

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

IEDA CRISTINA SCHLEGER

INFERÊNCIAS SOBRE A BIOLOGIA EVOLUTIVA DE *Astyanax serratus* E *Astyanax laticeps* (TELEOSTEI, CHARACIDAE) ATRAVÉS DE MORFOMETRIA, CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR COMPARADA

PONTA GROSSA

2016

IEDA CRISTINA SCHLEGER

INFERÊNCIAS SOBRE A BIOLOGIA EVOLUTIVA DE *Astyanax serratus* E *Astyanax laticeps* (TELEOSTEI, CHARACIDAE) ATRAVÉS DE MORFOMETRIA, CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR COMPARADA

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Carla Andréia Lorscheider

PONTA GROSSA

2016

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

Schleger, Ieda Cristina

S339 Inferências sobre a biologia evolutiva
de *Astyanax serratus* e *Astyanax laticeps*
(Teleostei, characidae) através de
morfometria, citogenética e genética
molecular comparada/ Ieda Cristina
Schleger. Ponta Grossa, 2016.
81f.

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira
Artoni.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Carla Andréia
Lorscheider.

1.Evolução. 2.Taxonomia.
3.Characiforme. 4.Complexos de espécies.
I.Artoni, Roberto Ferreira. II.
Lorscheider, Carla Andréia. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



UEO

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. 02/2016

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 **Ieda Cristina Schleger**.

Aos dezoito dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, 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) **Ieda Cristina Schleger**, 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), Dr^a Íris Hass (UFPR) e Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar). 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: "**Inferências sobre a Biologia Evolutiva de *Astyanax serratus* e *Astyanax laticeps* (Teleostei, Characidae) através de Morfometria, Citogenética e Genética Molecular Comparada**". 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 sessenta 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 90 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, 19 de fevereiro de dois mil e dezesseis.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Prof^a Dr^a Íris Hass (UFPR)

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar)

Dedico esta conquista aos meus pais,
Agostinho e Inês, aos meus irmãos, Ícaro
e Iara e ao meu esposo Ernesto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela proteção, por renovar minhas forças e permitir a concretização deste momento tão importante.

À minha mãe, Inês Zamboni Schleger, pelo incentivo nos momentos de angústia, auxílio e pelos melhores conselhos. E ao meu pai Agostinho Dias Schleger, que me ensinou que podemos ser tudo o que quisermos, basta ter dedicação e persistência. Vocês me ensinaram que a humildade e a honestidade são as maiores virtudes que alguém pode ter, e que o trabalho com dedicação é a melhor ferramenta para conquistarmos nossos sonhos.

Ao meu marido Ernesto Vendramini Júnior, pela paciência e compreensão na minha ausência nestes dois anos, e por estar sempre do meu lado me apoiando.

Aos meus irmãos Ícaro Augusto Schleger e Iara Aparecida Schleger e meu cunhado Ednilson João Sonnenstrahl, pelas caronas e disponibilidade sempre quando precisei, agradeço pela preocupação com minha segurança e bem-estar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, pela orientação, compreensão, auxílio e empenho na busca de nossos resultados.

Dizem que os anjos são pessoas que Deus coloca em nossas vidas, para nos guiar e nos proteger. Tive dois anjos especiais durante o mestrado. Minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a Carla Andréia Lorscheider, pelo incentivo e motivação, além das colaborações na elaboração deste trabalho. Sem teu apoio eu não teria chegado até aqui. E minha grande amiga, parceira e irmã de coração Thais Aparecida Dulz, que muito me auxiliou, pela cumplicidade que tivemos nestes dois anos, que com toda certeza tornaram esta etapa menos desgastante.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Patrícia Barbosa, Kaline Ziemniczak, Viviane Nascimento e Jhonatan Castro pela prontidão nos momentos em que necessitei de auxílio e ao Luiz Oliveira, pela parceira em nossos trabalhos.

Agradeço em especial ao colega e grande amigo Alceu Ferreira Jr., você é um exemplo de superação, e com certeza nos ensinou a ver a vida com alegria e acreditar que sempre podemos conquistar nossos sonhos.

Aos meus amigos da empresa Breyer, em especial ao Sr. Ernesto Breyer e a Priscilla Amarantes, pelos bons conselhos e incentivo.

À Daiane Niedzielski e à Angelita Barth da UNESPAR, e ao Sr. Alceu Ferreira (*in memoriam*), pelo auxílio com as coletas.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação de Biologia Evolutiva, pelas contribuições e pelo conhecimento transmitido, sem dúvida ele foi fundamental.

Em especial ao Carlos de Oliveira, da Universidade Estadual de Maringá, pela realização da identificação taxonômica dos peixes e pela parceria e grande auxílio na análise morfológica.

À secretária do Programa de pós-Graduação da UEPG, Zoli Oliveira, pelo bom atendimento e auxílios prestados.

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

À Universidade Estadual do Paraná, Campus de União da Vitória (PR), pela disponibilidade do laboratório para a realização de parte da pesquisa.

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

Ao Instituto Ambiental do Paraná, Escritório Regional de União da Vitória, pelo apoio e disponibilidade em ceder material bibliográfico.

Ao IBAMA, pela concessão da licença ambiental de coleta.

Aos professores da banca, pelas contribuições.

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

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. ”

Charles Chaplin

RESUMO

A Família Characidae (Characiformes) é a mais diversa em número de espécies entre os peixes neotropicais. Muitos gêneros dessa Família, por não apresentarem evidências de monofiletismo, são considerados como *Incertae Sedis*, como é o caso de *Astyanax*. Este gênero agrupa peixes popularmente conhecidos como lambaris, sendo composto por 155 espécies válidas. *Astyanax serratus* é considerada endêmica do Rio Iguaçu, onde está amplamente distribuída. *Astyanax laticeps* ocorre nas bacias costeiras da região litorânea do Uruguai, sul e sudeste brasileiro. Estas espécies são morfologicamente semelhantes e estão incluídas no complexo *Astyanax scabripinnis*. O objetivo do presente estudo foi verificar se *A. serratus* e *A. laticeps* constituem uma mesma espécie, em sinonímia, ou formam unidades evolutivas distintas, mas crípticas. Assim, foi empregada análise morfométrica, incluindo medições das proporções corporais em relação ao comprimento do corpo e da cabeça, contagem do número de dentes, cúspides e de raios nas nadadeiras. A análise citogenética consistiu em preparações cromossômicas com coloração convencional por Giemsa, localização de heterocromatina constitutiva pelo método de bandamento C, detecção das regiões organizadoras de nucléolos por impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs) e hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNA ribossomal (rDNA) 5S e 18S. As sequências utilizadas como DNA *barcode* foram obtidas através da amplificação parcial do gene citocromo c oxidase I e a distância genética calculada pelo método Kimura 2 Parâmetros (K2P). Os resultados da análise morfométrica revelaram pré-maxilar com duas séries de dentes, presença de ganchos nas nadadeiras anal e pélvicas de machos, corpo alongado, com uma mancha umeral com prolongamento anteroventral estreito em ambas as espécies. A citogenética evidenciou mesmo número diplóide, de 50 cromossomos, incluindo o primeiro par de cromossomos metacêntricos de grande porte em relação aos demais do complemento, mesma fórmula cariotípica ($4m + 24sm + 6st + 16a$) e mesmo número fundamental (84). As marcações de rDNA 5S coincidiram na região centromérica do par cromossômico 19 e foram evidenciados sítios múltiplos de rDNA 18S, localizados nas regiões teloméricas dos cromossomos em ambas as espécies analisadas. As Ag-RONs mostraram-se coincidentes com os sítios de 18S na maioria dos casos. A distribuição dos blocos de heterocromatina constitutiva ocorreu preferencialmente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos, coincidentes com a maioria dos sítios ribossomais e das Ag-RONs nas regiões teloméricas. A análise do DNA *barcode* através do gene COI revelou uma divergência genética interespecífica de 0,2%, índice abaixo do considerado limiar para a separação de espécies de peixes (2%). Estes diferentes níveis de análise sugerem que *A. serratus* e *A. laticeps* são espécies sinônimas, ampliando a ocorrência de *A. laticeps* para a bacia do Rio Iguaçu e reforçando a hipótese de compartilhamento de fauna, provocado pelas atividades tectônicas do escudo cristalino. As variações interespecíficas encontradas no mapeamento de heterocromatina constitutiva, Ag-RONs e rDNA 18S são comuns em *Astyanax* e derivam de eventos não robertsonianos, mas também podem refletir um processo de vicariância, com o isolamento geográfico das bacias hidrográficas e restrição de fluxo gênico entre a população do rio Iguaçu e populações litorâneas.

Palavras-chave: Evolução, Taxonomia, Characiforme, Complexos de Espécies.

ABSTRACT

The family Characidae (Characiformes) is the most diverse in number of species among Neotropical fish. Many genera of this family, for no to present evidence of monophyly, are considered *Incertae Sedis*, such as *Astyanax*. This genus of fish groups popularly known as lambari, comprises 155 valid species. *Astyanax serratus* is considered endemic of the Iguaçu River, where is largely distributed. *Astyanax laticeps* occurs in coastal basins of the coastal region of Uruguay, south and southeast Brazil. These species are morphologically similar and are included in the complex *A. scabripinnis*. The purpose of this study was to determine *A. serratus* and *A. laticeps* are the same species in synonymy, or form distinct evolutionary units, but cryptic. Therefore, was used morphometric analysis, including measurements of body proportions relative to length of the body and of the head, counting number of teeth, cusps and fins. Cytogenetic analysis consisted in chromosome preparations conventional Giemsa staining, localization of constitutive heterochromatin by C-banding method, detection of nucleolar organizer regions (NORs) by impregnation with silver nitrate (Ag-NORs) and fluorescent in situ hybridization using DNA probes ribosomal (rDNA) 5S and 18S. The sequences used as DNA barcode, were obtained by partial amplification of cytochrome c oxidase I (COI) gene and the genetic distance calculated by the method of Kimura 2-parameters (K2P). The results of morphometric analysis revealed pre-jaw with two series of teeth, presence of hooks on anal and pelvic fins of males, elongated body with a humeral spot with narrow anteroventral extension in both species. Cytogenetic showed the same diploid number of 50 chromosomes, including the first pair of large metacentric chromosomes in relation to the others complements, the same karyotype formula ($4m + 24sm + 6st + 16a$) and even fundamental number (84). The markings of 5S rDNA coincide in the centromeric region of chromosome 19 pair and were evidenced multiple sites of 18S rDNA, located in the telomeric regions of the chromosomes in both species analyzed. The Ag-NORs showed to be coincident with 18S sites in most cases. The distribution of constitutive heterochromatin blocks occurred preferentially in the centromeric and terminals regions of chromosomes, coincident with the location of ribosomal sites and Ag-NORs in telomeric regions. The analysis of DNA barcode through the COI gene revealed an interspecific genetic divergence to 0.2%, a rate below the threshold considered for the separation of fish species (2%). These different levels of analysis suggest that *A. serratus* and *A. laticeps* are synonymous species, increasing the occurrence of *A. laticeps* for the Iguaçu River basin and enhancing the hypothesis of fauna sharing, caused by tectonic activities of crystalline shield. The interspecific variations found in the mapping of constitutive heterochromatin, Ag-NORs and 18S rDNA are common in *Astyanax* and derived of events no robertsonian, while the differences may reflect the vicariant process, with geographic isolation of watersheds and gene flow restriction among the population of the Iguaçu River and coastal populations.

Keywords: Evolution, Taxonomy, Characiform, Species Complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Geomorfologia do relevo da costa leste do estado do Paraná, Brasil, com destaque para a elevação da Serra do Mar (Escudo Cristalino)	17
Figura 2 -	Esquema do método K2P	22
Figura 3 -	<i>Astyanax laticeps</i> (a) e <i>Astyanax serratus</i> (b). Comprimento padrão: 67,8 mm (a) e 74,5 mm (b)	26
Figura 4 -	Mapa dos pontos de coleta: 1, 2 e 3 – Rio Iguaçu (<i>A. serratus</i>); 4, 5 e 6 – Rio Ribeira de Iguape (<i>A. laticeps</i>); 7 – Rio Itapucu (<i>A. laticeps</i>)	26
Figura 5 -	Parâmetros utilizados para medições na análise morfométrica. Medidas em relação ao comprimento do corpo (vermelho), comprimento da cabeça (verde), altura do corpo (preto) e nadadeiras (azul)	29
Figura 6 -	Morfologia dos dentes. Barra = 10 µm	51
Figura 7 -	Figura 7: Gráfico de projeção individual da análise de variáveis canônicas livres de tamanho de <i>A. serratus</i> (cinza) e <i>A. laticeps</i> (preto). Os machos estão representados pelos círculos e as fêmeas por quadrados	52
Figura 8 -	Cariótipos de <i>A. laticeps</i> e <i>A. serratus</i> elaborados com coloração convencional (Giemsa), com destaque (à direita), para os cromossomos marcados com Ag-RONs. Barra = 10µm	53
Figura 9 -	Marcações de heterocromatina constitutiva (à esquerda), através de bandamento C (coloração com iodeto de propídio, apresentada em tons de cinza) e localização com marcadores moleculares (à direita) de rDNA 5S (verde) e 18S (vermelho) em <i>A. laticeps</i> e <i>A. serratus</i> . Barra = 10µm	54
Figura 10 -	Ideograma representando as marcações de rDNA 5S e 18S, bandamento C e Ag-RONs em <i>A. laticeps</i> (a) e <i>A. serratus</i> (b)	55
Figura 11 -	Figura 11: Dendograma de Neighbor-Joining, mostrando as espécies <i>A. serratus</i> (população do rio Pintado) e <i>A. laticeps</i> (população do riacho Itaiacoca), analisadas juntamente com os grupos externos. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições de bases	56
Figura 12 -	Representação da localização das bacias hidrográficas de ocorrência de <i>A. laticeps</i> (bacia do rio Uruguai e do Atlântico Sul-Sudeste) e <i>A. serratus</i> (bacia do rio Paraná). Os pontos pretos indicam os locais de coleta de <i>A. laticeps</i> , e os vermelhos de <i>A. serratus</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos pontos de coleta de <i>A. serratus</i> e <i>A. laticeps</i>	27
Tabela 2 -	Contagem de raios das nadadeiras e de escamas (R = ramificados; NR = não - ramificados)	48
Tabela 3 -	Medidas em proporções em relação ao comprimento do corpo e ao comprimento da cabeça	49
Tabela 4 -	Valores de divergência genética com base no método K2P	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ORDEM CHARACIFORME COM ÊNFASE NA FAMÍLIA CHARACIDAE	13
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Astyanax</i>	14
1.3 <i>Astyanax laticeps</i>	15
1.4 <i>Astyanax serratus</i>	16
1.5 GEOMORFOLOGIA E BIOGEOGRAFIA DE TRIBUTÁRIOS PARANAENSES, DAS DRENAGENS COSTEIRAS E SUA ICTIOFAUNA.....	17
1.6 CONTRIBUIÇÕES DA CITOGENÉTICA E DA GENÉTICA MOLECULAR PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS	19
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA.....	25
3.2 MÉTODOS	28
3.2.1 Análise morfométrica.....	28
3.2.2 Preparações cromossômicas e citogenética.....	29
3.2.3 Obtenção de sequências de DNA <i>Barcode</i>	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Análise morfológica, citogenética e de genética molecular: um caso de sinonímia no gênero <i>Astyanax</i> (CHARACIFORMES: CHARACIDAE).....	33
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORDEM CHARACIFORME COM ÊNFASE NA FAMÍLIA CHARACIDAE

Os peixes desta Ordem apresentam corpo coberto por escamas cicloides e nadadeiras pélvicas em posição abdominal (BAUMGARTNER et al., 2012). A distribuição das espécies da Ordem Characiforme abrange a África do Sul e América, compreendendo peixes que variam desde poucos centímetros até maiores que meio metro de comprimento (MALABARBA et al., 2013).

Os caraciformes habitam uma grande variedade de ecossistemas, desde rios e córregos de correnteza na região Neotropical, até tributários lênticos de planícies de inundação das Américas e África. Destacam-se ainda, pela sua importância econômica e ecológica, atuando na manutenção de ecossistemas, em termos de fluxo de energia e ciclagem de materiais (OLIVEIRA, 2011a).

Esta Ordem destaca-se na ictiofauna Neotropical pelo elevado número de espécies, compreendendo 3.381 espécies válidas (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; ESCHMEYER; FONG, 2015), agrupa três Famílias africanas (Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae), 14 Famílias neotropicais (Acestorhynchidae, Anostomidae, Characidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Curimatidae, Ctenoluciidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Lebiasinidae, Parodontidae, Prochilodontidae e Serrasalminidae) e uma Família trans-Atlântica (Alestidae) (MIRANDE, 2009).

A distribuição da Família Characidae é ampla na região Neotropical, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Patagônia na Argentina, sendo especialmente diversa nos rios da Amazônia, do Orinoco e de La Plata (MIRANDE, 2009; 2010). Seu tamanho corporal varia de pequeno a grande porte e suas estratégias reprodutivas e alimentares são diversificadas (BAUMGARTNER et al., 2012).

Com um total de 2.182 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015), esta Família é a quarta mais numerosa entre os peixes e a primeira da ictiofauna Neotropical (MIRANDE, 2009). O elevado número de espécies e a ausência de sinapomorfias para a determinação de Subfamílias monofiléticas fez com que 92 de seus 170 gêneros fossem considerados como *Incertae sedis*, como, por exemplo, *Astyanax*, *Bryconamericus* e *Hyphessobrycon* (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; MIRANDE, 2009; BAUMGARTNER et al., 2012).

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Astyanax*

Descrito inicialmente por Baird e Girard (1854), o gênero *Astyanax* havia sido incluído na Subfamília Tetragonopterinae por Géry em 1977. Reis, Kullander e Ferraris (2003), após realizarem estudos morfométricos, evidenciaram a falta de monofiletismo em *Astyanax*, e o agruparam com outros gêneros como *Incertae Sedis* da Família Characidae. Um dos aspectos evolutivos que dificulta a delimitação de espécies neste gênero é a ocorrência de convergência morfológica (WILKENS; STRECKER, 2003; PROTAS et al., 2006).

Composto por 155 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015) e com ampla distribuição na região Neotropical, com destaque nas bacias da América do Sul, os *Astyanax* são popularmente conhecidos como “lambaris” (MALABARBA et al., 2013). Caracterizam-se pela presença de nadadeira adiposa, duas fileiras de dentes no pré-maxilar, com cinco dentes na série interna; linha lateral completa e nadadeira caudal sem escamas (EIGENMANN, 1921; 1927). Este gênero é considerado de relativa importância para estudos de padrões biogeográficos e de vicariância, devido sua ampla distribuição geográfica, estando assim submetido aos eventos geológicos nos sistemas de água doce (BAIRD; GIRARD, 1854; GARCIA; DOMINGUEZ E DOADRIO, 2008).

