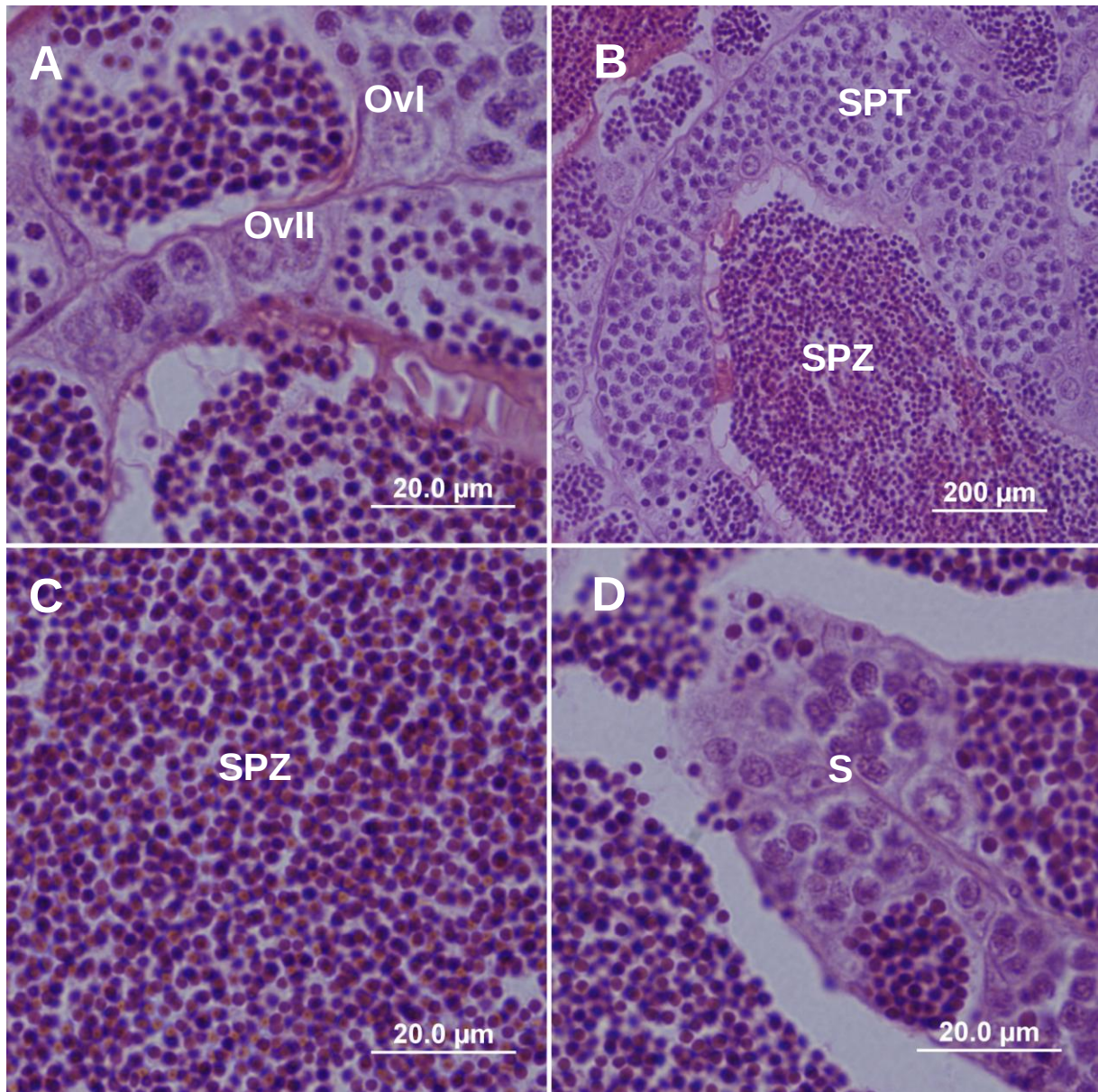


Figura 21: Células germinativas masculinas: A) Ovl= ovogônia primária, OvII= ovogônias secundárias; B) SPT= espermatócitos, SPZ= espermatozóides; C) SPZ= espermatozóides; D) S= células de sertoli



7. 10 Licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc. no. 15115-1).

 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.		
Taxons autorizados		
#	Nível taxonômico	Taxon(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
		



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 Antoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

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 2/2