

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

ASPECTOS EVOLUTIVOS E DIFERENCIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
***Astyanax scabripinnis* (CHARACIDAE, *INCERTAE SEDIS*)**

JONATHAN PENA CASTRO

Ponta Grossa

2012

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

ASPECTOS EVOLUTIVOS E DIFERENCIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
Astyanax scabripinnis (CHARACIDAE, *INCERTAE SEDIS*)

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Schnell e Schühli

Ponta Grossa

2012

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

Castro, Jonathan Pena
C355a Aspectos evolutivos e diferenciação de populações de *Astyanax scabripinnis* (CHARACIDAE, INCERTAE SEDIS) / Jonathan Pena Castro. Ponta Grossa, 2012.
109 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientador : Prof. Dr. Guilherme Schnell e Schühli

1.Evolução. 2. Citogenética. 3. Morfometria geométrica.
4. Alopatria. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Schühli, Guilherme Schnell e. III.T.

CDD: 575

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 08/2012

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, pelo candidato **JONATHAN PENA CASTRO**.

Aos oito do mês de fevereiro de dois mil e doze, 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) **JONATHAN PENA CASTRO**, 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), Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello e Dr. Maurício Osvaldo Moura. 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 o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Aspectos evolutivos e diferenciação de populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Incertae sedis)**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; 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) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

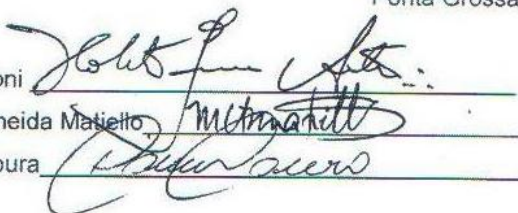
Novo título: _____

Ponta Grossa, 08 de fevereiro de dois mil e doze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Maurício Osvaldo Moura



Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Joselia Pena Castro e Rene Pena Castro Jr. por todo o apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Inicialmente, justifico-me que sou muito grato a todas as pessoas que aqui cito, e que toda minha gratidão expressa aqui é pouca para ser colocada em simples frases neste espaço.

Agradeço, primeiramente, os meus pais Joselia Pena Castro e Rene Pena Castro Jr., por toda a confiança, esforço e batalhas que enfrentamos juntos. Graças a vocês cheguei até aqui. Muito obrigado por tudo.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório pela colaboração e companheirismo. Agradeço, especialmente, meus colegas – e amigos – de laboratório, Leonardo Gusso Goll e Tatiana Cristina Machado por toda a ajuda, auxílio e explicações. Vocês sempre estiveram dispostos a me explicar alguma técnica que não sabia direito, principalmente quando entrei no laboratório. Muito obrigado.

Agradeço também aos amigos de outros laboratórios, Elize Tatiane Felipe e Fernanda Maria Cordeiro pelos momentos juntos de risadas e parceirismo. Vocês são pessoas em quem posso contar.

Agradeço ao técnico do laboratório Miguel Airton Carvalho, por estar sempre disposto e sempre arrumar um jeito de “quebrar um galho” quando precisava.

Agradeço aos professores do laboratório, Marcelo Ricardo Vicari, Viviane Nogaroto Vicari e Mara Cristina de Almeida, por todo o auxílio, paciência e explicações. Aprendi muita coisa com todos vocês. Muito obrigado.

Agradeço a todos que contribuíram ao trabalho, ao professor Orlando Moreira-Filho e aos técnicos do seu laboratório (UFSCAR) pela coleta dos exemplares; ao professor Oscar Akio Shibatta (UEL), pela identificação dos exemplares; ao professor Maurício Osvaldo Moura (UFPR), pelo auxílio e orientações na análise morfométrica; ao professor Rodrigo Torres (UFPE) pela análise de barcode e ao laboratório de Hymenoptera da UFSCAR pelas micrografias eletrônicas.

Agradeço às agências CNPq, CAPES, Fundação Araucária e Fapesp, pelo apoio e financiamento do projeto de pesquisa. Ao IBAMA pela autorização de coleta dos espécimes.

Agradeço ao meu orientador, Roberto Ferreira Artoni por tudo. Todo o conhecimento, discussões de projetos, parcerias, equipamentos e reagentes, além da oportunidade e confiança. Além de eu considerar um excelente orientador, considero um grande amigo. Muito obrigado.