Estudos citogenéticos em *Astyanax* evidenciaram número diploide variando desde 36 cromossomos em *A. schubartti* (MORELLI et al., 1983; DANIEL SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005) até 50 cromossomos para a maioria das espécies, como em *Astyanax altiparanae*, *Astyanax eigenmanniorum*, *Astyanax janeiroensis*, *Astyanax mexicanus*, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax bifasciatus* e *Astyanax minor* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994; MAISTRO, et al., 1994; CARVALHO; OLIVEIRA; FORESTI, 2002; DOMINGUES, et al., 2007; KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007; PAZZA, 2007), não havendo cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (MORELLI et al., 1983).

Oliveira (2011b) destaca a organização de espécies que compartilham características morfológicas em comum, sem necessariamente pertencer a um grupo natural, incluídas em complexos, como: complexo *Astyanax fasciatus* (MELO, 2005; PAZZA et al., 2008) e o complexo *A. scabripinnis* (BERTACO; LUCENA, 2006). Mesmo com a ausência de estudos filogenéticos que suportem esta organização, o agrupamento em complexos de espécies facilita os trabalhos taxonômicos em grupos muito especiosos, como no caso dos *Astyanax* (OLIVEIRA, 2011b).

Segundo Caramaschi (1986), *Astyanax scabripinnis* apresenta plasticidade fenotípica e morfológica. Fowler (1948) reconheceu seis subespécies em *A. scabripinnis*, sendo: *A.*

scabripinnis (JENYNS, 1842), *A. scabripinnis rivularis* (LUTKEN, 1874), *A. scabripinnis longirostris* (STEINDACHNER, 1907), *A. scabripinnis intermedius* (EIGENMANN, 1908), *A. scabripinnis laticeps* (COPE, 1894) e *A. scabripinnis paranae* (EIGENMANN, 1927). Em 1991, Moreira Filho e Bertollo, realizaram estudos citogenéticos e morfológicos comparativos em populações de *A. scabripinnis* e propuseram caracterizar estes peixes como um complexo de espécies. Ingenito e Duboc (2014), baseados no estudo de Bertaco e Lucena (2006), relataram 29 espécies incluídas dentro do complexo *A. scabripinnis*, sendo: *A. brachypterygium* (BERTACO; MALABARBA, 2001); *A. burgerai* (ZANATA; CAMELIER, 2009); *A. courensis* (BERTACO; CARVALHO; JEREP, 2010); *A. cremnobates* (BERTACO; MALABARBA, 2001); *A. epiagos* (ZANATA; CAMELIER, 2008); *A. goyanensis* (MIRANDA-RIBEIRO, 1944); *A. guaricana* (OLIVEIRA; ABILHOA; PAVANELLI, 2013); *A. gymnogenys* (EIGENMANN, 1911); *A. intermedius* (EIGENMANN, 1908); *A. ita* (ALMIRÓN; AZPELICUETA; CASCIOтта, 2002); *A. jacobinae* (ZANATA; CAMELIER, 2008); *A. jenymsii* (STEINDACHNER, 1877); *A. jordanensis* (ALCARAZ; PAVANELLI; BERTACO, 2009); *A. laticeps* (COPE, 1894); *A. leonidas* (AZPELICUETA; CASCIOтта, 2002); *A. microschemos* (BERTACO; LUCENA, 2006), *A. obscurus* (HENSEL, 1870); *A. ojiara* (AZPELICUETA; GARCIA, 2000), *A. paranae* (EIGENMANN, 1914); *A. paris* (AZPELICUETA; ALMIRÓN; CASCIOтта, 2002); *A. pirabitira* (LUCENA; BERTACO; BERBIGIER, 2013); *A. pirapuan* (TAGLIACOLLO et al., 2011); *A. rivularis* (LÜTKEN, 1875); *A. scabripinnis* (JENYNS, 1842); *A. serratus* (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010); *A. totae* (HALUCH; ABILHOA, 2005); *A. troya* (AZPELICUETA; CASCIOтта, 2002); *A. turmalinensis* (TRIQUES; VONO; CAIAFA, 2003) e *A. varzeae* (ABILHOA; DUBOC, 2007).

1.3 *Astyanax laticeps*

Esta espécie foi descrita inicialmente por Cope (1894), como *Tetragonopterus laticeps* e incluída por Eingemann (1910; 1921) como uma subespécie de *A. scabripinnis*. Apenas em 2001 foi definida como uma espécie válida, reconhecida como *Astyanax laticeps* (BERTACO; MALABARBA, 2001; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

A ocorrência de *A. laticeps* foi registrada em drenagens costeiras do Uruguai e do Brasil, até o sul do Paraná, na bacia do rio Uruguai (AZPELICUETA; LOUREIRO, 2009; BERTACO; LUCENA, 2010) e também na bacia Atlântica do Paraná e do Rio Ribeira de

Iguape, onde era identificada anteriormente como *Astyanax janeiroensis* (OLIVEIRA, 2011b).

Em sua redescrição, realizada por Bertaco e Lucena (2010), *A. laticeps* foi distinguida das demais espécies do complexo *A. scabripinnis* pela presença de uma mancha umeral preta com alongamento anteroventral estreito, atravessando a linha lateral para baixo, de um a três dentes maxilares com uma variação de 1 a 3 cúspides e com ganchos ósseos nas nadadeiras anal e pélvicas de machos.

1.4 *Astyanax serratus*

Esta espécie foi inicialmente citada como *Astyanax* sp. D por Sampaio (1988) e teve sua descrição morfológica e registro de ocorrência no alto e baixo Iguaçu realizada por Severi e Cordeiro (1994). Foi diagnosticada por Garavello e Sampaio (2010), como *Astyanax serratus*, tendo sua etiologia em alusão ao perfil dos ganchos ósseos presentes na nadadeira anal dos machos. Em sua diagnose foram realizadas análises morfométricas comparativas entre *A. serratus* e *A. paranahybae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *A. eigenmanniorum*, *A. scabripinnis paranae* e *A. altiparanae* da bacia do Rio Paraná; *A. ribeirae* do Rio Ribeira de Iguape e *A. ita*, *A. totae*, *A. varzeae* e *A. jordanensis* do Rio Iguaçu.

Astyanax serratus apresenta corpo com a região ventral mais clara, escurecendo em direção ao dorso; faixa longitudinal escura e larga, prateada quando em vida; mandíbula robusta, com a margem do terceiro infraorbital separada do pré-opérculo por uma área ampla de pele e boca terminal (BAUMGARTNER et al., 2012).

Garavello e Sampaio (2010) distinguiu *A. serratus* dos demais *Astyanax* da bacia do Rio Iguaçu pela presença do 3º osso infraorbital estreito e profundo, mas não em contato com o pré-opérculo; série externa do pré-maxilar com dois a cinco dentes, geralmente com quatro cúspides, e série interna com dentes não sinfisianos com cinco cúspides; maxilar apresentando geralmente dois dentes, variando de zero a quatro; mancha umeral geralmente arredondada e escura, frequentemente com um estreito prolongamento vertical descendente. Esta espécie é considerada endêmica da bacia do Rio Iguaçu, onde está largamente distribuída.

A caracterização citogenética desta espécie foi realizada por Kantek (2007; 2009), apresentando número diploide de 50 cromossomos, com fórmula cariotípica (FC) composta por 4 cromossomos metacêntricos (m) +24 submetacêntricos (sm) + 6 subtelocêntricos (st) +

16 acrocêntricos (a), número fundamental (NF) = 84, com múltiplas Regiões Organizadoras de Nucléolos, e variações intra-populacionais na localização de heterocromatina constitutiva.

1.5 GEOMORFOLOGIA E BIOGEOGRAFIA DE TRIBUTÁRIOS PARANAENSES, DAS DRENAGENS COSTEIRAS E SUA ICTIOFAUNA

O continente Sul Americano tem sua estrutura geológica caracterizada pela formação de conjuntos de rochas pré-cambrianas suscetíveis a deformações, ocasionadas por eventos tectônicos ressurgentes, que reativam estruturas antigas, como falhas e zonas de cisalhamento (SAADI, 1993; RICCOMINI; ASSUMPÇÃO, 1999; SUGUIO, 2001; SAADI et al., 2002; SAADI et al., 2005).

O padrão de drenagem das bacias hidrográficas paranaenses é imposto pelo escudo cristalino brasileiro (Figura 1), que atua direcionando a foz dos rios para dentro do continente. Sistemas de rios associados a sistemas de falhas geológicas, susceptíveis à erosão capturam cabeceiras de alguns tributários do escudo cristalino, estabelecendo padrões biogeográficos da ictiofauna de água doce entre o escudo cristalino e drenagens da costa do Atlântico, representados por linhagens filogenéticas e grupos de espécies estreitamente relacionadas que ocorrem nas drenagens costeiras e rios continentais adjacentes, sugerindo eventos cladogenéticos presentes em longa escala de tempo e com repetições, originando grupos irmãos, com padrões filogenéticos semelhantes, refletindo em um processo de vicariância contínua (RIBEIRO, 2006).



Figura 1: Geomorfologia do relevo da costa leste do estado do Paraná, Brasil, com destaque para a elevação da Serra do Mar (Escudo Cristalino).
Fonte: MARENT et al., (2012).

A atual configuração da bacia do Rio Paraná resulta do principal evento tectônico de separação do Gondwana. Grandes elevações na fenda Afro-brasileira configuraram a maior parte da formação da bacia do Alto Rio Paraná, Alto São Francisco e Uruguai, sendo que a porção superior do rio Paraná teve início de sua origem durante o Cretáceo. Reajustes de drenagem têm ocorrido posteriormente, atuando principalmente nas margens das bacias hidrográficas (COX, 1989; POTTER, 1997; RIBEIRO, 2006; MENEZES et al., 2008).

A área correspondente às divisões de cabeceiras entre o Alto Iguaçu, Ribeira de Iguaçu e Paranapanema, corresponde a uma característica geológica de destaque: o Arco de Ponta Grossa, que consiste num soerguimento do embasamento cristalino ao longo da porção sudeste da Bacia do Paraná (PETRI; FULFARO, 1983). O Arco de Ponta Grossa exibe um intrincado sistema de falhas e fraturas profundas que supostamente era o principal condutor do fluxo de lava ao longo do Cretáceo na Bacia do Paraná, conhecido como Formação Serra Geral, que deixou um grande sistema de diques de magma intrusivo e tem uma tendência geral de elevação (ALMEIDA; CARNEIRO, 1998).

O rio Iguaçu possui uma extensão de 1.320 km, formado pelo encontro dos rios Iraí e Atuba, em Curitiba, e deságua no rio Paraná em Foz do Iguaçu no oeste do estado do Paraná. A bacia do rio Iguaçu cobre uma superfície de 70.800 km² e é dividida em três unidades hidrológicas: Baixo Iguaçu, Médio Iguaçu e Alto Iguaçu (PARANÁ, 2006, 2010).

Maack (1968) considera este rio como geologicamente antigo, mas rejuvenescido pelos processos de soerguimento, que caracterizam seu curso com corredeiras e saltos, alternados por meandros e várzeas.

O rio Iguaçu apresenta alta compartimentalização em seu curso, devido à sua formação geológica e as barreiras artificiais (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010). Além disso, este tributário do Rio Paraná apresenta um grande desnível em seu leito, em torno de 830 m que, somado ao surgimento das Cataratas do Iguaçu, há 22 milhões de anos, isolou as populações dos rios Iguaçu e Paraná (SEVERI; CORDEIRO, 1994). Estes fatores provocaram barreiras à sua ictiofauna, que em muitos casos se constitui de espécies endêmicas.

Ingenito e Duboc (2014), relataram um total de 14 espécies de *Astyanax* com ocorrência na bacia do Rio Iguaçu: *A. gymnodontus*; *A. gymnogenys* (EIGENMANN, 1911); *A. altiparanae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000); *A. ita*; *A. leonidas* (ALMIRÓN; AZPELICUETA; CASCIOтта, 2002); *A. totae* (HALUCH; ABILHOA, 2005); *A. varzeae* (ABILHOA; DUBOC, 2007); *A. jordanensis* (ALCARAZ; PAVANELLI; BERTACO, 2009); *A. bifasciatus*; *A. dissimilis*; *A. longirhinus*; *A. minor*; *A. serratus* (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010) e *A. eremus* (INGENITO; DUBOC, 2014).

Em 2015, Dulz (dados não publicados), estudou citogeneticamente 7 espécies com ocorrência na região do Médio Rio Iguaçu: *A. altiparanae*, *A. bifasciatus*, *A. dissimilis*, *A. longirhinus*, *A. minor* e *A. serratus*; relatando também a presença de *A. ribeirae*, pela primeira vez identificado nesta bacia.

1.6 CONTRIBUIÇÕES DA CITOGENÉTICA E DA GENÉTICA MOLECULAR PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS

Historicamente, a identificação de espécies foi, na sua maioria, baseada apenas em caracteres morfológicos. Entretanto, a plasticidade fenotípica e a variação genotípica podem levar a diagnósticos equivocados, quando são tratadas espécies crípticas e diferentes estágios de desenvolvimento (ROSSO et al., 2012). A taxonomia moderna de peixes atua com várias ferramentas além da morfologia, como anatomia interna, fisiologia, biogeografia, genética e análises moleculares (WARD et al., 2009).

A citogenética de peixes é de grande importância para estudos evolutivos, e quando associada à Taxonomia pode ser uma excelente ferramenta no entendimento de grupos taxonomicamente problemáticos. Os dados citogenéticos permitem estabelecer tendências evolutivas entre grupos taxonômicos (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000).

A citogenética constitui-se de uma importante ferramenta para caracterização de espécies, pois, permite a determinação do número diploide de cromossomos e a descrição de cariótipos, como número fundamental (NF) e fórmula cariotípica (FC). Além disso, através de técnicas convencionais, como o bandamento C e a impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs), possibilitam demonstrar a localização de blocos de heterocromatina e das regiões organizadoras de nucléolos, respectivamente. Estas informações podem ser utilizadas como marcadores espécie-específicos em estudos populacionais e interespecíficos, auxiliando na resolução de problemas taxonômicos (HOWELL; BLACK, 1980; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI, 1986; ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000; SUMNER, 2003; GALETTI; MARTINS, 2004; MARTINS, 2007). Vicari et al. (2008) destacam a importância da realização de estudos com marcadores cromossômicos para elucidar relações entre espécies.

A heterocromatina de eucariontes contém grandes quantidades de DNA altamente repetitivo, que geralmente estão localizados em regiões centroméricas e teloméricas dos

cromossomos. A técnica de bandamento C tem sido utilizada para mapeamento da localização destas regiões heterocromáticas (GUERRA, 2004).

O DNA repetitivo inclui sequências repetidas em tandem que constituem o DNA satélite, minissatélite e microsatélite, além de sequências repetidas dispersas, como os elementos transponíveis (ET) (CHARLESWORTH et al., 1994). Estas sequências repetitivas podem conter famílias multigênicas, que codificam proteínas importantes, como hemoglobina e histonas, além do RNA ribossomal (rRNA) (MARTINS; WASKO, 2004).

O rDNA de eucariotos está organizado em duas famílias gênicas distintas, compostas por centenas a milhares de cópias. Uma destas famílias é representada pelo rDNA 45S, que codifica o rRNA 18S, 5,8S e 28S, a outra, representada pelo rDNA 5S codifica o rRNA 5S (MARTINS; GALETTI, 2001; MARTINS; WASKO, 2004).

Estudos com DNA ribossômico (rDNA) têm sido bastante utilizados, especialmente em relação à caracterização de espécies, variações populacionais, relacionamento evolutivo ou expressão gênica. A sequência nucleotídica e o padrão de localização dos sítios destas famílias multigênicas têm contribuído para a compreensão da estrutura, organização e evolução dos genomas (MARTINS; WASKO, 2004). A técnica de hibridação *in situ*, com sondas fluorescentes específicas isoladas, permite o mapeamento físico nos cromossomos da localização das sequências alvo, fornecendo informações para a caracterização cariotípica (GUERRA, 2004).

A distribuição dos sítios cromossômicos de rDNA 45s em peixes tem sido amplamente estudada por intermédio da impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs) (GALETTI; MARTINS, 2004). Este método é considerado indireto, uma vez que a prata se associa a proteínas nucleolares envolvidas na transcrição dos genes ribossomais e não diretamente ao rDNA (MILLER et al., 1976).

Em espécies de peixes os genes de rDNA podem estar localizados em um único par ou em vários cromossomos, podendo ser encontrada sintenia entre o rDNA 45S e rDNA 5S (PENDAS et al., 1994; MORAN et al., 1996), ou podem localizar-se em diferentes pares cromossômicos (MARTINEZ et al., 1996; MARTINS; GALETTI JR, 1999).

Artoni et al. (2009) destacam que na ictiofauna Neotropical, especialmente a Família Characidae, apresenta dois padrões de cariótipos distintos. Alguns grupos, como o gênero *Astyanax*, apresentam variabilidade quanto ao número e estrutura dos cromossomos, no número e localização das RONS, nos sítios ribossomais 18S e 5S, polimorfismo da heterocromatina e presença de cromossomos B (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; KAVALCO et al., 2007) e outros grupos, como as Famílias Anostominae e Parodontidae, tem

cariótipos mais conservados, com pequenas variações (BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI, 1986; GALETTI; BERTOLLO E MOREIRA-FILHO, 1994). O padrão com variações cariotípicas dificulta a identificação das espécies baseando-se apenas em caracteres morfológicos e citogenéticos, havendo a necessidade de incluir outros níveis de análise, como a molecular.

A identificação de espécies através de análises moleculares tem sido bastante empregada, métodos que utilizam aloenzimas e DNA mitocondrial (mtDNA) foram inicialmente usados (AVISE, 1994). Os métodos que utilizam o DNA são mais eficientes, pois ele é menos sensível à degradação e pode ser obtido em todos os estágios de desenvolvimento (WARD et al., 2009). O DNA *barcoding* permite que uma sequência de DNA de uma única região do gene possa ser utilizada como base de um sistema de identificação (WARD et al., 2009). O genoma mitocondrial apresenta algumas vantagens em relação ao genoma nuclear quando utilizados como *barcode*, pois não apresenta íntrons, tem exposição limitada à recombinação e sua hereditariedade é haploide (HEBERT et al., 2003).

O sequenciamento da subunidade I do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase (COI), e sua utilização como *barcode* foi proposto por Hebert et al., (2003) e desde então, tem sido promissor para a identificação de espécies, sendo utilizado em mais de 172 mil espécies (PEREIRA et al., 2013), uma vez que apresenta uma elevada taxa de evolução molecular quando comparado a outros genes (KNOWLTON E WEIGT, 1998; HEBERT et al., 2003).

Este gene possui em torno de 648 pb, fazendo parte de um complexo gênico que codifica proteínas transmembranas envolvidas no transporte de elétrons na cadeia respiratória de eucariontes (SIMON et al., 1994; DOBLER; MULLER, 2000; HEBERT et al., 2003). Seu princípio básico está relacionado à uma sequência de DNA relativamente curta que pode distinguir espécies através das diferenças entre as sequências, analisadas interespecificamente e comparadas à variação intraespecífica (HEBERT, et al., 2003; HAJIBABAEI et al., 2007; TOFFOLI et al., 2008; PEREIRA et al., 2013), permitindo um delineamento de espécies a partir de sequências semelhantes (WARD et al., 2009).

A metodologia do *barcode* utilizando o COI mostrou-se de grande eficácia em peixes Neotropicais, com 99,2% de resolução no estudo de Pereira et al. (2013), que envolveu 254 espécies de 36 Famílias na região do alto rio Paraná.

Para espécies de vertebrados, utiliza-se normalmente mais do que 2% de divergência genética interespecífica (*barcode gap*) como um valor delimitador de espécies (AVISE; WALKER, 1999; HERBERT et al., 2003; HUBERT, 2008; WARD, 2009; CARVALHO, 2011; MABRAGAÑA et al., 2011; PEREIRA, 2011a; PEREIRA, 2011b; BELLAFRONTE et

al., 2013; PEREIRA et al., 2013). Este limite é baseado no método de Kimura 2 Parâmetros (K2P), descrito por Kimura (1980), e considera a desigualdade entre as taxas de transição e transversão (α e β) para calcular valores de distância genética inter e intraespecíficos. Os parâmetros α e β permitem avaliar a taxa total de substituição por unidade de tempo e a classificação dessas substituições (transição/transversão). Para um nucleotídeo, pode haver uma troca α , o que causa uma transição, ou a uma troca β , que gera transversão. A razão de transição/transversão (R), será $\alpha/(2\beta)$. A taxa total de troca é de $\alpha+2\beta$ (Figura 2).

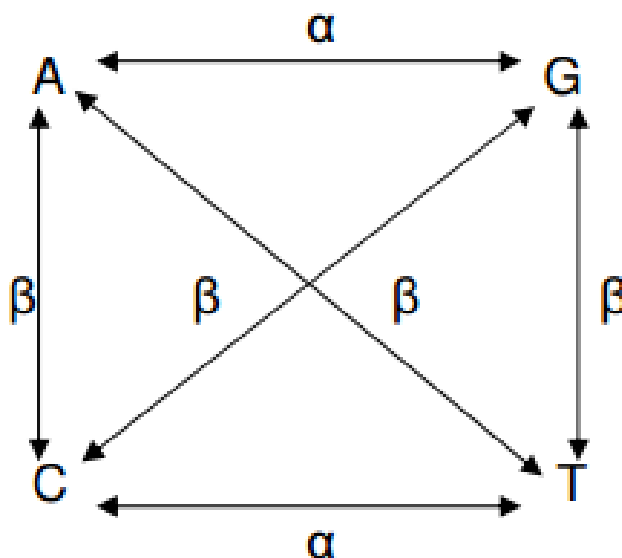


Figura 2. Esquema do modelo de K2P
Fonte: KIMURA (1980).

Tem sido realizado um esforço global a fim de criar um banco de dados para depósito de sequências *barcode* de peixes, culminando na campanha *Fish Barcode of Life* (FISH-BOL), uma biblioteca *on line* de referência para identificação de espécies (WARD, 2009).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Dados de estudos moleculares indicam que maior parte da diversificação da ictiofauna Neotropical ocorreu em período geológico recente, característica que, aliada à grande diversidade da Ordem Characiforme dificultam a identificação e taxonomia destes peixes, mesmo utilizando-se de informações moleculares (PEREIRA et al., 2013).

Observações realizadas na morfologia de exemplares de *Astyanax laticeps* e *Astyanax serratus* coletados não constatarem diferenças morfológicas entre as espécies (Oliveira, 2011b) (Figura 3), o que sugere que *A. serratus* pode tratar-se, na verdade, da espécie *A. laticeps*, com distribuição geográfica ocorrendo também na bacia do Rio Iguaçu, hipótese reforçada pela diagnose de *A. serratus*, realizada por Garavello e Sampaio (2010), na qual não houve um estudo comparativo entre estas espécies.

Além disso, a distribuição geográfica de *A. laticeps* ocorre em bacias costeiras, desde o litoral do estado de São Paulo (rio Ribeira de Iguape), até bacias litorâneas do Uruguai (BERTACO; LUCENA, 2010; OLIVEIRA, 2011b). Esta distribuição geográfica confrontada com os eventos de captura de ictiofauna na região do escudo Cristalino, onde ocorre o divisor das bacias do rio Iguaçu com os tributários costeiros, reforça a sugestão de que *A. laticeps* possa ocorrer na bacia do Rio Iguaçu.

Neste sentido, faz-se necessário integrar análises morfológicas, citogenéticas e de genética molecular, incluindo o sequenciamento e análise da subunidade I do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI), utilizado como *barcode* e universalmente empregado na identificação de espécies, a fim de buscar homologias interespecíficas para avaliar se *A. serratus* é, na verdade, a espécie *A. laticeps*, com ocorrência na bacia hidrográfica do rio Iguaçu ou se realmente tratam de duas unidades evolutivas distintas, na condição de espécies crípticas.

A integração de diversas técnicas de análise é fundamental para o estudo e resolução de complexos taxonômicos, como espécies crípticas e processos recentes de especiação, além de proporcionar uma avaliação da eficácia destas técnicas em estudos taxonômicos no gênero *Astyanax*.

Compreender a relação taxonômica entre *A. serratus* e *A. laticeps* se faz importante para o entendimento do processo evolutivo do complexo gênero *Astyanax* e somará informações sobre a particular geomorfologia e biogeografia da ictiofauna da região sul-sudeste brasileira.

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se *Astyanax laticeps* e *Astyanax serratus* compõem uma única espécie e apresentam-se em sinonímia, ou se são crípticas, com um nível de diferenciação suficiente para distinguir unidades evolutivamente independentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar morfologicamente indivíduos de ambas as espécies e comparar a proporcionalidade das medidas;
- b) Realizar a caracterização cromossômica das espécies, através de montagem dos cariótipos, determinação de fórmula cariotípica e número fundamental;
- c) Utilizar marcadores cromossômicos para mapear a localização dos blocos de heterocromatina constitutiva, regiões organizadoras de nucléolos e de DNA ribossomal (5S e 18S), e comparar o padrão destes marcadores entre as duas espécies;
- d) Comparar as sequências nucleotídicas parciais (subunidade I) do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase (COI), através da técnica de *Barcode*, para testar se as semelhanças moleculares são significativas e condizem com as demais análises;
- e) Comparar o nível de resolução dos diferentes métodos utilizados, no esclarecimento de incertezas taxonômicas no complexo gênero *Astyanax*;
- f) Contribuir com informações para uma melhor compreensão do processo evolutivo e da biogeografia do gênero *Astyanax* nas bacias hidrográficas paranaenses.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA

Para as técnicas de citogenética convencional e molecular foram utilizados indivíduos de *Astyanax laticeps* (Figura 3), coletados na bacia do rio Ribeira de Iguape no ponto 5 (Tabela 1) e os indivíduos de *Astyanax serratus* (Figura 3) foram coletados na bacia do rio Iguaçu, no ponto 3 (Tabela 1).

Para a análise morfológica, além dos pontos de coletas mencionados, também foram utilizados indivíduos de *A. laticeps* dos pontos 4, 6 e 7 e indivíduos de *A. serratus* dos pontos 1 e 2 (Tabela 1). A localização dos pontos de coleta pode ser observada no mapa da Figura 4.

As coletas foram realizadas por meio de varas e redes de pesca. Os indivíduos de *A. serratus* foram transportados vivos para o laboratório de pesquisa da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), Campus de União da Vitória, e os indivíduos de *A. laticeps* foram transportados vivos para o Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Campus de Uvaranas e mantidos em aquários aerados. Foi realizada eutanásia dos peixes, com anestesia por óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000). Todos os espécimes foram identificados e depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil.

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

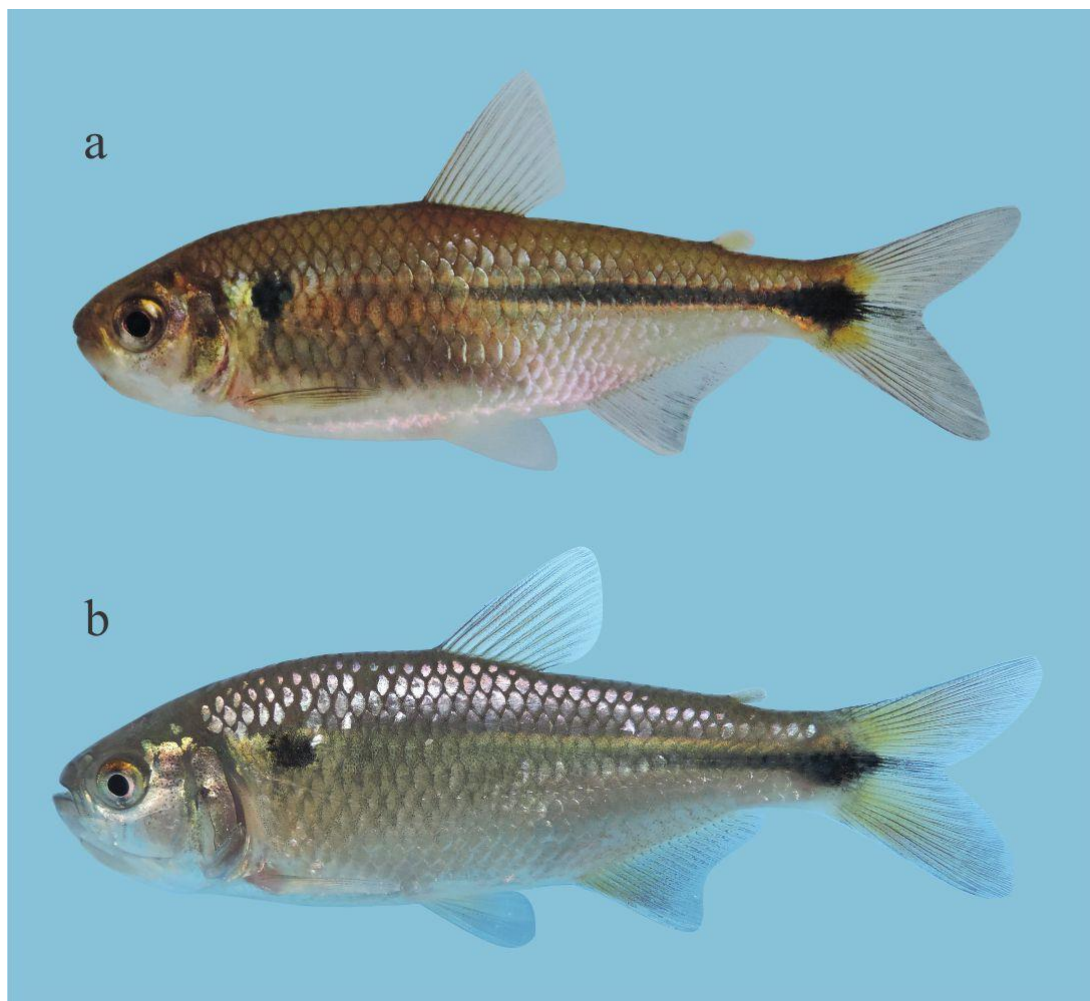


Figura 3: *Astyanax laticeps* (a) e *Astyanax serratus* (b). Comprimento padrão: 67,8 mm (a) e 74,5 mm (b).

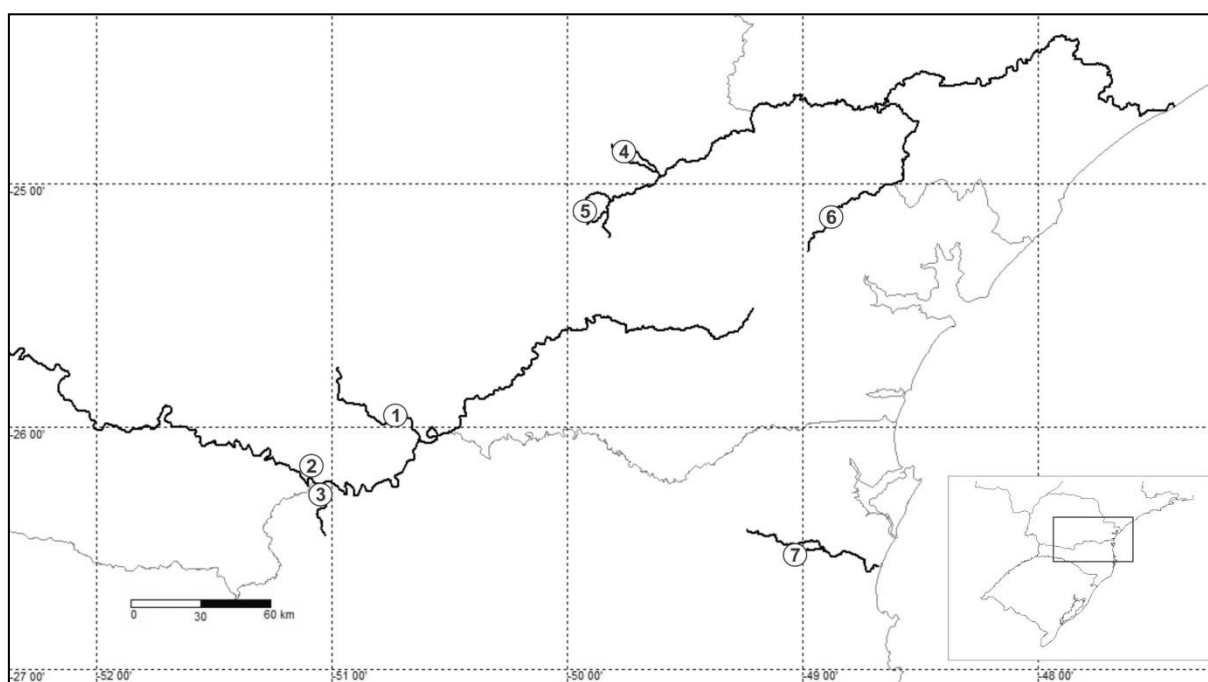


Figura 4: Mapa dos pontos de coleta: 1, 2 e 3 – Rio Iguaçu (*A. serratus*); 4, 5 e 6 – Rio Ribeira de Iguape (*A. laticeps*); 7 – Rio Itapucu (*A. laticeps*).

Tabela 1: Descrição dos pontos de coletas de *A. serratus* e *A. laticeps*.

Referência na figura 4	Espécie	Afluentes / Município / Estado	Bacia Hidrográfica	Coordenada geográfica	NUP	Número de indivíduos
1	<i>Astyanax serratus</i>	Rio Claro Mallet-PR	Rio Iguaçu	-25° 57' 16,7364" -50° 43' 31,2924"	17529	2
2	<i>A. serratus</i>	Riacho Correntes União da Vitória-PR	Rio Iguaçu	-26° 09' 54,8280" -51° 05' 28,8456"	16889	9
3	<i>A. serratus</i>	Rio Pintado Porto União-SC	Rio Iguaçu	-26° 16' 41,6600" -51° 02' 55,1000"	16890 e 18252	17
4	<i>Astyanax laticeps</i>	Riacho Ribeirãozinho Castro-PR	Rio Ribeira de Iguape	-24° 52' 00,0000" -49° 45' 00,0000"	5170	1
5	<i>A. laticeps</i>	Riacho Itaiacoca Ponta Grossa-PR	Rio Ribeira de Iguape	-25° 07' 00,1000" -49° 54' 59,0000"	17533 / 18253 e 18254	17
6	<i>A. laticeps</i>	Reservatório Governador Parigot de Souza, Rio Capivari Campina Grande do Sul-PR	Rio Ribeira de Iguape	-25° 08' 33,0000" -48° 52' 08,0000"	2869	2
7	<i>A. laticeps</i>	Riacho Itapucu Massaranduba-SC	Rio Itapucu	-26° 32' 04,3000" -49° 01' 28,1000"	17515	8

NUP: Código de depósito no NUPELIA (Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada no NUPÉLIA da UEM, através de paquímetro digital, e foram consideradas as medidas proporcionais em relação ao comprimento da cabeça e ao comprimento do corpo (Figura 5). Foi realizada análise das variáveis canônicas livres de tamanho das proporções obtidas, através do *software* PAST v. 3.10, pelo algoritmo de Legendre e Legendre (1998).

Realizou-se a contagem dos raios das nadadeiras anal, dorsal, peitoral e pélvica; do número de escamas da linha lateral, série de escamas acima e abaixo da linha lateral, da cabeça até o dorso (pré-dorsal) e circumpeduncular, de acordo com Fink e Weitzman (1974) e Menezes e Weitzman (1990). O comprimento padrão e o número de escamas acima e abaixo da linha lateral foram obtidos conforme Bertaco e Lucena (2006).

A contagem de dentes foi realizada nas séries externa e interna do pré-maxilar, do dentário e do maxilar; sendo considerados o número de cúspides dos dentes sinfisianos e laterais da série externa e interna do pré-maxilar, do dentário e do maxilar, de acordo com Fink e Weitzman (1974) e Garutti e Langeani (2009). O padrão de coloração foi caracterizado considerando o número e formato de manchas umerais, conforme Garutti e Langeani (2009).

A extração dos dentes foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994). Os dentes foram posteriormente fotografados em microscópio de campo claro (Olympus BX41) em aumento 40X acoplado a câmara CCD DP71 (Olympus) no *software* DP Controller (Olympus).