“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas. Perdoe-as assim mesmo. Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro. Seja gentil, assim mesmo. Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros. Vença assim mesmo. Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo. Seja honesto assim mesmo. O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra. Construa assim mesmo. Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja. Seja Feliz assim mesmo. Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante. Dê o melhor de você assim mesmo. Veja que, no final das contas, é entre você e Deus. Nunca foi entre você e as outras pessoas.”

Madre Thereza de Calcutá

"O Sol não gira em torno da Terra, assim como a natureza não gira em torno do homem. O homem deve cair no caldeirão da natureza, pois ele não é divindade nem exceção."

Charles Darwin

Resumo

O complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* corresponde a peixes com ampla distribuição geográfica. Suas populações encontram-se geralmente isoladas em pequenos riachos, separadas por milhares de anos, tornando esses animais interessantes ao estudo evolutivo. O uso de diferentes marcadores é fundamental, uma vez que permitem inferências na identificação dos indivíduos e conseqüentemente o estudo das populações. Dessa maneira, três populações isoladas entre si de Campos do Jordão - SP, e duas de Maringá - PR foram analisadas por morfometria geométrica, correlacionando com dados de presença/ausência de cromossomos B, dados cariotípicos e citogenéticos, além de dados reprodutivos. A análise de variáveis canônicas (CVA) mostrou que há diferenças significativas entre as populações ($p < 0,0001$). A análise de função discriminante (DFA) entre macho e fêmea mostrou que há dimorfismo sexual intra e interpopulacional. A CVA separada para machos e fêmeas de cada população também mostrou diferença significativa entre elas. Todas as populações possuem $2n=50$ cromossomos organizados em $6m+22sm+10st+12a$, a exceção de apenas uma população de Maringá onde foi observado um cariomorfo com $2n=48$ cromossomos, diferenciados em $8m+26sm+6st+8a$. Não foi encontrada a presença de cromossomos B apenas na população de Campos do Jordão (662m de altitude), corroborando estudos anteriores. Na análise morfométrica associada a indivíduos com e sem cromossomos B, a CVA mostrou que há diferença na forma do corpo, sendo que os indivíduos com cromossomos B possuem a região ventral anterior menos dilatada dos que não possuem este elemento cromossômico. A CVA também apontou diferença na forma do corpo entre o cariomorfo $2n=50$ e o $2n=48$, em Maringá. A hibridação *in situ* fluorescente mostrou diferença entre os marcadores de rDNA 18S e rDNA 5S para todas as populações. Os dados reprodutivos sugerem isolamento pré zigótico entre as populações de Campos do Jordão. A análise de todos os dados aponta que as populações encontram-se diferenciadas entre si, indicando indivíduos adaptados a ambientes distintos. Isso reforça, entre outros fatores, que essas populações devem representar espécies diferentes, dentro do complexo de espécies *A. scabripinnis*, seguindo por caminhos evolutivos independentes.

Palavras-Chave: Evolução, citogenética, morfometria geométrica, alopatria.

Abstract

The species complex *Astyanax scabripinnis* are composed by fish with wide geographic distribution. Their populations are often isolated in small streams, separated by thousands of years, making it a very interesting system to study evolution. The use of different markers is crucial, since they allow inferences on the identification of individuals and therefore the study of populations. Thus, three populations isolated from each other of Campos do Jordão - SP, and two of Maringá - PR were analyzed by geometric morphometrics, correlating with data from presence / absence of B chromosomes, karyotypic and cytogenetic data, and reproductive data. Canonical variate analysis (CVA) showed that there are significant differences between populations ($p < 0.0001$). The discriminant function analysis (DFA) between males and females showed intra and interpopulational sexual dimorphism. The separate CVA of males and females from each population also showed significant difference between them. All populations have $2n = 50$ chromosomes arranged in $6m+22sm+10st+12a$, the only exception was a population from Maringá, where there was $2n = 48$ chromosomes, differentiated in $8m+26sm+6st+8a$. B chromosome were only found in the population of Campos do Jordão (1850m altitude), confirming previous studies. In a morphometric analysis separated for individuals with and without B chromosomes, the CVA showed difference in body shape. Individuals with B chromosomes have the ventral anterior region less dilated than those without of this chromosomal element. The CVA also showed differences in body shape between $2n = 50$ and $2n = 48$ populations in Maringá. The fluorescent in situ hybridization showed differences between markers 5S rDNA and 18S rDNA for all populations. The data suggest pre zygotic reproductive isolation between Campos do Jordao populations. The analysis of all data indicates that the populations are differentiated from each other, indicating adaptation to different environments. This reinforces, among other factors, that these populations should represent different species within the species complex *A. scabripinnis*, followed by independent evolutionary pathways.

Keywords: Evolution, cytogenetics, geometric morphometrics, allopatry.

Lista de figuras

Figura 1 - Exemplar de <i>A. scabripinnis</i>	22
Figura 2 - Localização dos pontos de coleta.	23
Figura 3 - Mapa hidrográfico da região de coleta em Campos do Jordão - SP.	24
Figura 4 - Mapa hidrográfico da região de coleta em Maringá - PR.	25
Figura 5 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica.	27

Capítulo I - Evidências de especiação em duas populações do peixe neotropical *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Incertae sedis)

Figura 1 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica.	35
Figura 2 - Gráfico do CVA geral das duas populações.	39
Figura 3 - Gráfico do CVA das fêmeas e machos.	40
Figura 4 – Fotos mostrando em detalhes a nadadeira anal de macho com e sem espícula.	42
Figura 5 – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com sondas para rDNA 18S e rDNA 5S.	45
Figura 6 – Idiograma das populações de Ribeirão Grande 1850m e 662m	47

Capítulo II: Cenário evolutivo para diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Incertae sedis)

Fig. 1 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica.	53
Fig. 2 - Gráfico do CVA geral de todas as populações.	58
Fig. 3 - CVA das fêmeas das quatro localidades.	59
Fig. 4 - CVA dos machos das quatro localidades.	60
Fig. 5 - CVA para análise morfométrica da presença e ausência do B.	61
Fig. 6 – CVA para análise morfométrica dos dois citótipos encontrados, para fêmeas.	62
Fig. 7 – Idiograma das populações, mostrando em destaque o cromossomo B e sua heterocromatina.	63
Fig. 8 – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com as sondas de rDNA 18S e rDNA 5S.	66

Sumário

1 – INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 – ASPECTOS DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA DE PEIXES NEOTROPICAIS	11
1.2 – ESTADO ATUAL DA SISTEMÁTICA DE CHARACIFORMES COM ÊNFASE EM ASTYANAX.....	12
1.3 - ASPECTOS DA DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE ASTYANAX....	13
1.4 - MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO E SISTEMÁTICA DO COMPLEXO A. SCABRIPINNIS	16
1.4.1 – Marcadores morfológicos e morfometria geométrica na identificação e sistemática de A. scabripinnis.	18
2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 – OBJETO DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA.....	21
3.2 – METODOLOGIAS.....	26
3.2.1 – Citogenética convencional.....	26
3.2.2 – Citogenética Molecular	26
3.2.3 – Morfometria geométrica.....	27
3.2.4 – Ensaios de reprodução.....	28
3.2.5 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
4. RESULTADOS	30
CAPÍTULO I - EVIDÊNCIAS DE ESPECIAÇÃO EM DUAS POPULAÇÕES DO PEIXE NEOTROPICAL ASTYANAX SCABRIPINNIS (CHARACIDAE, INCERTAE SEDIS)	31
CAPÍTULO II - CENÁRIO EVOLUTIVO PARA DIFERENTES POPULAÇÕES DE ASTYANAX SCABRIPINNIS (CHARACIDAE, INCERTAE SEDIS)	50
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
5 - ANEXOS	78
5.1 – PROTOCOLOS – CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	78
5.2- PROTOCOLOS CITOGENÉTICA MOLECULAR	79
5.3 – RELATÓRIO DOS DADOS GERADOS PELA ANÁLISE MORFOMÉTRICA, PELO SOFTWARE MORPHO J 1.02J (KLINGENBERG, 2008) E PAST 2.10 (HAMMER, HARPER E RYAN, 2001).....	82
5.4 - PARECER 02/2008 (PROTOCOLO 04509/08) DA SUBCOMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA. ..	107
5.5 - LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO EMITIDA PELO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA (PROC. NO. 15115-1).	108

1 Introdução Geral

1.1 Aspectos da diversidade biológica de peixes neotropicais

A América do Sul faz parte da região Neotropical, a qual possui uma das maiores biodiversidades do planeta. Lewinsohn e Prado (2002) afirmam que o Brasil encontra-se entre os 17 países megadiversos, sendo que de acordo com Artoni et al. (2000), a região Neotropical abriga a ictiofauna de água doce mais rica e diversa do mundo.