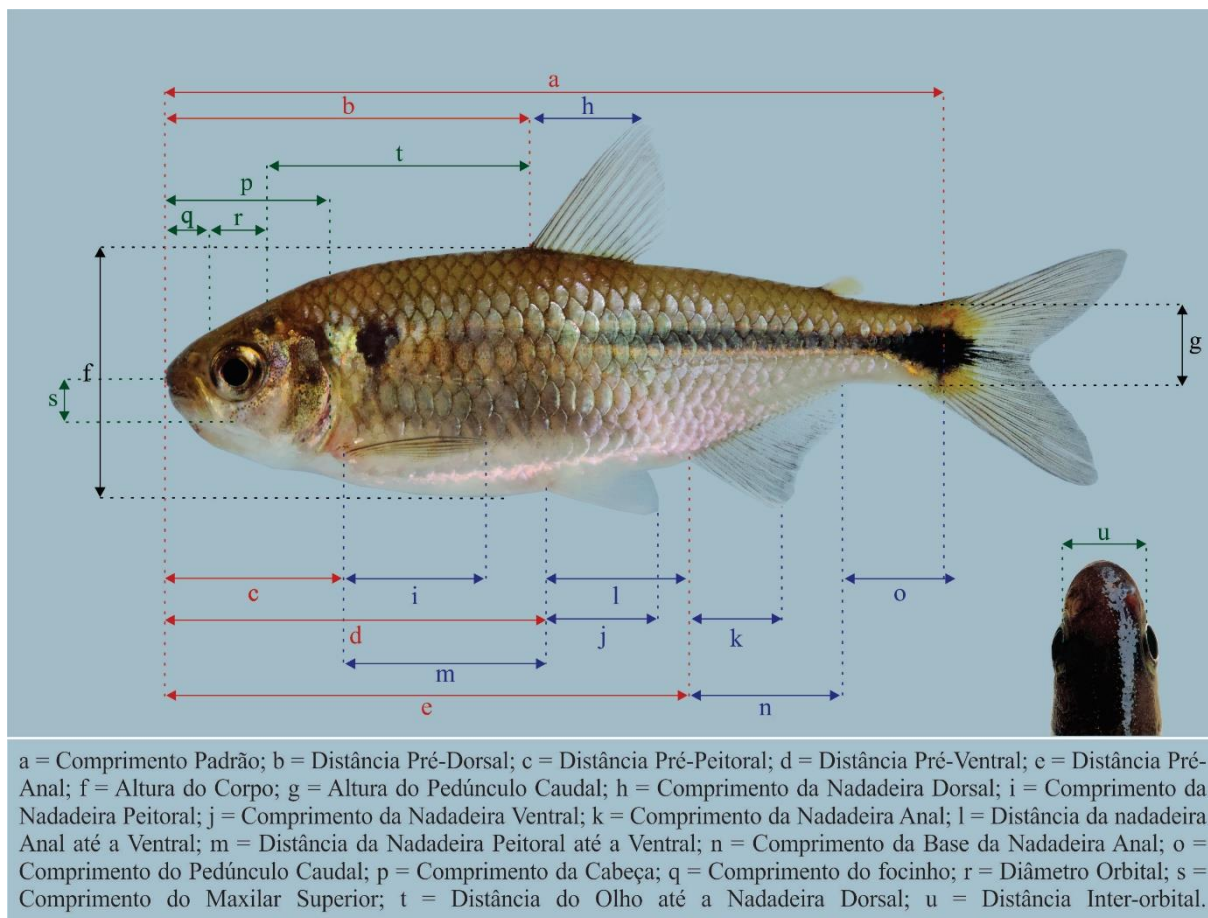


Figura 5: Parâmetros utilizados para medições na análise morfométrica. Medidas em relação ao comprimento do corpo (vermelho), comprimento da cabeça (verde), altura do corpo (preto) e nadadeiras (azul).

3.2.2 Preparações cromossômicas e citogenética

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

Para a detecção de heterocromatina constitutiva, realizou-se a técnica de bandamento C proposta por Sumner (1972), com modificações (LUI et al., 2009). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram detectadas pela técnica de impregnação pelo íon prata segundo Howell e Black (1980).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o procedimento descrito por Pinkel; Straume e Gray (1986). A obtenção da sonda de DNA ribossômico 18S ocorreu a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2004) e a sonda de rDNA 5S a partir de DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) (MARTINS; GALETTI, 1999). As sondas foram marcadas pelo Kit *Nick Translation*, para a

sonda rDNA 18S foi utilizado digoxigenina-11-dUTP e para a sonda do rDNA 5S biotina-16-dUTP, segundo as orientações do fabricante (*Roche Applied Science*). A detecção das sondas foi realizada com anticorpo anti-digoxigenina conjugada com rodamina e streptavidina conjugada com FITC, respectivamente. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI em meio de montagem *Vectashield*. As misturas de hibridização tiveram a estringência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2x SSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 horas).

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

Para a montagem dos cariótipos os cromossomos foram identificados baseando-se na relação de braços proposta por Levan et al. (1964) e mensurados por meio do *software* Easy Idio 1.0 (DINIZ; MELO, 2006). Realizou-se a montagem dos cariótipos e ideogramas através da utilização dos *softwares* Adobe Photoshop (versão PSD 14) e Corel Draw (versão X7).

3.2.3 Obtenção de sequências de DNA *Barcode*

As sequências parciais do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (COI) foram obtidas através de extração de DNA de células musculares e do fígado de 5 indivíduos de cada espécie, através do método CTAB, de acordo com Doyle e Doyle (1990). A amplificação da sequência foi realizada através de PCR em ciclador térmico, com os *primers* Fish F1 e Fish R1 (WARD et al., 2005).

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose à 1% e purificados com kit de purificação GE Healthcare GCF PCR DNA, seguindo as orientações do fabricante e sequenciados em equipamento ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) por empresa terceirizada. As sequências individuais foram tratadas no *software* Geneious 4.8.5 e identificadas contra o banco de dados do *Nacional Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

As análises de distância genética intraespecífica e interespecífica foram realizadas no *software* MEGA 6.06 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), no qual as sequências foram alinhadas pelo algoritmo *Muscle*, comparadas e posteriormente foi elaborado um dendograma com base na distância genética (KUMAR; GADAGKAR, 2000), a qual foi calculada utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980).

Para enraizamento do dendograma foi incluída a espécie *A. scabripinnis*, da qual *A. serratus* e *A. laticeps* fazem parte do complexo, e as espécies *A. paranae*, que também faz

parte do complexo de *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, que forma outro complexo de espécies dentro deste gênero. O método utilizado para construção do dendograma foi de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). Como técnica de estimação de erros estatísticos, utilizou-se a análise de *bootstrap*, com 1.000 replicações, o qual é utilizado para medir o grau de suporte dos nós pelo alinhamento das sequências. O valor de *bootstrap* representa o número de vezes que o agrupamento ocorreu nas replicações. Estas análises estão integradas no *software* Mega 6.06, utilizado também para a construção do dendograma.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

CAPÍTULO 1

Análise morfológica, citogenética e de genética molecular: um caso de sinonímia no gênero *Astyanax* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

4.1 CAPÍTULO 1

Análise morfológica, citogenética e de genética molecular: um caso de sinonímia no gênero *Astyanax* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

RESUMO

O gênero *Astyanax*, considerado como *Incertae sedis* na Família Characidae, caracteriza-se pela ausência de monofiletismo e um elevado número de espécies. O objetivo desta pesquisa foi verificar se *A. serratus*, considerada endêmica da bacia do Rio Iguaçu e *A. laticeps*, distribuída nas bacias costeiras, constituem uma única espécie em sinonímia, ou apresentam um nível de variabilidade suficiente para distinção como espécies crípticas, uma vez que apresentam grandes semelhanças morfológicas. Foram realizadas análises integradas sob os aspectos da morfologia, incluindo medições da proporção corporal em relação ao comprimento da cabeça e do corpo, contagens de escamas, raios de nadadeiras, dentes e número de cúspides; análise citogenética, por meio de bandamento C, detecção de Ag-RONs por impregnação com nitrato de prata, citogenética molecular, com localização de sítios de DNA ribossomal 5S e 18S através de técnica de hibridação *in situ* fluorescente e de genética molecular, incluindo sequenciamento parcial do gene citocromo c oxidase I (COI) e utilização como DNA *barcode*. Ambas as espécies apresentaram pré-maxilar com duas séries de dentes, sendo a série externa com dentes tricuspídeos, e dentes da série interna com 3 a 5 cúspides, presença de ganchos nas nadadeiras pélvicas e anal de machos, corpo alongado, com uma mancha umeral com estreito prolongamento anteroventral. As duas espécies apresentaram $2n = 50$ cromossomos, fórmula cariotípica composta por $4m + 24sm + 6st + 16a$ e número fundamental de 84. O padrão de localização de heterocromatina e Ag-RONs mostrou-se heterogêneo entre as duas espécies, com variações intrapopulacionais nos sítios heterocromáticos. A utilização de marcadores cromossômicos revelou localização dos sítios de rDNA 5S no par cromossômico 19 em ambas as espécies, com heterogeneidade nas marcações de rDNA 18S. O sequenciamento do gene mitocondrial COI foi determinante nesta análise, pois revelou uma baixa divergência genética interespecífica, de apenas 0,2%. Estes diferentes níveis de análise sugerem que *A. serratus* e *A. laticeps* são espécies sinônimas, ampliando a ocorrência de *A. laticeps* na bacia do rio Iguaçu e reforçando a hipótese de compartilhamento de fauna através do escudo cristalino. As variações interespecíficas encontradas no mapeamento de heterocromatina constitutiva, Ag-RONS e rDNA 18S são comuns em *Astyanax* e derivam de eventos não robertsonianos, mas também podem sugerir um processo de vicariância, com o isolamento geográfico das bacias hidrográficas e restrição de fluxo gênico entre a população do rio Iguaçu e populações de tributários litorâneos. A utilização do *barcode* através do sequenciamento do COI se mostrou eficiente na resolução de problemas taxonômicos neste caso.

Palavras-chave: *Astyanax laticeps*, *Astyanax serratus*, Taxonomia, Espécies Sinônimas.

Morphological analyses, cytogenetics and molecular genetics: a case of synonyms in the genus *Astyanax* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

ABSTRACT

The genus *Astyanax* considered as *Incertae sedis* in the Characidae family is characterized by absence of monophyly and a high number of species. The objective of this study was to verify whether *A. serratus*, considered endemic of the Iguaçu River basin and *A. laticeps*, distributed in coastal basins, constitute a single species in synonym, or present a sufficient variability for distinction as cryptic species, since they are showing great morphological similarities. Integrated analyzes were conducted under aspects of morphology, including measurements of body proportion to length of the head and body; counting scales; fin rays; teeth and number of cusps; cytogenetic analysis by C-banding, Ag-NORs detection by impregnation with silver nitrate, location DNA ribosomal sites 5S and 18S through fluorescent *in situ* hybridization technique and molecular genetics, including the sequencing partial of cytochrome c oxidase I gene (COI) and the use as DNA *barcode*. The two species have pre-jaw with two series of teeth, where the external series with tricuspid teeth, and the teeth of internal series with 3-5 cusps, presence of hooks on anal and pelvic fins of males, elongated body with a humeral spot with narrow anteroventral extension. Both species presented $2n = 50$ chromosomes, karyotype formula consisting of $4m + 24sm + 6st + 16th$ and fundamental number of 84. The pattern of location of heterochromatin and Ag-NORs showed heterogeneous between the two species, with intrapopulation variations. The use of chromosomal markers revealed location DNA ribosomal sites 5S and 18S in the chromosome 19 pair in both species, with heterogeneity in the markings of 18S rDNA. The sequencing of the mitochondrial gene COI, was determining factor in this analysis, because revealed a low interspecific genetic divergence of only 0.2%. These different levels of analysis suggest that *A. serratus* and *A. laticeps* are synonymous species, increasing the occurrence of *A. laticeps* in the Iguaçu River basin and reinforcing the hypothesis of fauna sharing through the crystalline shield. The interspecific variations found in the mapping of constitutive heterochromatin, Ag-NORs and 18S rDNA are common in *Astyanax* and derived of events no robertsonian, whereas the differences can also to suggest a vicariant process, with geographic isolation of watersheds and gene flow restriction between the populations of the Iguaçu River and populations of coastal tributaries. The barcode use through the COI sequencing proved effective in solving taxonomic problems in this case.

Keywords: *Astyanax laticeps*, *Astyanax serratus*, Taxonomy, Synonymous Species.

Introdução

Os peixes da Ordem Characiforme possuem uma ampla distribuição geográfica, compreendendo a África do Sul e continente Americano (MALABARBA et al., 2013), destacando-se também entre a ictiofauna Neotropical pelo elevado número de espécies, correspondendo a 3.381 espécies válidas (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; ESCHMEYER; FONG, 2015).

A Família Characidae é amplamente distribuída e apresenta o maior número de espécies na região Neotropical (MIRANDE, 2009; 2010), com um total de 2.182 espécies válidas (MIRANDE, 2009; ESCHMEYER; FONG, 2015). O elevado número de espécies e a ausência de sinapomorfias para a determinação de subfamílias monofiléticas fez com que 92 de 170 de seus gêneros fossem considerados como *Incertae Sedis*, como, por exemplo, *Astyanax*, *Bryconamericus* e *Hyphessobrycon* (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; MIRANDE, 2009; BAUMGARTNER et al., 2012).

Composto por 155 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015) e com ampla distribuição na região Neotropical, com destaque nas bacias da América do Sul, os *Astyanax* são popularmente conhecidos como “lambaris” (MALABARBA et al., 2013). Este gênero foi inicialmente descrito por Baird e Girard (1854), e Reis; Kullander e Ferraris (2003), o agrupou como *Incertae Sedis* na Família Characidae, devido a ausência de evidências de monofiletismo. Caracterizam-se pela presença de nadadeira adiposa, duas fileiras de dentes no pré-maxilar, com cinco dentes na série interna; linha lateral completa e nadadeira caudal sem escamas (EIGENMANN, 1921; 1927).

A citogenética deste gênero mostra um número diploide que varia desde 36 cromossomos em *A. schubartti* (MORELLI et al., 1983; DANIEL SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005) até 50 cromossomos para a maioria das espécies, como, por exemplo, *A. altiparanae*, *A. eigenmanniorum*, *A. janeiroensis*, *A. mexicanus*, *A. scabripinnis*, *A. bifasciatus* e *A. minor* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994; MAISTRO, et al., 1994; CARVALHO; OLIVEIRA; FORESTI, 2002; DOMINGUES et al., 2007; KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007; PAZZA, 2007), não havendo cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (MORELLI et al., 1983).

Astyanax laticeps foi descrito inicialmente por Cope (1894), como *Tetragonopterus laticeps*. Eingemann (1910; 1921) o incluiu como uma subespécie de *A. scabripinnis* e, em 2001, foi reconhecido como uma espécie válida, denominada *Astyanax laticeps* (BERTACO; MALABARBA, 2001; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

A ocorrência de *A. laticeps* foi registrada em drenagens costeiras do Uruguai e do sul do Brasil, na bacia do rio Uruguai (AZPELICUETA; LOUREIRO, 2009; BERTACO; LUCENA, 2010) e também na bacia Atlântica do Paraná e do Rio Ribeira de Iguape, na qual era identificada anteriormente como *Astyanax janeiroensis* (OLIVEIRA, 2011b).

Astyanax sp. D, foi citada inicialmente por Sampaio (1988) e diagnosticada por Garavello e Sampaio (2010), como *Astyanax serratus*. Considerada endêmica da bacia do rio Iguaçu, apresenta corpo com a região ventral mais clara, escurecendo em direção ao dorso; faixa longitudinal escura e larga, prateada quando em vida; mandíbula robusta, com a margem do terceiro infraorbital separada do pré-opérculo por uma área ampla de pele e boca terminal (BAUMGARTNER et al., 2012). Ingenito e Duboc (2014), baseados no estudo de Bertaco e Lucena (2006) mantiveram *A. serratus*, juntamente com *A. laticeps* dentro do complexo *A. scabripinnis*.

Observações realizadas na morfologia de exemplares de *A. laticeps* e *A. serratus* por Oliveira (2011b) não revelaram diferenciação morfológica entre as espécies (Figura 3), indicando que podem ser espécies crípticas, ou *A. serratus* pode tratar-se, da espécie *A. laticeps*, em sinonímia, ampliando a ocorrência de *A. laticeps* para a bacia do Rio Iguaçu, hipótese reforçada pela ausência de comparação morfológica entre estas duas espécies na diagnose de *A. serratus*, realizada por Garavello e Sampaio (2010).

Neste sentido, faz-se necessário associar análises morfológicas, citogenéticas, envolvendo determinação de número diploide, caracterização da fórmula cariotípica e número fundamental, bem como o mapeamento de blocos de heterocromatina constitutiva, Ag-RONs e de DNA ribossomal, compreendendo as famílias de rDNA 18S e 5S, incluindo também o sequenciamento de DNA de regiões específicas, como o gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI), utilizado como DNA *barcode*, para uma análise integrada proporcionando uma visão sob diversos aspectos dos processos evolutivos envolvidos nestas duas espécies e compreender o padrão biogeográfico das mesmas.

O presente trabalho teve como objetivo determinar, por meio de homologias interespecíficas, se *A. serratus* é espécie sinônima ou críptica de *A. laticeps* e, além disso, avaliar se a distribuição geográfica desta pode ser ampliada para a bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, permitindo a compreensão da relação taxonômica entre *A. serratus* e *A. laticeps* e gerando informações importantes para o entendimento do processo evolutivo do gênero *Astyanax*, somando conhecimentos acerca da particular geomorfologia das bacias hidrográficas e da biogeografia da ictiofauna da região sul-sudeste brasileira.

Material e Métodos

Os indivíduos de ambas as espécies foram coletados na natureza (Tabela 1), de acordo com licença permanente para coleta de material zoológico (MMA/IBAMA/SISBIO: 15115-1). Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Ponta Grossa (Protocolo: 04509/08). Todos os indivíduos coletados foram identificados e depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil.

Análise morfológica

Para a espécie *Astyanax serratus* foram realizadas medições em 20 indivíduos, correspondendo à 3 populações (Tabela 1): Rio Pintado (NUP 16890), Rio Correntes (NUP 16889) e Rio Claro (NUP 17529). Em *Astyanax laticeps*, foram realizadas medições em 14 indivíduos, correspondendo à 4 populações (Tabela 1): Riacho Itaiacoca (NUP 17533), Córrego Itapucu (NUP 17515), Rio Capivari (NUP 2869) e Rio Ribeirãozinho (NUP 5170). A localização dos pontos de coleta pode ser visualizada no mapa da Figura 4.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se de paquímetro digital, sendo consideradas as medidas proporcionais em relação ao comprimento da cabeça e ao comprimento do corpo. Foi realizada a contagem dos raios das nadadeiras anal, dorsal, peitoral e pélvica; do número de escamas da linha lateral, série de escamas acima e abaixo da linha lateral, da cabeça até o dorso (pré-dorsal) e circumpeduncular, de acordo com Fink e Weitzman (1974) e Menezes e Weitzman (1990). O comprimento padrão e o número de escamas acima e abaixo da linha lateral foram obtidos conforme Bertaco e Lucena (2006). Foi realizada análise das variáveis canônicas livres de tamanho das proporções obtidas, através do *software* PAST v. 3.10, pelo algoritmo Legendre e Legendre (1998).

Foi realizada contagem de dentes das séries externa e interna do pré-maxilar, do dentário e do maxilar; número de cúspides dos dentes sinfisianos e não sinfisianos da série externa e interna do pré-maxilar, do dentário e do maxilar de acordo com Fink e Weitzman (1974). A extração dos dentes foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994). Os dentes foram posteriormente fotografados em microscópio de campo

claro (Olympus BX41) em aumento 40X acoplado a câmara CCD DP71 (Olympus) e o *software* DP Controller (Olympus).

Citogenética convencional e molecular

Para o estudo citogenético e molecular foram utilizados 8 exemplares de *A. serratus* da população do Rio Pintado (NUP 16890) e 8 indivíduos de *A. laticeps* da população do Riacho Itaiacoca, bacia do rio Ribeira de Iguape.

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada seguindo a técnica de preparações diretas de Bertollo; Takahashi e Moreira-Filho (1978). A detecção da heterocromatina constitutiva (bandas-C) ocorreu por meio da técnica de Sumner (1972), com alterações na coloração, realizada com iodeto de propídio (LUI et al., 2009). A caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foi realizada conforme Howell e Black (1980).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986), realizada com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S, obtidas respectivamente a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2004) e de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI, 1999).

As sondas foram marcadas com os kits *Biotin Nick Translation* e *Dig Nick Translation*, segundo as recomendações do fabricante (*Roche Applied Science*). As reações de hibridização tiveram a estringência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, à 37 °C por 16 horas). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos anti-digoxigenina conjugada com rodamina e streptavidina conjugada com FITC (*Roche Applied Science*). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem *Vectashield*.

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência *Zeiss Axio Imager A2* acoplado ao *software* ZEISS pro 2011 em Câmera *Zeiss AxioCam MRm* de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®), foram analisadas no mínimo 30 metáfases para cada indivíduo, sendo utilizados quatro indivíduos machos e quatro fêmeas de cada espécie, para determinação do número diploide, fórmula cariotípica e número fundamental.

Os cariótipos foram montados usando o *software Adobe Photoshop*, versão CS6, a partir das melhores metáfases selecionadas. Os cromossomos foram classificados em

metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan; Fredga e Sandberg (1964). Os ideogramas foram construídos a partir dos cariótipos, e respectiva razão de braços (RB), com os *softwares* Easy Idio 1.0 (DINIZ; MELO, 2006) e Corel Drawv.X7, 2014 - *Corel Corporation*.

Obtenção e análise das sequências do gene citocromo c oxidase I (COI)

Para a obtenção das sequências do gene COI foi realizada a extração de DNA genômico e mitocondrial a partir de tecidos sólidos (fígado e músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990), de 5 indivíduos de cada espécie, coletados no rio Pintado (*A. serratus*) e no riacho Itaiacoca (*A. laticeps*).

A amplificação da sequência foi realizada através de PCR em ciclador térmico, com os primers Fish F1 e Fish R1 (WARD et al., 2005), utilizando-se de 2,5 µl de tampão 10x, 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de mix de DNTPs (2 mM), 0,5 µl de cada primer (forward: 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'; reverse: 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3'), 0,2 µL de Taq Polimerase (*Invitrogen* - 5 unidades), 2,5 uL de DNA concentrado à 10ng/µl, e completados para 25 µl com água Mili Q. O ciclo de PCR consiste em um passo inicial de desnaturação à 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos; anelamento à 46,1°C por 30 segundos (para ambas as espécies) e extensão à 72°C por 1 minuto, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 10 minutos.

+ faz parte do complexo de *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, que forma outro complexo de espécies dentro deste gênero. Estas sequências foram obtidas através de depósitos na plataforma *Bold System* (http://www.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records), conforme Figura 11.

Resultados

Análise morfológica

Astyanax laticeps apresentou comprimento padrão médio de 67,81 mm. Pré maxilar com duas séries de dentes, sendo a série externa variando de 3 a 5 dentes. Tanto os dentes sinfisianos como os laterais se apresentaram tricuspidados (Figura 6: A, C). Série interna com 5 dentes, sendo os sinfisianos e os laterais variando de 5 a 3 cúspides (Figura 6: E, G). Maxilar variando de 0 a 2 dentes tricuspidados (Figura 6: M). Dentário com 4 dentes, os sinfisianos variando de 5 a 4 cúspides e os laterais apresentando de 5 a 3 cúspides (Figura 6: I, K). Todos os dentes apresentaram a cúspide central maior que as laterais.

Nadadeira dorsal com 2 raios ramificados e 8, 9 raios não ramificados. Nadadeira anal com 3, 4 raios ramificados e 16 a 23 raios não ramificados. Nadadeira peitoral com 1 raio ramificado e 11 a 12 raios ramificados e nadadeira pélvica com 1 raio ramificado e 6 a 7 raios não ramificados (Tabela 2).

Escamas ciclóides, linha lateral completa variando de 37 a 38 escamas perfuradas. Série de 6 a 8 escamas acima e 5 a 7 escamas abaixo da linha lateral. De 11 a 14 escamas pré-dorsais. Série longitudinal de 17 a 19 escamas ao redor do pedúnculo caudal (Tabela 2).

Astyanax serratus apresentou comprimento padrão médio de 74,05 mm. Pré maxilar com duas séries de dentes, sendo a série externa variando de 3 a 4 dentes. Tanto os dentes sinfisianos como os laterais se apresentaram tricuspidados (Figura 6: B, D). Série interna com 5 dentes, sendo os sinfisianos e os laterais variando de 5 a 3 cúspides (Figura 6: F, H). Maxilar variando de 0 a 2 dentes com 3 a 1 cúspides (Figura 6: N). Dentário com 4 ou 5 dentes, tanto os sinfisianos como os laterais variando de 5 a 3 cúspides (Figura 6: J, L). Todos os dentes apresentaram a cúspide central maior que as laterais.

Nadadeira dorsal com 2, 3 raios ramificados e 8, 9 raios não ramificados. Nadadeira anal com 3, 4 raios ramificados e 16 a 19 raios não ramificados. Nadadeira peitoral com 1 raio ramificado e 11 a 13 raios ramificados e nadadeira pélvica com 1 raio ramificado e 7 raios não ramificados (Tabela 2).

Escamas ciclóides, linha lateral completa variando de 36 a 38 escamas perfuradas. Série de 6 a 7 escamas acima e 5 a 6 escamas abaixo da linha lateral. De 11 a 13 escamas pré-dorsais. Série longitudinal de 17 a 19 escamas ao redor do pedúnculo caudal (Tabela 2).

As proporções corporais obtidas através da morfometria constam na Tabela 3 e Figura 7.

Determinação da fórmula cariotípica e marcadores cromossômicos

As espécies estudadas apresentaram o mesmo número diploide, com 50 cromossomos, incluindo o primeiro par de cromossomos metacêntricos de grande porte em relação aos demais do complemento, mesma fórmula cariotípica, sendo 4 cromossomos metacêntricos; 24 submetacêntricos, 6 subtelocêntricos e 16 acrocêntricos (Figura 8) e mesmo número fundamental (84). Não foi constatada a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados.

As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) se apresentaram múltiplas (Figura 8), sendo a maioria coincidentes com os sítios de rDNA 18S (Figura 9) em ambas as espécies.

O bandamento C revelou regiões de heterocromatina constitutiva heterogêneas entre as espécies (Figura 9), sendo coincidentes com os sítios de rDNA 5S apenas em *A. laticeps*. Os sítios de heterocromatina localizaram-se em regiões centroméricas, com predominância em regiões teloméricas, sendo coincidentes com os sítios de Ag-RONS e com rDNA 18S nos pares 9 e 16 em *A. laticeps*. Em *A. serratus*, foi coincidente com as Ag-RONs e rDNA 18S nos pares 4, 7, 20 e 21. Em um dos cromossomos homólogos do par 4 de *A. serratus* foram evidenciados dois grandes blocos de heterocromatina, nas regiões teloméricas do braço curto e do braço longo. Foram evidenciados polimorfismos intrapopulacionais na localização de heterocromatina em ambas as espécies.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente revelou a presença do rDNA 5S na região centromérica do par cromossômico 19 em ambas as espécies (Figura 9). Os sítios de rDNA 18S apresentaram-se em ambos os homólogos no par 9 de *A. laticeps* e pares 4 e 7 de *A. serratus*, além de constarem marcações heteromórficas nas duas espécies. Estes sítios localizaram-se predominantemente em regiões teloméricas, com exceção para o par 21 de *A. serratus*, onde localizou-se na região centromérica. Uma síntese dos marcadores cromossômicos utilizados poder ser visualizada no ideograma (Figura 10).

Análise do Barcode

Através do sequenciamento do gene COI, foram evidenciados 686 pares de bases para este gene em ambas as espécies e as sequências obtidas foram de alta qualidade. As sequências foram depositadas no banco de dados do *Nacional Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) sob os registros: KX815347; KX815348; KX815349; KX815350 e KX815351 para *A. laticeps* e KX527840; KX527842; KX527843; KX527845 e KX527849 para *A. serratus*.

A divergência genética intraespecífica em *A. serratus* e *A. laticeps* foi de 0% para ambas as espécies. A divergência interespecífica foi de 0,2%. Comparadas à sequência de *A. scabripinnis*, a divergência genética foi de 20,4 % para *A. laticeps* e 20,7% para *A. serratus*. Quando comparados com *A. paranae*, a divergência genética cai para 3,7% entre *A. paranae* e *A. laticeps* e 3,9% entre *A. paranae* e *A. serratus*. Em comparação com *A. fasciatus*, a divergência é de 5,6% para *A. laticeps* e 5,8% para *A. serratus*. Estes dados podem ser visualizados na Tabela 4.

O dendograma elaborado (Figura 11) demonstra a pequena divergência entre *A. serratus* e *A. laticeps*, agrupadas em um ramo bastante consistente, com o valor de *bootstrap* de 99%. A espécie *A. scabripinnis*, enraizou o dendograma, com 100% de *bootstrap*, demonstrando possuir um ancestral comum com o ramo diversificado. As espécies *A. paranae* e *A. fasciatus*, foram situadas no mesmo ramo de *A. laticeps* e *A. serratus* e separadas de *A. scabripinnis*, indicando a presença de um ancestral comum entre elas, no entanto, as duas são separadas com 97% de valor de *bootstrap* de *A. laticeps* e *A. serratus*. A divergência intraespecífica fica evidente no dendograma, nas espécies *A. paranae* e *A. fasciatus*.

Discussão

A análise morfométrica revelou proporções condizentes com estudos realizados por Haluch e Abilhoa (2005), Bertaco (2010) e Oliveira, (2011b) para *A. laticeps* e Garavello e Sampaio (2010), para *A. serratus*, com exceção da altura do corpo em *A. serratus*, onde a média (32,86% do comprimento do corpo) esteve abaixo do valor mínimo obtido por Garavello e Sampaio (2010) (34,2% do comprimento do corpo). O diâmetro orbital foi o item com maior divergência entre as espécies estudadas, com 31,03% de média em relação ao comprimento da cabeça para *A. serratus* contra 37,10% para *A. laticeps*.

O gráfico das variáveis canônicas livres de tamanho (Figura 7), elaborado com base nas proporções corporais, agrupa os indivíduos de *A. serratus* e *A. laticeps* num mesmo conjunto, mas com uma definição de cada espécie, demonstrando haver uma tendência de separação, ainda que inicial. Castro et al., (2014), ao estudarem duas populações de *A. scabripinnis* isoladas geograficamente, obtiveram grupos distintamente separados na análise de variáveis canônicas de medições corporais, atribuindo estes resultados, em conjunto com dados citogenéticos, à especiação alopátrica recente. No presente estudo, os dados morfométricos aproximam as populações para a condição de uma única espécie.

Na contagem de cúspides dentárias, *A. serratus* apresentou uma variação nos dentes do maxilar, de 3 cúspides para 1, enquanto que em *A. laticeps* foram encontrados apenas dentes com 3 cúspides. No entanto, essa variação de 3 cúspides para 1 foi observada em *A. laticeps* por Bertaco (2010).

Haluch e Abilhoa (2005) diferenciaram *A. laticeps* de *A. serratus* pela ausência de ganchos ósseos na nadadeira peitoral de machos. Entretanto, neste trabalho, esta característica foi verificada em indivíduos coletados e foram obtidas informações pessoalmente no Museu de Ictiologia da Universidade Estadual de Maringá, que confirmam que os machos de ambas as espécies apresentam ganchos ósseos nas nadadeiras anal e pélvica, condizendo com os trabalhos de Bertaco (2010), Garavello e Sampaio (2010) e Oliveira (2011b).

A Figura 10 contém um infográfico dos resultados das técnicas de citogenética convencional e molecular, permitindo uma comparação entre as espécies. A descrição cariotípica de *A. serratus* obtida esteve em concordância com o estudo de Kantek (2007; 2009), tendo número diploide de 50 cromossomos, sendo $4m + 24sm + 6st + 16a$, e $NF = 84$, com regiões organizadoras de nucléolos com múltipla localização, e variações intrapopulacionais na localização de heterocromatina. Rosa et al., (2009), realizaram estudos citogenéticos em *A. laticeps*, incluindo descrição cariotípica, padrão de distribuição de heterocromatina, localização de regiões ricas em AT e GC e rDNA 45S; no entanto, comparado ao presente trabalho, apenas foram coincidentes o mesmo número diploide e o mesmo padrão heterocromático em regiões teloméricas.

Os sítios múltiplos de Ag-RONs confirmados pelo rDNA 18S no presente trabalho também foram evidenciados por Tenório et al., (2013), em *A. altiparanae* e *A. xavante*, que também coincidiu com o bandamento de heterocromatina. O padrão heterogêneo de localização dos blocos de heterocromatina, situados nas regiões centroméricas e teloméricas, também foi observado para espécies do gênero *Astyanax* em outros estudos (SANTOS et al., 2012; TENÓRIO et al., 2013; PAIZ et al., 2015).

Agrupamentos de rDNA 45S negativos às Ag-RONs sugerem que estes segmentos de DNA não apresentam atividade de transcrição perceptível pela coloração com prata ou podem representar resquícios não funcionais de segmentos de rDNA 45S (GALETTI; MARTINS, 2004).

A análise citogenética comparativa, apesar de confirmar o mesmo número diploide, a mesma fórmula cariotípica e a mesma localização dos sítios 5S entre as espécies, revelou também marcações heterogêneas na localização e tamanho dos sítios e posição no cromossomo, sendo intraespecíficas para a distribuição dos blocos de heterocromatina em *A.*

serratus e *A. laticeps* e interespecíficas nos blocos heterocromáticos, Ag-RONS e sítios de rDNA 18S.

No estudo de Mantovani et al. (2005), em *A. scabripinnis*, foi detectada acentuada variabilidade cromossômica envolvendo a localização e a quantidade de sítios de rDNA 18S, enquanto que os sítios de rDNA 5S apresentaram-se conservados em diversas populações. Uma condição semelhante também foi evidenciada neste estudo, com variações interespecíficas nas localizações dos sítios de 18S e conservadorismo para os sítios de 5S em ambas as espécies.

Almeida-Toledo et al. (2002), obtiveram estes mesmos resultados em diversas espécies de *Astyanax*, os quais foram associados por Galetti e Martins (2004) à localização dos sítios de rDNA 18S, que geralmente se encontram nas porções terminais dos cromossomos, ficando mais expostos à eventos de transposição e dispersando estes segmentos no genoma, ao passo que o rDNA 5S, localizado nas regiões intersticiais permanece menos suscetível aos eventos de transposição (MANTOVANI, 2005).

O padrão de distribuição intercalar da heterocromatina é reflexo da disposição espacial dos telômeros no núcleo interfásico. A heterocromatina telomérica, muitas vezes associada ao rDNA, pode ser transferida para sítos intersticiais de cromossomos não homólogos que estejam próximos (SCHWEIZER, 1987). Mantovani (2005), associa este padrão de transferência de heterocromatina ao padrão de distribuição menos conservado do rDNA 45S.

As diferenças entre *A. serratus* e *A. laticeps*, compreendendo a variação na localização cromossômica, tamanho de sítios e posição ocupada, nas marcações de rDNA 18S, heterocromatina constitutiva e Ag-RONs também podem indicar a ocorrência de um evento de vicariância, atribuído por Ribeiro (2006) e Artoni (2004) com o atual isolamento geográfico da bacia do rio Iguaçu, pelo Arco de Ponta Grossa na região do Alto Iguaçu e das cataratas do Iguaçu em sua foz, impedindo o fluxo gênico entre *A. serratus* e *A. laticeps*.

Esta hipótese é reforçada pelo padrão biogeográfico para as drenagens costeiras e do planalto cristalino adjacente, determinado por eventos vicariantes recentes, onde há espécies compartilhadas entre as bacias hidrográficas do escudo cristalino e drenagens costeiras. Este padrão ocorre entre bacias do alto rio Tietê, cabeceiras do rio Ribeira de Iguape, e afluentes de terras altas adjacentes da bacia do Paraná, como o rio Iguaçu e Paranapanema (RIBEIRO, 2006).

Na região de cabeceira dos rios Iguaçu, Paranapanema e Ribeira de Iguape, a característica geológica mais interessante é o Arco de Ponta Grossa, cuja atividade tectônica resultou numa dinâmica fluvial acelerada nas drenagens adjacentes, controlando os padrões de

drenagem e acelerando o intercâmbio de fauna entre eles, através de movimentos verticais dos blocos e ação erosiva dos rios, o que possivelmente explica a mistura de fauna entre estes tributários (MENEZES, et al, 2008). A figura 12 ilustra as três bacias hidrográficas que compõem a região sul brasileira, mostrando a separação entre a bacia do rio Paraná das bacias costeiras, onde fica situado o Arco de Ponta Grossa.

Apesar do rio Iguaçu ter sua drenagem voltada para a porção inferior do Rio Paraná, a sua porção superior está claramente relacionada com a bacia do Alto Rio Paraná (Figura 12). Este relacionamento biogeográfico é constatado por semelhanças evidentes entre a fauna do Alto Iguaçu e áreas adjacentes, como Paranapanema (afluente do alto rio Paraná) e Ribeira de Iguape. Estas relações evidenciam a hipótese de que são o resultado de captação de rios de áreas vizinhas, impulsionados pela atividade tectônica do Arco de Ponta Grossa, no período Cenozóico (MENEZES et al, 2008).

Menezes (2008) relacionou padrões filogenéticos com eventos tectônicos nas regiões costeiras do sudeste e sul da América do Sul, para explicar os padrões de distribuição geográfica de *Lophiobrycon*, *Glandulocauda* e *Mimagoniates*. O gênero *Glandulocauda*, com um padrão de distribuição geográfico nas bacias hidrográficas costeiras da região sudeste, foi identificado também no alto rio Iguaçu, representando uma evidência para a hipótese de compartilhamento de fauna.

Outro exemplo para o alto Iguaçu é a presença de *Mimagoniates microlepis*, encontrada anteriormente apenas em drenagens costeiras. Ingenito e Duboc (2014) registraram a presença de espécies típicas da ictiofauna costeira no alto Iguaçu, como *Hyphessobrycon griemi*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon reticulatus*. Também existem relatos de compartilhamento de espécies entre os rios Iguaçu, Ribeira de Iguape e Paranapanema, como *Trichomycterus davisii* (INGENITO; DUBOC; ABILHOA, 2004), *Hypostomus ancistroides* (OYAKAWA; AKAMA; ZANATA; 2005), e *Rhamdiopsis moreirai* (BIZERRILL; LIMA, 2000). Recentemente, Dulz (2015: dados não publicados) evidenciou a presença no rio Iguaçu de *Astyanax ribeirae*, caracterizada até então como endêmica do rio Ribeira de Iguape.