Conforme dados de Nelson (2006), há cerca de 27.000 espécies de peixes descritas, e a maior parte é encontrada em águas quentes oceânicas tropicais. Estima-se que cerca de 25% da diversidade mundial de peixes está localizada nessa região, correspondendo a mais de 8.000 espécies (Vari e Malabarba, 1998). Segundo Reis et al. (2003), atualmente são válidas aproximadamente 4.475 espécies, sendo que 1.550 espécies estão aguardando descrição taxonômica, com o total de aproximadamente 6.000 espécies na região Neotropical.

De acordo com Graça e Pavanelli (2007) o Brasil possui a maior rede hidrográfica do mundo, com uma das maiores diversidades de peixes de água doce, com mais de 2.500 espécies válidas atualmente. Desse total, segundo Artoni et al. (2000), as ordens Characiformes e Siluriformes são as mais representativas. Os Characiformes são um dos maiores grupos de peixes dulcícolas, possuindo aproximadamente 1674 espécies válidas, em 270 gêneros (Nelson, 2006).

Os membros dessa ordem possuem tamanhos variados, que vão desde muito pequenos, atingindo até 26 mm, como em *Lipidarchus* sp (Weitzman e Vari, 1988) a animais de grande porte, com representantes alcançando cerca de um metro de comprimento, como em *Hydrocynus* spp (Kantoussan et al., 2009). Apesar dos Characiformes possuírem diversidade morfológica considerável, uma vez que o grupo passou por grande divergência evolutiva, certos padrões morfoanatômicos são distinguíveis (Greenwood et al., 1966).

Dentre os hábitos alimentares observados em Characiformes, encontram-se espécies herbívoras, predadoras, iliófagas (alimentando-se dos detritos contidos no lodo ou areia), lepidófagas (alimentando-se de escamas de

outros peixes) e espécies que se alimentam de pedaços de nadadeiras de outros peixes (Moreira, 2007). O grupo é composto por indivíduos que são encontrados tanto em ambientes lênticos quanto em ambientes lóticos (Oliveira e Ferreira, 2002; Moreira, 2007).

É possível observar, portanto, que Characiformes é uma ordem bastante diversificada e complexa. No entanto, ainda são poucos os estudos mostrando as relações inter e intrapopulacionais, o que dificulta inferências taxonômicas e até mesmo sobre dados evolutivos associados.

1.2 Estado atual da sistemática de Characiformes com ênfase em *Astyanax*.

Os peixes da ordem Characiformes abrangem peixes conhecidos popularmente como lambaris, tetras, matupiris, piabas, piranhas, entre outros, e possuem uma grande diversidade. A dificuldade em encontrar marcadores de fácil utilização dificulta a correta identificação das espécies. Outro agravante é a falta de informações filogenéticas (Buckup, 1999).

O número de famílias que compõem a ordem Characiformes é controverso, como apontado por Géry (1977) que propõe 14 famílias, Greenwood et al. (1966) aponta 16, e Nelson (2006), mais recentemente, determina 18 famílias. Tal diferença deve-se ao fato da família Characidae não ser monofilética, e como explica Greenwood et al. (1966), há características divergentes e distintas de diversos subgrupos que regularmente são excluídos dessa família e considerados como novas, aumentando, portanto, o número de famílias da ordem.

Recentemente, as subfamílias Crenuchinae e Characidinae foram reconhecidas como pertencentes à família Crenuchidae, e a subfamília Alestiinae foi elevada ao táxon de família (Nelson, 2006). Tetragonopterinae era considerada com maior número de espécies entre as subfamílias de Characidae. Contudo, pela falta de dados comprovando seu monofiletismo, apenas o gênero *Tetragonopterus* permaneceu nesse subgrupo. Os demais gêneros, entre eles *Astyanax*, foram incluídos como grupos "*Incertae sedis*" em Characidae (Lima et al., 2003). Por outro lado, certas subfamílias de Characidae apresentam especializações que comprovam seu monofiletismo. A subfamília Cheirodontinae é um exemplo, que possui caracteres relacionados à

musculatura, à dentição, e ao padrão de colorido na região umeral (Malabarba, 1998).

Assim, observa-se que Characidae é um grupo bastante diverso e com muitas inconsistências acerca de sua taxonomia, sendo que de acordo com Buckup (1999), é o grupo de Characiformes com o maior número de espécies. Dessa maneira, segundo Nelson (1994), estima-se que em Characidae há cerca de 170 gêneros, com mais de 885 espécies.

O gênero *Astyanax* corresponde a peixes conhecidos popularmente como piabas ou lambaris, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (Géry, 1977). É um dos grupos com maior número de espécies, com cerca de 100 espécies já descritas e distribuídas em praticamente todos os cursos de água da região Neotropical (Marinho e Lima, 2009). Também é o de taxonomia mais confusa dentre os integrantes da família Characidae (Kavalco, 2008), sendo observada a ocorrência de “complexos de espécies”, uma vez que características morfológicas e citogenéticas, entre outras, são diversificadas e algumas vezes crípticas, como observado no complexo de espécies *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991); em *A. altiparanae* (Fernandes e Martins-Santos, 2004) e em *A. fasciatus* (Artoni et al., 2006). A ocorrência desses “complexos de espécies” agrava a dificuldade em produzir uma hipótese de filogenia do grupo, uma vez que é relativamente pequeno o número de caracteres informativos de *Astyanax* analisadas, e estes apresentam grande diversidade (Kavalco, 2008).

1.3 Aspectos da diversidade e caracterização cariotípica de *Astyanax*

O gênero *Astyanax* é bastante comum nos rios neotropicais (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), com sua distribuição abrangendo a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina (Britski, 1972). De maneira geral, são peixes pequenos, possuindo linha lateral completa, discretamente curvada na região anterior; nadadeira adiposa frequentemente presente; pré-maxilar não-protrátil; dentes pré-maxilares arranjados em duas séries, sendo a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo aproximadamente três vezes o comprimento padrão; escamas de tamanho normal (Britski et al., 1988). São peixes com fecundação externa, com ausência de cuidado parental, não-migradores.

Estudos envolvendo esse gênero mostram que o grupo é considerado um modelo para estudo, a exemplo de *A. scabripinnis*, com 78 resultados de referências no FishBase (Froese e Pauly, 2011), 62 no NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2011) e 680 no Google Acadêmico (2011).

Estudos já realizados em *Astyanax* apontam uma grande diversidade tanto cromossômica quanto morfológica em diversos táxons, sendo que em alguns, observa-se “complexos de espécies”. No complexo *A. altiparanae*, por exemplo, dados citogenéticos mostram que apesar do número diploide entre as populações ser conservado ($2n=50$) (Ferreira-Neto et al., 2009), diferenças na fórmula cariotípica, com número de braços [número fundamental (NF)] variando de 76 a 100, permite a ocorrência de rearranjos cromossômicos não-robertsonianos entre o complexo *A. altiparanae* (Fernandes e Martins-Santos, 2004). Além disso, Ferreira-Neto et al. (2009) observam que pequenas diferenças cariotípicas, como a localização de blocos heterocromáticos e das regiões organizadoras de nucléolo indicam divergências evolutivas devido às restrições de fluxo gênico. Da mesma maneira, Pie et al. (2009), utilizando dados moleculares, como as diferenças nas sequências entre as regiões de controle do DNA mitocondrial, demonstraram a existência de várias espécies crípticas em populações simpátricas, no rio Iguaçu e Paraná.

No complexo *A. fasciatus*, dados cariotípicos indicam variação do número diploide de $2n=48$ a $2n=50$, além de diferenças no padrão de heterocromatina constitutiva. Variações morfométricas também são observáveis (Artoni et al., 2006).

O complexo *A. scabripinnis*, por sua vez, possui fórmula cariotípica variando de $2n=46$ a $2n=50$, com padrões característicos de bandamento C (Mantovani et al., 2000; Moreira-Filho et al., 2004; Vicari et al., 2008a). Além disso, diferenças morfológicas podem ser identificadas (Moreira-Filho e Bertollo, 1991).