Os eventos fluviais dinâmicos entre sistemas de drenagens adjacentes ao Arco de Ponta Grossa podem ser o resultado de sua atividade tectônica, promovendo a troca faunística entre estes tributários. Esta atividade tectônica resultou na captura de rios costeiros para áreas de altitude no final do Pleistoceno (RIBEIRO, 2006). Movimentos verticais entre blocos das falhas e a ação erosiva dos rios promoveu a mistura entre drenagens adjacentes, e provavelmente explica as trocas de fauna que ocorreram entre as drenagens costeiras, como

Ribeira de Iguape e as terras altas do Iguaçu e rios Paranapanema. O recuo erosivo da margem leste da plataforma do escudo cristalino (Serra do Mar) foi responsável pela transferência de ancestrais de áreas altas para as regiões costeiras. A abertura da bacia do rio Ribeira de Iguape é um exemplo deste processo (MENEZES et al., 2008).

A análise do DNA *barcode* através do gene mitocondrial COI revelou uma divergência interespecífica entre *A. serratus* e *A. laticeps* bem abaixo (0,2%) do valor considerado como limiar para delimitação de espécies (2%). No estudo de Pereira et al. (2013), os valores de divergência nucleotídica do COI entre *A. schubarti* e *A. trierythropterus* ficaram abaixo de 2% e estes valores foram atribuídos a evidências morfológicas que indicam que estes grupos possam constituir apenas uma espécie válida em sinonímia.

Para Pereira et al. (2013), o uso do valor limiar de 2% de divergência genética como valor de corte para a delimitação de espécies foi eficiente em sua pesquisa, na qual 80% das comparações interespecíficas realizadas tiveram valor de divergência acima de 2%. No entanto, valores divergência genética interespecíficos do COI baixos e abaixo dos 2% usualmente empregados, podem indicar grupos com radiação recente, ou taxas evolutivas diferenciadas neste gene dentro de grupos taxonômicos (HEBERT et al., 2003; PEREIRA et al., 2013). Nestes casos, deve haver precaução ao estabelecer este valor de corte, pois o mesmo pode desviar a real diversidade do grupo e há a necessidade de uma análise integrativa de forma a validar o resultado do DNA *barcode*, o que foi realizado neste trabalho, com a inserção de análise morfológica e citogenética.

O dendograma de Neighbor-Joining (Figura 11), elaborado com base na distância genética entre os indivíduos, aproximou a espécie *A. fasciatus* de *A. serratus* e *A. laticeps*, enquanto que *A. scabripinnis* se distanciou, enraizando o dendograma, entretanto, *A. serratus* e *A. laticeps* fazem parte do complexo de espécies de *A. scabripinnis*, enquanto que *A. fasciatus* forma outro complexo de espécies dentro do gênero *Astyanax*. Esta condição pode ser explicada devido à dois fatores característicos do gênero *Astyanax*: ausência de evidências de monofiletismo (REIS, KULLANDER E FERRARIS, 2003), e a convergência morfológica (WILKENS; STRECKER, 2003; PROTAS et al., 2006), que dificultam a taxonomia e o agrupamento em complexos de espécies baseando-se apenas em caracteres morfológicos.

Os resultados da caracterização morfológica, análise morfométrica, estrutura cromossômica, localização dos sítios de rDNA 5S e do *barcode* sugerem fortemente a sinonímia entre *A. serratus* e *A. laticeps*, entretanto, as variações interespecíficas no padrão de heterocromatina, nos sítios de rDNA 18S e das Ag-RONS, apesar de serem comuns neste gênero, podem indicar o início de um processo de vicariância, no qual as diferenças

encontradas podem ser resultado do acúmulo de mutações devido à restrição de fluxo gênico entre as populações pelo atual isolamento geográfico entre as bacias hidrográficas do rio Iguaçu e bacias litorâneas adjacentes.

A eficácia das técnicas utilizadas pode ser observada neste caso, e com a evidência da variação individual nos marcadores cromossômicos, a análise morfológica, a descrição cariotípica e o sequenciamento do COI foram essenciais na determinação dos resultados.

Tabela 2: Contagem de raios das nadadeiras e de escamas (R = raios ramificados; NR = raios não - ramificados).

	<i>A. laticeps</i>		<i>A. serratus</i>	
Raios das nadadeiras				
	R	NR	R	NR
Dorsal	2	8 a 9	2 a 3	8 a 9
Anal	3 a 4	16 a 23	3 a 4	16 a 19
Peitoral	1	11 a 12	1	11 a 13
Pélvica	1	6 a 7	1	7
Escamas				
Linha lateral	37 a 38		36 a 38	
Acima da linha lateral	6 a 8		6 a 7	
Abaixo da linha lateral	5 a 7		5 a 6	
Pré-dorsal	11 a 14		11 a 13	
Pedúnculo caudal	17 a 19		17 a 19	

Tabela 3: Medidas em proporções em relação ao comprimento do corpo e ao comprimento da cabeça. Valores obtidos em mm.

	<i>A. serratus</i> (n=20)			<i>A. laticeps</i> (n=14)			<i>A. laticeps</i> Bertaco (2010)		<i>A. serratus</i> Garavello e Sampaio (2010)	
	Intervalo	Média	DP	Intervalo	Média	DP	Intervalo		Intervalo	
Comprimento padrão	64,07 - 91,40	74,05	2,04	39,64 - 96,90	67,81	3,66	36,40 - 109,70		46,50 - 124,10	
Porcentagens do comprimento padrão										
Comprimento pré-dorsal	47,93 - 56,28	50,75	1,85	42,28 - 52,81	49,88	2,79	49,40 - 58,00		49,00 - 54,50	
Comprimento pré ventral	46,64 - 56,07	49,54	2,06	44,46 - 50,73	47,97	1,79	43,90 - 52,70		-	-
Comprimento pré peitoral	25,76 - 34,23	29,39	2,03	24,41 - 32,39	29,01	2,06	23,50 - 31,10		-	-
Comprimento pré anal	66,09 - 77,01	69,29	2,49	50,23 - 72,09	66,74	5,29	61,40 - 72,70		-	-
Altura do corpo	31,01 - 38,39	32,86	1,85	26,06 - 35,65	31,41	2,19	30,50 - 39,90		34,20 - 39,70	
Altura do pedúnculo caudal	11,07 - 14,75	12,05	0,78	10,39 - 11,96	11,34	0,45	10,00 - 13,70		-	-
Comprimento do pedúnculo caudal	12,38 - 16,33	14,15	1,09	10,51 - 14,46	12,41	1,10	11,70 - 16,70		-	-
Comprimento da nadadeira dorsal	22,58 - 25,35	23,68	0,84	23,31 - 27,50	25,03	1,36	20,00 - 28,20		-	-
Comprimento da nadadeira ventral	14,19 - 19,22	16,26	1,17	13,64 - 18,22	15,96	1,27	14,30 - 21,80		14,50 - 18,70	
Comprimento da nadadeira peitoral	18,33 - 23,29	19,74	1,20	19,01 - 23,10	20,90	1,26	17,80 - 24,80		16,90 - 21,70	
Comprimento da nadadeira anal	14,87 - 20,09	17,77	1,14	15,67 - 20,10	17,92	1,44	-	-	-	-
Base da nadadeira anal	19,59 - 29,94	23,20	9,06	21,03 - 27,66	25,15	1,66	20,80 - 30,10		-	-
Distância do olho até a nadadeira dorsal	36,59 - 50,63	39,55	3,04	34,86 - 51,80	38,27	4,08	-	-	-	-
Distância da nadadeira peitoral até a ventral	18,91 - 25,99	21,76	1,92	17,17 - 23,59	20,67	1,59	-	-	-	-
Distância da nadadeira ventral até a anal	18,69 - 22,82	20,95	1,29	19,12 - 27,65	21,65	2,51	-	-	-	-
Comprimento da cabeça	23,32 - 29,32	26,30	1,50	23,48 - 29,21	26,05	1,42	23,40 - 31,70		20,20 - 28,80	
Porcentagens do comprimento da cabeça										
Comprimento do focinho	23,51 - 30,75	27,05	2,00	22,22 - 27,32	25,19	1,62	18,90 - 34,90		21,20 - 28,30	
Comprimento do maxilar superior	41,70 - 51,80	45,26	2,44	40,30 - 48,61	45,57	2,83	37,00 - 49,50		43,90 - 48,90	
Diâmetro orbital	25,61 - 39,49	31,03	3,37	32,58 - 44,36	37,10	3,18	25,00 - 38,70		24,10 - 36,40	
Distância interorbital	32,57 - 42,93	37,51	3,24	32,64 - 40,50	36,29	2,17	26,80 - 40,20		35,00 - 43,90	

Tabela 4: Valores de divergência genética do COI com base no método K2P em cinco espécies de *Astyanax*.

	<i>A. laticeps</i>	<i>A. serratus</i>	<i>A. scabripinnis</i>	<i>A. paranae</i>	<i>A. fasciatus</i>
<i>A. laticeps</i>	0,00 %				
<i>A. serratus</i>	0,20 %	0,00 %			
<i>A. scabripinnis</i>	20,4 %	20,7 %	0,00 %		
<i>A. paranae</i>	3,70 %	3,90 %	22,1 %	0,90 %	
<i>A. fasciatus</i>	5,60 %	5,80 %	22,6 %	3,10 %	0,71 %

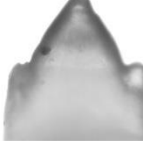
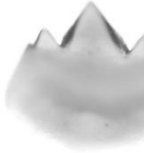
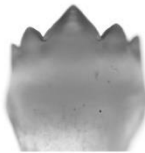
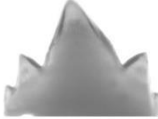
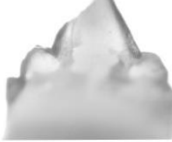
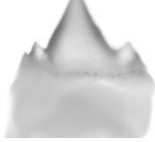
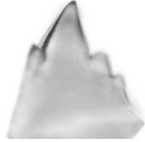
	<i>Sinfisiano</i>		<i>Lateral</i>	
	<i>Astyanax laticeps</i>	<i>Astyanax serratus</i>	<i>Astyanax laticeps</i>	<i>Astyanax serratus</i>
Pré-maxilar Série externa <i>A. laticeps</i> : 3 a 5 dentes <i>A. serratus</i> : 3 a 4 dentes	A 3 cúspides 	B 3 cúspides 	C 3 cúspides 	D 3 cúspides 
Pré-maxilar Série interna <i>A. laticeps</i> : 5 dentes <i>A. serratus</i> : 5 dentes	E 5 a 3 cúspides 	F 5 a 3 cúspides 	G 5 a 3 cúspides 	H 5 a 3 cúspides 
Dentário <i>A. laticeps</i> 4 dentes <i>A. serratus</i> 4 a 5 dentes	I 5 a 4 cúspides 	J 5 a 3 cúspides 	K 5 a 3 cúspides 	L 5 a 3 cúspides 
Maxilar <i>A. laticeps</i> 0 a 2 dentes <i>A. serratus</i> 0 a 2 dentes	M <i>A. laticeps</i> - 3 cúspides 		N <i>A. serratus</i> - 3 a 1 cúspides 	

Figura 6: Número de dentes e de cúspides. Cúspides de dentes sinfisianos e laterais das séries externa e interna do pré-maxilar, dentário e maxilar de *A. laticeps* e *A. serratus*. Barra = 10 µm.

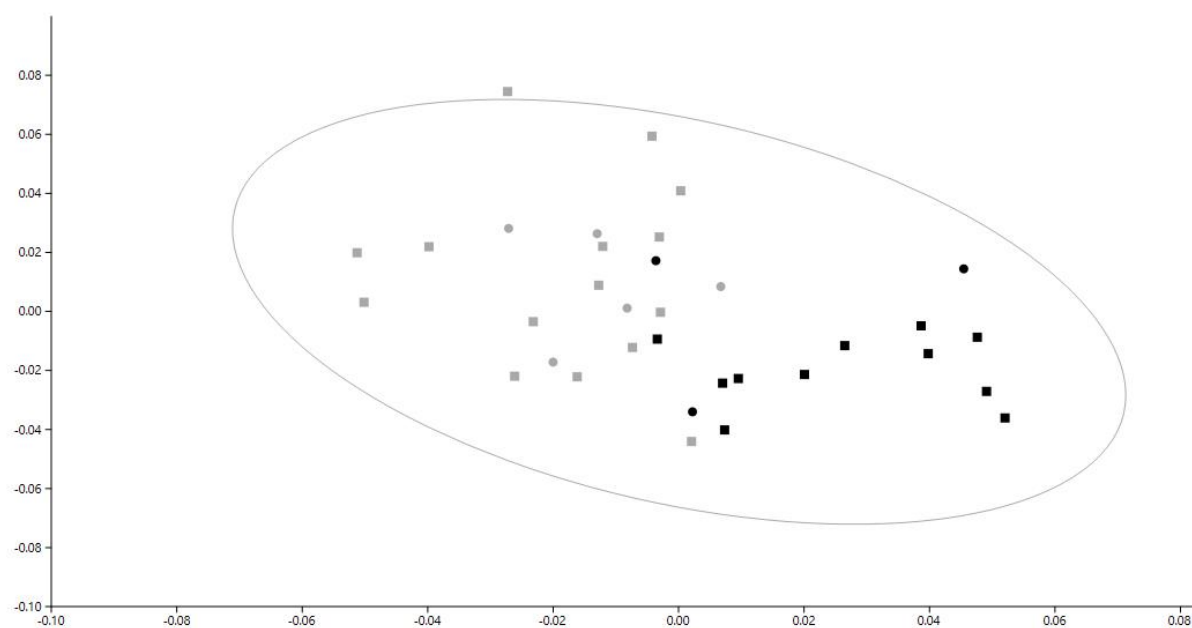


Figura 7: Gráfico de projeção individual da análise de variáveis canônicas livres de tamanho de *A. serratus* (cinza) e *A. laticeps* (preto). Os machos estão representados pelos círculos e as fêmeas por quadrados.

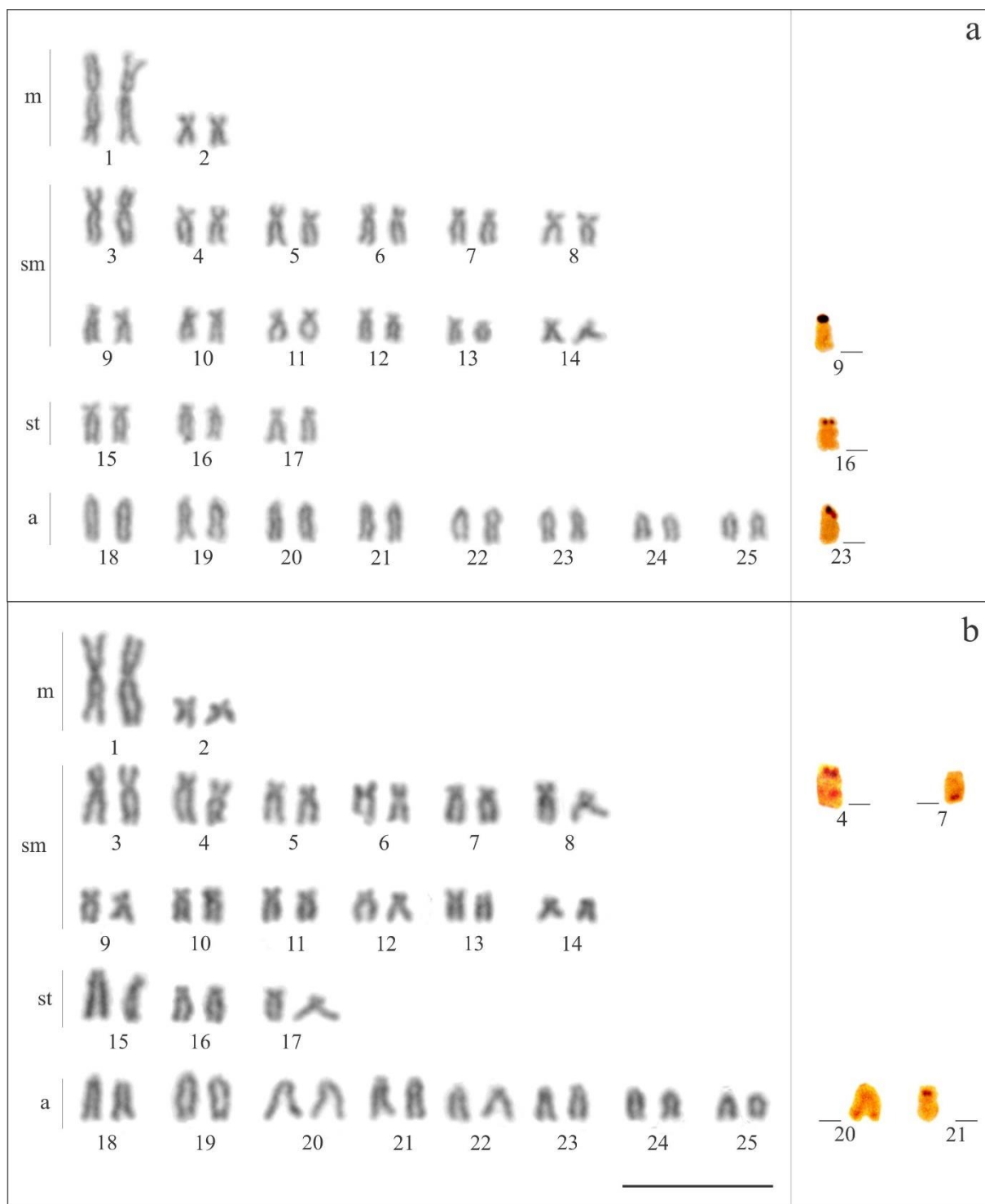


Figura 8: Cariótipos de *A. laticeps* (a) e *A. serratus* (b) elaborados com coloração convencional (Giemsa) com destaque (à direita) para os cromossomos marcados com Ag-RONs. Barra = 10μm.