Frequentemente, em algumas populações, além do complemento cariotípico padrão, são encontrados cromossomos supranumerários ou B, quase sempre heterocromáticos, sendo que em *A. scabripinnis* destaca-se por ser a espécie mais estudada, quanto origem, distribuição e comportamento deste elemento cariotípico (Artoni, et al., 2000). Vários estudos mostram populações de *A. scabripinnis* com grande número de indivíduos portando

cromossomos B (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1992; Fauaz et al., 1994; Maistro et al., 1994; Porto - Foresti et al., 1997; Néo, Moreira-Filho e Camacho, 2000), totalizando 21 populações descritas contendo esse cromossomo (Moreira-Filho et al., 2004).

De maneira geral, esse elemento supranumérico caracteriza-se por ser um cromossomo metacêntrico grande, com tamanho e forma semelhante ao par 1 do complemento A (Salvador e Moreira-Filho, 1992). No entanto, algumas populações podem apresentar outras formas como microcromossomos, (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997), metacêntricos pequenos e submetacêntricos grandes (Néo, Moreira-Filho e Camacho 2000; Ferro et al., 2003). De acordo com Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000), a maioria dos indivíduos apresentam de 0 a 1 cromossomo, sendo a ocorrência de dois ou mais, considerados um evento raro.

A origem deste elemento genético em *A. scabripinnis* tem sido alvo de várias pesquisas, sendo que inicialmente, supôs-se que sua origem estaria relacionada com o primeiro par cromossômico do complemento A, através de eventos de não-disjunção cromossômica (Salvador e Moreira-Filho, 1992). Atualmente, a teoria mais aceita é da origem por formação de um isocromossomo, a partir de um elemento semelhante ao par acrocêntrico 24. (Mestriner et al., 2000; Néo, Moreira-Filho e Camacho, 2000; Moreira-Filho et al., 2004).

Recentemente, Vicari et al. (2011) confirmaram a teoria, com hibridações *in situ* fluorescente em paquíteno, evidenciando 26 bivalentes, com apenas um bivalente grande presente, sugerindo o pareamento braço a braço do cromossomo B, identificado por pintura cromossômica com sonda do próprio cromossomo B microdissectado. Adicionalmente hibridações com sonda utilizando a técnica de dupla FISH (fluorescent *in situ* hybridization) para a localização das sondas do cromossomo B obtida por microdissecção, do DNA satélite As51 e da sequência repetitiva obtida por C₀t-1 DNA, confirmaram estudos anteriores, que o cromossomo B teve origem por formação de isocromossomo a partir de um elemento semelhante ao par acrocêntrico 24.

Estudos sobre a distribuição do cromossomo B em populações de *A. scabripinnis* mostram que sua presença pode estar associada a diversos fatores. Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000), por exemplo, observaram a

relação entre a altitude e a quantidade de cromossomos B, e encontraram presença desse elemento somente em populações isoladas acima de 1000 metros de altitude na região de Campos do Jordão, São Paulo Brasil, sendo verificada frequência mais alta em fêmeas. De outra maneira, Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993), em seu estudo no Rio Jucu, Espírito Santo, Brasil, observaram cromossomos B exclusivamente em machos.

Camacho et al. (2000) explica que as diferenças interpopulacionais na frequência do cromossomo B dependem de fatores seletivos (por exemplo, a tolerância ecológica dos portadores de cromossomos B em termos de permissividade das condições ambientais para uma população particular), fatores históricos (por exemplo, o número de gerações desde a origem do cromossomo B), fatores de transmissão (relacionadas às diferenças entre populações na intensidade acumulativa do cromossomo B) e fatores aleatórios (por exemplo, a ação da deriva genética em populações de tamanho finito). Com relação a isso, Rocon-Stange e Almeida - Toledo (1993) ressaltam que o estudo da variação intra e interpopulacional do cromossomo B em diferentes regiões necessitam de maiores detalhes sobre o papel desses cromossomos na história evolutiva do grupo. Afirmando da importância desses estudos, Badayev et al. (2000) argumentam que os padrões da variação populacional são importantes na diversificação evolutiva, e muitos *insights* sobre processos evolutivos são originários dessa abordagem.

Dessa maneira, é possível observar que a diversificação dos indivíduos do gênero *Astyanax* ocorre em vários níveis, tanto morfológicos quanto citogenéticos, moleculares, entre outros, sendo necessário, portanto, estudos de diferentes marcadores para melhor elucidação da sistemática e filogenia e consequentemente, a evolução do grupo.

1.4 Marcadores para identificação e sistemática do complexo *A. scabripinnis*

Baseando-se na diversidade desse grupo de peixes, o uso de diferentes marcadores é fundamental, tanto para a preservação dos locais onde se encontram essas populações, quanto para a identificação dos indivíduos (Ryder, 1986).