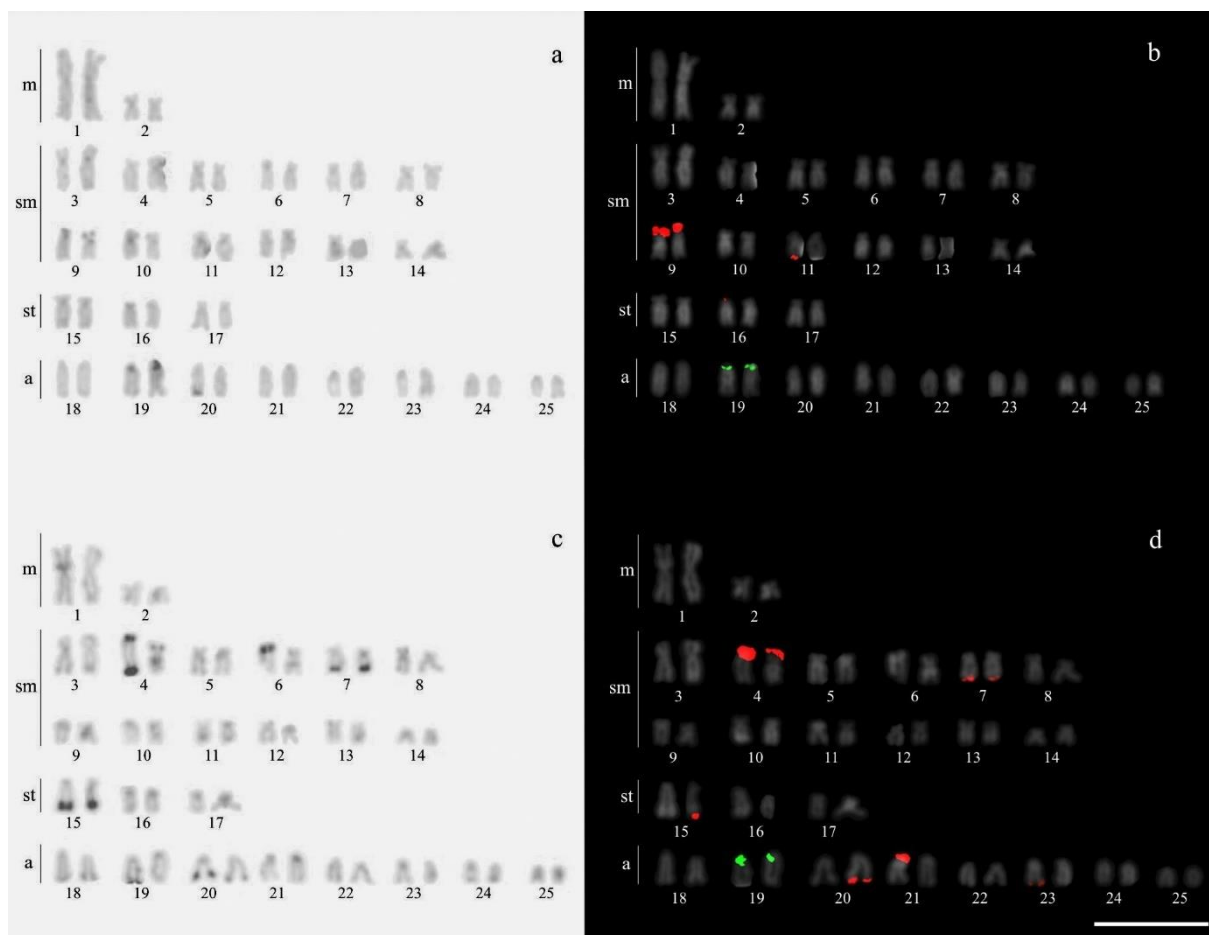


Figura 9: Marcações de heterocromatina constitutiva (à esquerda) através de bandamento C (coloração com iodeto de propídio, apresentada em tons de cinza) e localização com marcadores cromossômicos (à direita) de rDNA 5S (verde) e 18S (vermelho) em *A. laticeps* (a e b) e *A. serratus* (c e d). Barra = 10 μm.

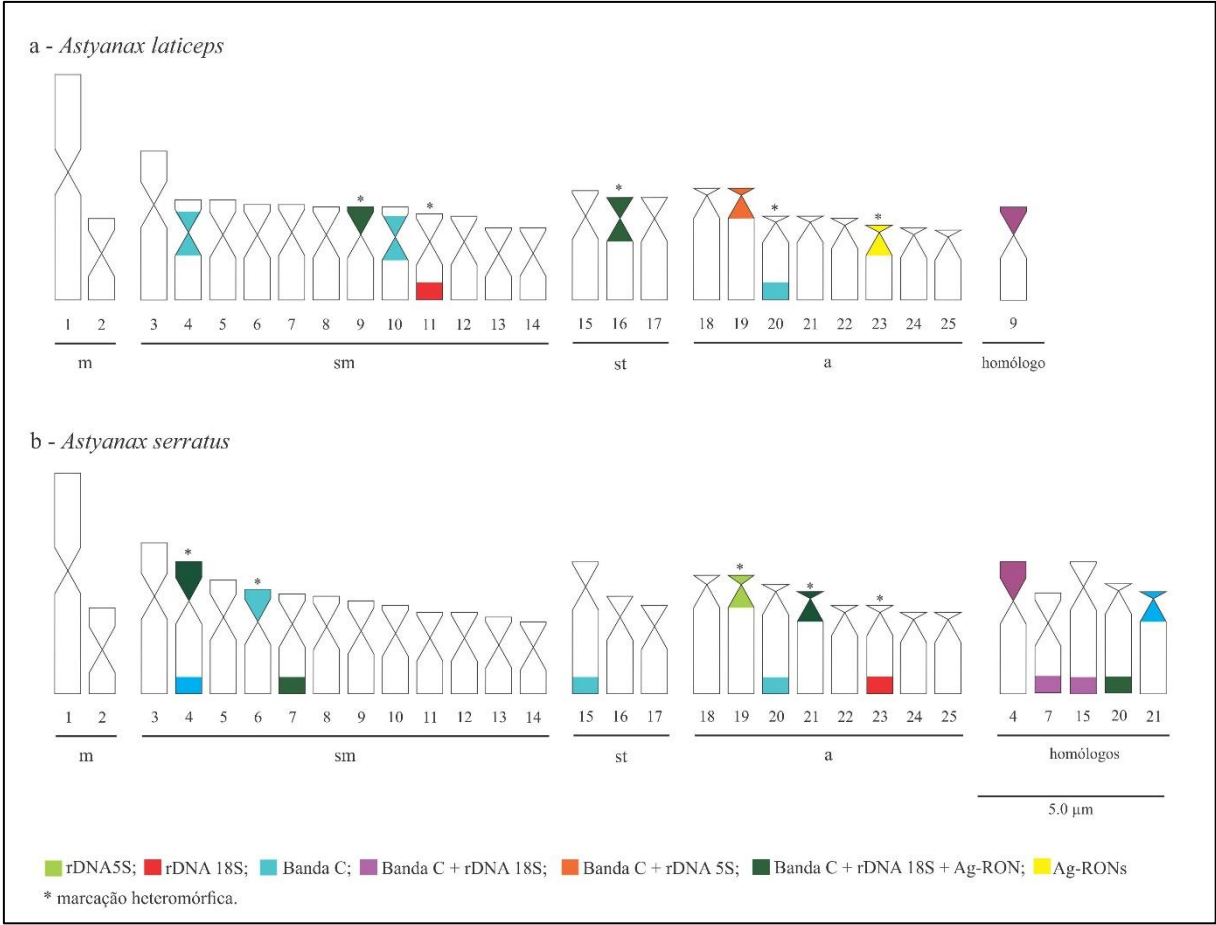


Figura 10: Ideograma representando as marcações de rDNA 5S e 18S, bandamento C e Ag-RONs em *A. laticeps* (a) e *A. serratus* (b).

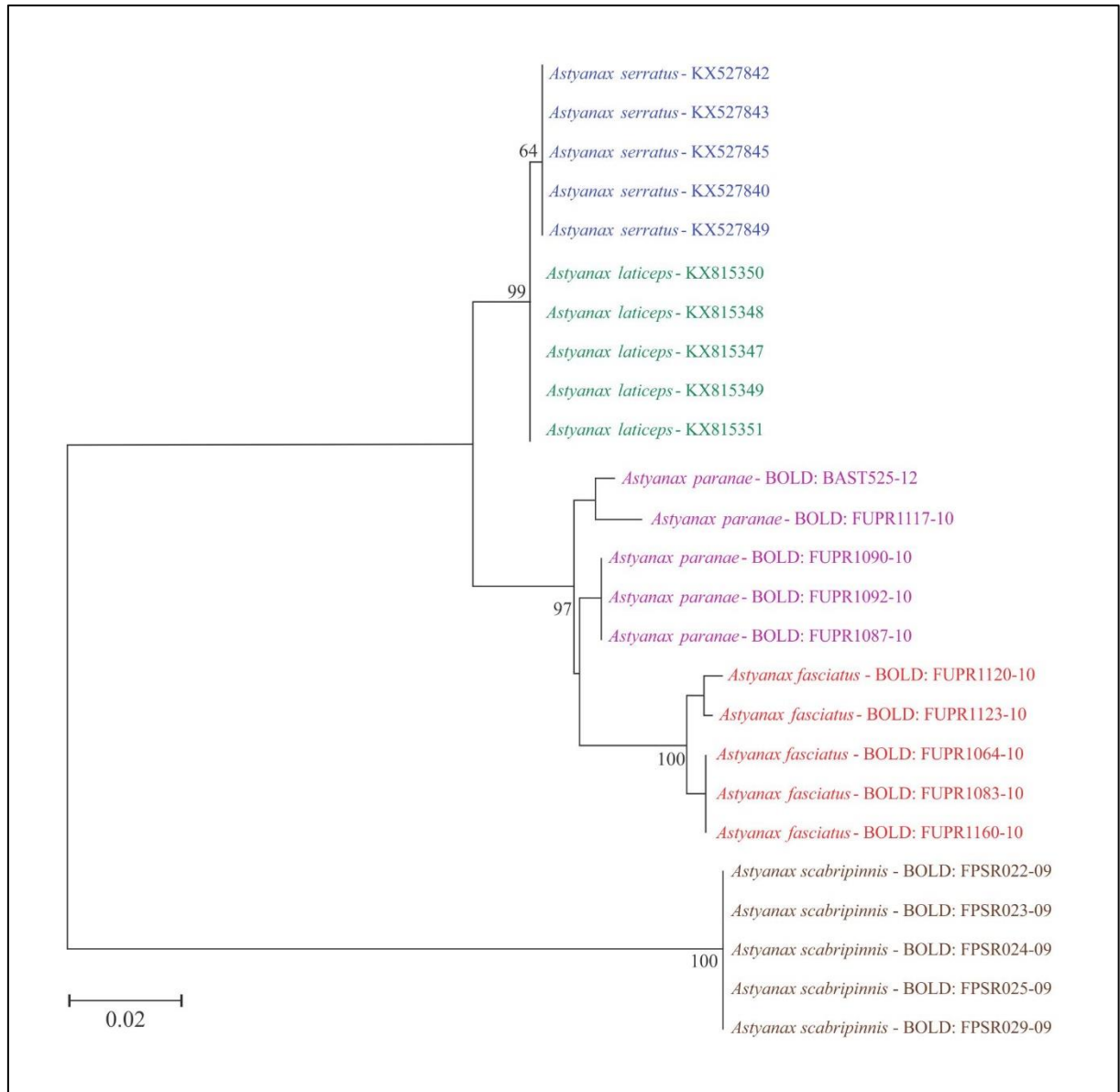


Figura 11: Dendrograma de Neighbor-Joining, mostrando as espécies *A. serratus* (população do rio Pintado, bacia do Rio Iguaçu) e *A. laticeps* (população do riacho Itaiacoca, bacia do Rio Ribeira do Iguape), analisadas juntamente com os grupos externos. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições de bases.

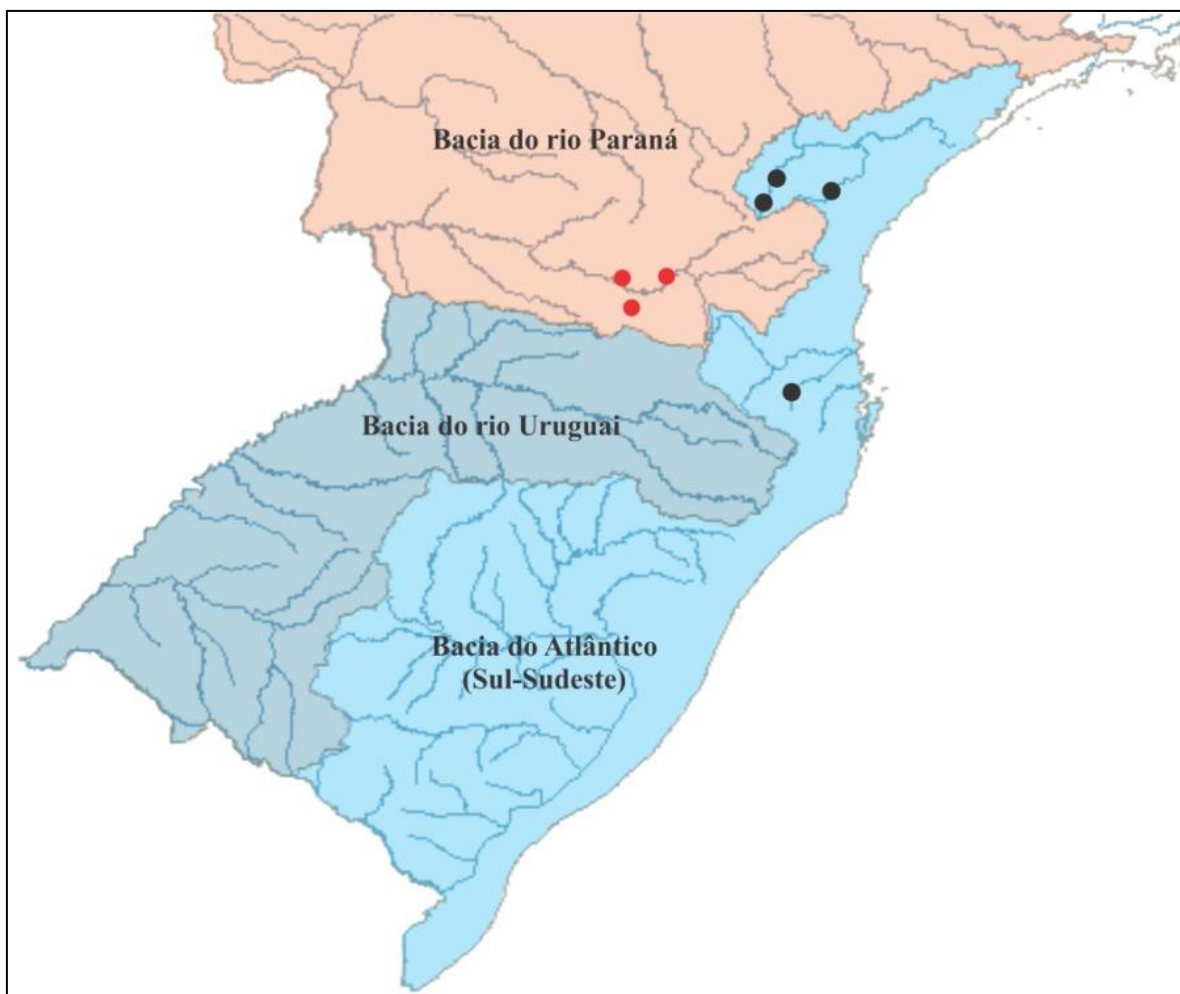


Figura 12: Representação da localização das bacias hidrográficas de ocorrência de *A. laticeps* (bacia do rio Uruguai e do Atlântico Sul-Sudeste) e *A. serratus* (bacia do rio Paraná). Os pontos pretos indicam os locais de coleta de *A. laticeps* e os vermelhos de *A. serratus*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foram integradas técnicas de análise morfológica, citogenética, genética molecular, incluindo marcadores cromossômicos e utilização de DNA *barcode* para comparação entre as espécies *A. laticeps* e *A. serratus*.

A análise morfológica revelou alta similaridade nas proporções corporais, duas séries de dentes no pré-maxilar, sendo os da série externa tricuspidados, e da série interna variando de 5 a 3 cúspides, maxilar com 0 a 2 dentes, com variação de 3 cúspides para 1 e dentário com dentes penta a tricuspidados. Ambas as espécies apresentam uma mancha umeral preta ovalada, com um estreito prolongamento anteroventral.

A citogenética revelou mesmo número diploide, mesma fórmula cariotípica e mesmo número fundamental, com destaque para o primeiro par cromossômico de porte destacadamente maior que os demais do complemento, sem diferenciação morfológica de cromossomos sexuais.

O bandamento C revelou variações intrapopulacionais e interespecíficas na localização dos sítios de heterocromatina entre *A. serratus* e *A. laticeps*, sendo que grande parte dos sítios foram localizados nas regiões teloméricas dos cromossomos, e na maioria dos casos foram coincidentes com os sítios de DNA ribossomal e Ag-RONs.

As Ag-RONs apresentaram-se múltiplas, sendo a maioria coincidentes com os sítios de rDNA 18S. Foram encontradas variações entre as duas espécies estudadas.

Os marcadores rDNA 18S foram variáveis quanto ao número, tamanho e localização dos sítios nos cromossomos quando comparados entre *A. serratus* e *A. laticeps*, situados em regiões teloméricas e centroméricas. Este padrão não foi observado para o rDNA 5S, que se mostrou conservado e localizado no par 19 em ambas as espécies.

A análise das sequências do COI demonstrou divergência intraespecífica de 0%, e interespecífica de 0,2%, valores abaixo do considerado limiar para a delimitação de espécies diferentes em peixes (2%).

Os resultados morfológicos, da estrutura cromossômica e do *barcode* demonstram fortes evidências para a sinonímia entre *A. serratus* e *A. laticeps*, como uma única unidade evolutiva e ampliam a distribuição geográfica de *A. laticeps* para o Rio Iguaçu, explicada pela hipótese de compartilhamento de fauna devido à movimentos tectônicos e captura de cabeceiras de rios no escudo cristalino.

As variações no padrão de heterocromatina, nos sítios de rDNA 18S e Ag-RONs são comuns no gênero *Astyanax*, e são resultado de eventos não robertsonianos, devido a

localização destes sítios. No entanto, as variações interespecíficas também podem indicar que *A. serratus* está submetida a eventos de vicariância e alopatria, devido ao seu atual isolamento geográfico restringir o fluxo gênico com populações de bacias litorâneas.