Marcadores genéticos e moleculares são importantes instrumentos para o estudo de populações de peixes, sendo, por exemplo, ideais para uso em programas de reprodução com o objetivo de conservação genética (Povh et al., 2008).

A marcação baseada em proteínas consiste basicamente no princípio de migração eletroforética das cadeias polipeptídicas ao serem submetidas a um campo elétrico. Através desse método, um grande número de indivíduos podem ser analisados a um custo relativamente baixo. Todavia, somente informações sobre regiões codificantes do DNA são amostradas, precisando assim considerar-se o estágio do desenvolvimento ontogenético do organismo (Torres et al., 2004).

As marcações moleculares baseadas em análise direta do DNA ou RNA, por sua vez, consistem da detecção de variações que ocorrem ao longo desses filamentos, sendo detectadas por métodos específicos, como por exemplo, marcadores de DNA microssatélite, que consiste na análise de sequências repetitivas simples, as quais estão repetidas em grupos de um a quatro nucleotídeos no genoma (Povh et al., 2008) e a técnica do DNA barcoding, através da análise das divergências do gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase mitocondrial (COI), o qual sugere ser um bom marcador para identificação de espécies (Hebert et al., 2003).

Outras ferramentas moleculares poderosas, como a técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), através de suas variações, como a DOP-PCR que realiza a amplificação genérica do DNA de interesse (Telenius et al. 1992) e o sequenciamento de DNA, podem ser aplicadas a custos de tempo e dinheiro relativamente baixos, para resolver questões envolvendo ecologia, evolução e conservação de várias taxa (Povh et al., 2008; Tinti et al., 2003).

As análises citogenéticas são igualmente importantes, sendo que dados citogenéticos de peixes (tanto dulcícolas como marinhos) vêm aumentando a cada ano. Muitos estudos citogenéticos mostram populações de peixes de áreas distintas com diferentes características cariotípicas, sugerindo diversas espécies ainda não identificadas. Adicionalmente, dados citogenéticos permitem obter informações sobre o relacionamento entre grupos de peixes, a ocorrência de espécies crípticas e complexo de espécies, os mecanismos de determinação sexual e os processos evolutivos dos cromossomos sexuais, e a

existência de cromossomos supranuméricos e sua evolução (Oliveira, Foresti e Hilsdorf, 2009).

Os marcadores baseados em RNA, através da análise da expressão gênica por *microarray* possui algumas vantagens, principalmente pelo fato de que atualmente quase todo RNA codificante está descrito e disponível para análise. Entretanto, o RNA apresenta a desvantagem de ser significativamente instável e de rápida degradação (Sharp et al. 2011).

Existem ainda, marcadores bioquímicos, que podem ser empregados para sistemática de peixes. Menezes e Qasim (1993) recomendam que o uso de imunoeletroforese de enzimas solúveis e proteínas não enzimáticas são ferramentas simples, porém poderosas para a identificação de espécies, quando a discriminação morfológica entre elas é difícil ou impossível.

Marcações morfológicas também podem ser realizadas sendo que de acordo com Clabaut et al., (2007), descrições das diferenças na forma do corpo com um fundo de trabalho filogenético são importantes para compreender o processo evolutivo.

Assim, a combinação de análises morfológicas com dados moleculares aparenta ser o método mais confiável para investigar a posição filogenética e identificação dos taxa investigados (Germann et al., 2009) e, consequentemente, a interpretação dos padrões evolutivos associados.

1.4.1 Marcadores morfológicos e morfometria geométrica na identificação e sistemática de *A. scabripinnis*.

O complexo de espécies *A. scabripinnis*, em particular, inclui peixes pequenos, que habitam riachos ou encontram-se limitados às cabeceiras de pequenos tributários (Britski, 1972). Segundo Caramaschi (1986), *A. scabripinnis* apresenta plasticidade fenotípica e diferenciação morfológica na mesma bacia hidrográfica.

Entretanto, conforme apontam Moreira-Filho e Bertollo (1991), a diferenciação morfológica é sutil, de maneira que dificulta as análises, quando as formas encontradas em diferentes bacias hidrográficas são comparadas.