Estas evidências reforçam a necessidade de realizar coletas nas bacias do alto rio Paraná, como rio Tibagi e Paranapanema, a fim de identificar a ocorrência de *A. laticeps* nestes tributários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L. F. A new species of freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the Iguazu basin, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v.1587, p.43-52, 2007.
- ALCARAZ, H. S. V.; PAVANELLI, C. S.; BERTACO, V. A. *Astyanax jordanensis* (Ostariophysi, Characidae), a new species from the rio Iguazu basin, Paraná, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.2, p. 185-190, 2009.
- ALMEIDA, F. F. M.; CARNEIRO, C. D. R. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências**, 28(2), 135–150, 1998.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Research**, v.97, p. 229-233, 2002.
- ALMIRÓN, A. D.; AZPELICUETA, M. L. M.; CASCIOITTA, J. R., *Astyanax ita* sp. n., a new species from the Rio Iguazú basin, in Argentina (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum**, v.52, p. 3-10, 2002.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. **Biological and Health Sciences**, v.6, n.1, p.43-60, 2000.
- ARTONI, R. F. et al. Cytogenetics of two sympatric *Corydoras* species (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) of southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.1, n.1b, p. 191-198, 2004.
- ARTONI, R. F. et al. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from south Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.19, n. 3, p.393-401, 2009.
- AVISE, J. C. Molecular Markers, **Natural History and Evolution**. New York, NY: Chapman e Hall, 1994.
- AVISE, J. C.; WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. **Proc. Natl Acad. Sci**, USA 96, 992–995, 1999.
- AZPELICUETA, M. M.; GARCÍA, J. O.: A new species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from Uruguay river basin in Argentina, with remarks on hook presence in Characidae. **Revue Suisse de Zoologie**, 107(2): 245–257, 2000.
- AZPELICUETA, M. M.; LOUREIRO, M.: *Astyanax laticeps* (Teleostei: Characiformes: Characidae) from rivers and streams of Uruguay. **Vertebrate Zoology**, 59(1): 3-9, 2009.

AZPELICUETA, M. M.; CASCIOTA, J. R.; ALMIRÓN, A. E. Two new species of the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Paraná river basin in Argentina. **Revue Suisse de Zoologie**, 109: 243-259, 2002.

BAIRD, S. F.; GIRARD, C. F. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U.S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U. S. A. **Proc. Nat. Acad. Sci.**: 24-29, 1854.

BAUMGARTNER, G., et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**, Maringá: Eduem, 203p., 2012.

BELLAFRONTE, E. et al. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 497-506, 2013.

BERTACO, V. A., CARVALHO, F. R.; JEREP, F. C. *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 8: 265-275, 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**, 4(1): 53-60, 2006.

BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 8(1), 7-20, 2010.

BERTACO, V. A.; L. R. MALABARBA. Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the “*A. scabripinnis* species complex”. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 12: 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, n.2, p. 103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. Cytogenetics and taxonomy: consideration baseado n chromosome studies of freshwater fish. **Journal Fish Biology**, v.28, p. 153-159, 1986.

BIZERRIL, C. R. S. F.; LIMA, N. R. W. Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, 22(1): 103–110, 2000.

CARAMASCHI, M. Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e Paranapanema junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). **Universidade de São Carlos São Carlos**, SP, 1986.

CARVALHO, D. C.; et al. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin. **Mitochondrial DNA**, 22(1):1–7, 2011.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Description of a ZZ/ZW sex chromosome in *Thoracocharax cf. stellatus* (Teleostei Characiformes, Gasteropelecidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.2, p.299-303, 2002.

CASTRO, J. P.; et al.: Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 12(2): 429-438, 2014.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, 371: 215-220, 1994.

COX, K.G. The role of mantle plumes in the development of continental drainage patterns. **Nature**, 342, 873–876, 1989.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v.54, n.3, p. 209-215, 2001.

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

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

DOBLER, S.; MULLER, K. Resolving phylogeny at the family level by mitochondrial cytochrome oxidase sequence: phylogeny of carrion beetles (Coleoptera, Silphidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 309-402, 2000.

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

DOYLE J. J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1990.

DULZ, T. A. Diversidade cariotípica em espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae) ocorrentes no médio rio Iguaçu. Dissertação de mestrado. **UEPG: Universidade Estadual de Ponta Grossa**. 2015.

EIGENMANN, C. H. Zoölogical results of the Thayer Brazilian Expedition - preliminary descriptions of new genera and species of Tetragonopterid Characins. **Bulletin of Museum Comparative Zoology**, 52(6): 93-106, 1908.

EIGENMANN, C. H. Catalogue of fresh-water fishes of tropical and South temperate America. **Reports of the Princeton University Expedition to Patagonia, 1896-1899**. 3(4): 375-511, 1910.

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

EIGENMANN, C. H. Some results from studies of South American fishes. IV. New genera and species of South American fishes. **Indiana University Studies**, 20: 44-48, 1914.

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

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

ESCHMEYER, W. N.; FONG, R. (Eds.). 2015. Catalog of Fishes, California Academy of Sciences. Disponível em: <
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> >
acesso em: 15 out. 2015.

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.

FINK, W. L.; S. H. WEITZMAN. The so-called cheirodontin fishes of Central America with description of two new species (Pisces, Characidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 172: 1-46, 1974.

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

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia** 6: 1-204. Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, SP Brasil, 1948.

GALETTI, P. M.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v.47, p. 289-298, 1994.

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

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

GARCIA, C. P. O.; DOMINGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird e Girard (1854) (Actynopterigii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, 8:340, 2008.

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

GARUTTI, V.; F. LANGEANI. Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 7(3): 377-383, 2009.

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

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

GUERRA, M. Fish. Conceitos e aplicações na citogenética. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 2004.

HAJIBABAEI, M. et al. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BMC Biology**, v. 5, p. 1-15, 2007.

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

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

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings the Royal Society B**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HENSEL, R. Beiträge zur Kenntniss der Wirbelthiere Süd brasiliens. Fortsetzung. **Archiv für Naturgeschichte**. 36(1):50-91, 1870.

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

HUBERT N.; et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS One**. 3: e2490, 2008.

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

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

JENYNS, L. Fish. Pp. 1-172. In: C. Darwin (ed.). The zoology of the voyage of H. M. S. Beagle, under the command of Captain Fitzroy, R. N., during the years 1832 to 1836. London. **Smith, Elder e Co.**1842.

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

KANTEK, D. L. Z. et al. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**, v.75, p. 408–421, 2009.

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

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

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proc. R. Soc. Lond. B** 265, 2257–2263, 1988.

KUMAR S., GADAGKAR, S. R. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, p. 544-553, 2000.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. Numerical Ecology. 2nd English ed. **Elsevier**, 853 pp, 1998.

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

LUCENA, C. A. S.; BERTACO, V. A.; BERBIGIER, G. A new species of *Astyanax* from headwater streams of southern Brazil (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, V.: 3700, ed.: 2, pg.: 226-236, 2013.

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

MAACK, R. Geografia física do Estado do Paraná. Curitiba: **IBPT**. p 350. 1968.

MABRAGAÑA, E.; ASTARLOA, J. M. D.; HANNER, R.; ZHANG, J.; CASTRO, M. G. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. **PLoS One**: 6: e28655, 2011.

MAISTRO, E. L. et al. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and Simultaneous occurrence of Macro B-Chromosomes. **Caryologia**, V.47, P. 233-239, 1994.

MALABARBA, L. R. et al. Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí. **Ed. Via Sapiens**, Porto Alegre, 2013.

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

MARENT, B.; et al. Contribuições para a evolução do relevo da Serra do Mar no estado do Paraná-Brasil, através da utilização do isótopo cosmogênico ¹⁰Be. Anais: Geocronologia e evolução da paisagem. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**: 2012. Disponível em: <http://www.sinageo.org.br/2012/trabalhos/7/7-84-230.html>

MARTINEZ, J. L. et al. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla Anguilla*) **Cytogenet. Cell Genet.**, 73: 149-152, 1996.

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

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

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

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

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei: Characiformes: Characidae). Unpublished Ph.D. **Dissertation**. Museu Nacional, UFRJ, 2005.

MENEZES, N. A. et al. Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. **Zootaxa**, 1726: 33-48, 2008.

MENEZES, N. A.; S. H. WEITZMAN. Two new species of Mimagoniates (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 103: 380-426, 1990.

MILLER, E. A. et al. Supression of human nucleolus organizer activity in mouse human somatic hybrid cells. **Expl. Cell. Res.**, v. 101, p. 235-243, 1976.

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

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

MORAN, P. et al., Sex linkage of 5s rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenet. Cell Genet**, 75:145-150, 1996.

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

MOREIRA-FILHO O.; GAVARELLO J. C. Estudos de cúspides dentárias de seis espécies de Parodontidae e sua aplicação na sistemática desta família (Pisces, Characiformes). In: **Congresso Brasileiro de Zoologia**, XX, 1994, Rio de Janeiro. Resumo, Rio de Janeiro, p. 88, 1994.

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

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

OLIVEIRA, C. A. M. Estudo taxonômico de *Astyanax* Baird e Girard, 1854 e *Deuterodon* Eigenmann, 1907 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de três bacias hidrográficas do Estado do Paraná. Dissertação de mestrado. **Ciências Ambientais**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011b.

OLIVEIRA, C. A. M.; ABILHOA, V.; PAVANELLI, C. S. *Astyanax guaricana* (Ostariophysi: Characidae), a new species from the rio Cubatao drainage, Parana State, Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**. V.: 11, ed.: 2, pg.: 291-296, 2013.

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

PAIZ, M. L.; et al. Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics of the genus. **Comparative Cytogenetics**. 9(1): 54-65, 2015.

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

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

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

PAZZA, R.; et al. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) - a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**. V.: 72, ed.: 8, pg.: 2002-2010, 2008.

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

PEREIRA, L. H. G; et al. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, 22(1):71-79, 2011a.

PEREIRA, L. H. G; et al. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**: 22(1):87-96, 2011b.

PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, 14:20, 2013.

PETRI, S.; FÚLVARO, V.J. Geologia do Brasil. São Paulo, **Edusp**, 631p, 1983.

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

POTTER, P.E. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. **Journal of South American Earth Sciences**, 10(5-6), 331-344, 1997.

PROTAS, M. E., et al. Genetics analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution albinism. **Nat. Genet.**, 38(1): 107-111, 2006.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, Porto Alegre: Edipucs, 2003.

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

RICCOMINI, C.; ASSUMPÇÃO, M. Quaternary tectonics in Brazil. **Episodes**, 22(3): 221–225, 1999.

ROSA, R., et. al. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, 7(4): 601-605, 2009.

ROSSO, J. J.; DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**, 12, 999–1011, 2012.

SAADI, A.: Neotectônica da plataforma brasileira: esboço e interpretações preliminares. **Geonomos** 1(1):1–15, 1993.

SAADI, A. et al. Map and database of Quaternary, faults and lineaments in Brazil. U.S. **Geological Survey**, Open File Report 02-230, 2002.

SAADI, A. et al. Neotectônica da Plataforma Brasileira. Pp. 211 – 234. In: Souza, C. R. G., Suguio, K., Oliveira, A. M. S. e Oliveira, P.E. (Eds.). **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto, Holos, 378p, 2005.

SAITOU, N. M.; NEI, M.: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4, 406–425, 1987.

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

SANTOS, N. M. et al., A comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). **Zoologia**, 29 (20): 159-166, 2012.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes today**, v.9, 1987.

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

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction “primers”. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SUGUIO, K. Geologia do Quaternário e mudanças ambientais: (passado + presente = futuro?). **Paulo's comunicações e artes gráficas**, São Paulo, 366 pp, 2001.

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

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

TAGLIACOLLO, V. A. et al. *Astyanax pirapuan*: a new characid species from the upper Rio Paraguay system, Mato Grosso, Central Brazil (Characiformes, Characidae). **Zootaxa**, ed. 2749, pg 40-46, 2011.

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

TOFFOLI, D., et al. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). **Genet. Mol. Biol.**, vol.31, n.1, suppl., pp. 324-336, 2008.

TRIQUES, M. L., V. VONO; E. V. CAIAFA. *Astyanax turmalinensis*, a new species from the Rio Jequitinhonha basin, Minas Gerais, Brazil (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae). *Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 7(4): 145-150, 2003.

VICARI, M. R. et al. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic Genome Research**, 122:67-72, 2008.

WARD, R. D. et al. Barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 360, 1847–1857, 2005.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, 74,329–356, 2009.

WILKENS, H.; STRECKER, U. Convergent evolution of the cavefish *Astyanax* (Characidae, Teleostei): genetic evidence from reduced eye-size and pigmentation. **Biol. J. Linn. Soc.**, 80(4): 545-554, 2003.

ZANATA, A. M.; CAMELIER, P. Two new species of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) from upper rio Paraguacu and rio Itapicuru basins, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, 1175-5326, pag: 28-40, 2008.

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

ANEXOS

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



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Táxons autorizados

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2

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



PARECER Nº 02/2008
Protocolo: 04509/08

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

Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.

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

.....
Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus

Coordenador substituto da SCEEa

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

Todos os exemplares foram anestesiados antes de sofrerem eutanásia, através da administração de óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000).

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

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

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

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

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

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

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

8. Repetir o passo 7 mais duas vezes.

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

7. Repetir o passo 6 mais duas vezes.

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

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

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

Todos os exemplares foram anestesiados antes de sofrerem eutanásia, através da administração de óleo de cravo (GRIFFTHS, 2000).

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

PREPARO DE LÂMINAS

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

- 1- Pingar de uma a três gotas de suspensão celular sobre uma lâmina recém lavada e escaldada com água à 60°C, permitindo que o excesso de material escorra sobre papel absorvente.
- 2- Colocar as lâminas em um suporte, para que sequem em temperatura ambiente.

3- Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), pH= 6,8, por 7 a 10 minutos.

4- Lavar as lâminas com água destilada e secar naturalmente.

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

1- Incubar a lâmina em solução de HCl 0,2N à 42°C por aproximadamente 10 min.

2- Lavar em água corrente e deixar secar.

3- Colocar a lâmina em solução aquosa de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 5% recém preparado durante 2 a 3 min em temperatura ambiente.

4- Mergulhar três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar.

5- Incubar a lâmina em solução salina 2xSSC (pH=6,8) à 60°C por aproximadamente 45 min.

6- Lavar em água corrente e deixar secar.

7- Corar as lâminas com iodeto de propídio, em uma proporção de 50 µg/mL diluído em 200 µL “antifade” (1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid) e cobri-las com uma lamínula.

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

1- Colocar sobre uma lâmina previamente preparada duas ou três gotas de solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina incolor + 50 mL de H_2O + 0,5 mL de ácido fórmico).

2- Adicionar sobre cada gota de gelatina uma gota de água destilada e 2 gotas de AgNO_3 50%3- Cobrir com lamínula e colocar em estufa á 60°C durante três a seis minutos.

4- Lavar em água corrente, retirando a lamínula.

5- Secar a lâmina e observar ao microscópio de campo claro.

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

Preparações das sondas

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

Tratamento com RNase

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

Tratamento com Pepsina

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

Fixação

- 8- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1X / 50mM MgCl₂ 50mM durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- 9- Lavar em PBS 1X por 5 minutos, com agitação.
- 10- Desidratar das lâminas em série de alcoólica (70%, 85% e 100%) por 3 minutos e secá-las ao ar livre.

Pré-hibridação

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

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

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

Hibridação

14- Preparar a câmara úmida 37°C.

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

Lavagens (Segundo dia)

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

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

Bloqueio

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

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

Deteção de duas sondas DOUBLE FISH

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

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

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

Montagem das lâminas com DAPI

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

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

Anexo 8: ESTUDOS CARIOTÍPICOS (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964)

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

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

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (*m*);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (*sm*);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (*st*);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (*a*).

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

Anexo 9 - EXTRAÇÃO DOS DENTES

A extração dos dentes foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994). Com auxílio de estereomicroscópio e uma agulha hipodérmica foram retirados os dentes sinfiseanos e laterais dos exemplares de *Astyanax* em análise. Cada dente foi colocado em lâmina escavada contendo hipoclorito de sódio 2,5%. Logo a seguir foi transferido para outra cavidade da lâmina contendo peróxido de hidrogênio em solução 10%, permanecendo por 3 minutos. Posteriormente, os dentes foram armazenados em álcool 70 v/v por 10 dias. Os dentes foram então fotografados em microscópio de campo claro (Olympus BX41) em aumento 40x.

Anexo 10 - EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico e mitocondrial foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990).

- 1- Retirar um pequeno pedaço (15 mm³) do fígado ou músculo do animal, picotar e colocar em um microtubo;
- 2- Adicionar 360µl de tampão (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, TRIS-HCl 1 M) sem CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio);
- 3- Acrescentar 13 µl de proteinase K (10 mg/mL), 5 µl de β-mercaptoetanol e 240 µl de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) 5% cristalizado;
- 4- Incubar em banho-maria à 55°C, até digerir totalmente o tecido;
- 5- Após digerir totalmente o tecido, adicionar 600 µl de clorofórmio e agitar por 5 minutos em vórtex suave;
- 6- Em seguida, centrifugar a 8.000 rpm por 5 minutos e retirar o sobrenadante transferindo-o para um novo tubo;
- 7- Adicionar 600 µl de etanol absoluto e armazenar a – 20 °C por 2 horas;
- 8- Posteriormente, centrifugar à 14.000 rpm por 15 minutos e descartar o sobrenadante;
- 9- Lavar o pellet com 500 µl de etanol a 70 v/v, sem agitar;
- 10- Centrifugar por 2 minutos a 14.000 rpm e retirar o sobrenadante;
- 11- Armazenar em estufa a 37 °C até evaporar o álcool;
- 12- Adicionar 15 µl de água MiliQ e 5µl de RNase e colocar por 1 hora na estufa à 37°C. Em seguida, inativar a RNase elevando a temperatura para 65 °C durante 15 minutos e armazenar no freezer.

Anexo 11 - OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE CITOCROMO C OXIDASE I

Para obtenção das sequências do gene COI, utilizou-se os primers denominados de Fish F1 e Fish R1 (WARD et al. 2005). A reação de amplificação COI foi realizada utilizando-se de 2,5 µl de tampão 10x, 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µ de mix de dNTPs (2 mM), 0,5 µl de cada primer (*forward*: 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'; *reverse*: 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3'), 0,2 µL de Taq Polimerase (Invitrogen - 5 unidades), DNA concentrado à 10ng/µl, e completados para 25 µl com Água MiliQ. O ciclo de PCR consiste em um passo inicial de desnaturação à 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos; anelamento à 46,1°C por 30 segundos (para ambas as espécies) e extensão à 72°C por 1 minuto, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados e submetidos ao sequenciamento de DNA.

Anexo 12 -PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR PELO KIT GE HEALTHCARE - ILLUSTRAGFX PCR DNA

A purificação seguiu o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare). O protocolo consiste na adição de 500µl de *capture buffer type 3* à 100 µl de amostra (10 µg) e centrifugação por 30 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, coletar o líquido do fundo do tubo que contém a amostra, transferir para *microSpin Collumn* e centrifugar por 30 segundos a 16.000 rcf. Na sequência, descartar todo o conteúdo do tubo coletor, mantendo a *microSpin Collumn*. Em seguida, adicionar 500µl de *Wash buffer type1*, e centrifugar por 30 segundos a 16.000 rcf, descartando o conteúdo do tubo coletor e centrifugar novamente por 20 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, transferir a *microSpin Collumn* para um microtubo novo e deixar evaporar o álcool a 37° C por 3 minutos. Após, adicionar 25µl do tampão *type 6* a 70°C, aguardar 1 minuto e centrifugar por 1 minuto à 16.000 rcf. Coletar a solução que passou pela coluna e estocar à -20 °C.