Reconhecendo essas dificuldades, Rohlf (1990), por sua vez, sugere que métodos mais acurados de morfometria precisam ser utilizados, como o uso de morfometria geométrica. Nesse contexto, distinguem-se duas formas

principais de análises morfométricas: a morfometria tradicional e a geométrica (Rohlf, 1990).

Na morfometria tradicional, usualmente distâncias lineares de medidas são utilizadas, às vezes com uso de cálculos, taxas e ângulos. Associada a isso, são utilizadas análises estatísticas multivariadas, tais como análise do componente principal, análise de fator, análise de variáveis canônicas e análises de funções discriminantes. Contudo, no método de morfometria tradicional, muitas dificuldades são encontradas, principalmente no que concerne à variação no padrão da forma, o que leva a uma menor confiabilidade nos resultados (Adams et al., 2004).

A morfometria geométrica, por sua vez, parte do princípio da utilização dos dados geométricos da estrutura morfológica. Utiliza-se ainda, integrada a essa metodologia, as análises estatísticas multivariadas com métodos de visualização direta na forma biológica (Adams et al., 2004). O uso dessa ferramenta para analisar dados quantitativos pode ser chamada de “síntese morfométrica”, pois une as técnicas de matemática estatística, biometria multivariada, geometria não Euclidiana e gráficos computacionais (Bookstein, 1996, p.313).

De acordo com Klingenberg (2002), uma das aplicações da morfometria geométrica diz respeito à base genética da variação morfológica, assim como a estrutura espacial das interações do desenvolvimento e modulação. Nesse contexto, Clabaut et al., (2007) afirmam que como a morfometria geométrica baseia-se na comparação estatística das formas, é possível reconstruir a forma consenso do grupo e a forma hipotética do ancestral comum do grupo, assim como visualizar as mudanças e transformações necessárias para a distinção de uma forma da outra.

Em estudos sobre as radiações adaptativas de peixes ciclídeos africanos, Clabaut et al., (2007) demonstraram o uso da morfometria geométrica para evidenciar caracteres adaptativos nesses peixes, e concluem que a forma do corpo é bastante influenciada por hábitos alimentares (nichos tróficos) e profundidade da água em que as espécies ocorrem.

Em outro estudo envolvendo morfometria geométrica, Langerhans et al. (2003) encontraram diversificação morfológica em duas espécies de peixes

neotropicals, sugerindo que diferenças no hábitat estariam criando pressões seletivas que culminam na divergência morfológica encontrada.

Observa-se, portanto, que a morfometria geométrica pode ser aplicada aos estudos da variação morfológica do complexo *A. scabripinnis*.

Além da variação ao nível fenotípico, Kavalco (2008), ressalta que também ocorrem variações ao nível genotípico, nas macroestruturas cariotípicas, nos números diploides, nos polimorfismos de blocos heterocromáticos e na presença de cromossomos supranumerários ou Bs.

Assim, pesquisas sobre a variação morfométrica de *A. scabripinnis* relacionando populações que possuem o cromossomo B, bem como outras variações, são importantes, pois através delas pode-se inferir os possíveis aspectos adaptativos que estão associados nessas populações e consequentemente fatores evolutivos associados.

2 Justificativa e Objetivos

O “complexo de espécies” *Astyanax scabripinnis*, assim definido por Moreira-Filho e Bertollo (1991), caracteriza-se por ser peixes de pequeno porte que habitam a cabeceira de pequenos rios de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Caramaschi, 1986).

As populações geralmente estão isoladas uma das outras pelos canais de grandes rios que atuam como barreiras ecológicas para populações de pequenos afluentes, seja por competição com outras espécies de lambaris ou por predação por outras espécies, restringindo o fluxo gênico e reforçando a condição alopátrica entre eles (Caramaschi, 1986). Assim, a tendência é de que as populações sigam diferentes caminhos evolutivos, por estarem sob diferentes pressões seletivas (Vicari et al., 2008a). No entanto, devido ao tamanho restrito da população também podem ser afetadas por deriva genética (Kavalco e Moreira-Filho, 2003). Além disso, cromossomos B foram descritos para 21 populações de *A. scabripinnis*, algumas destas isoladas das outras há milhões de anos em diferentes bacias hidrográficas e separadas por centenas de quilômetros (Moreira-Filho et al., 2004).

Diante destas características, o complexo de espécies “*Astyanax scabripinnis*” é considerado um excelente material para estudos genéticos e evolutivos. Assim, a presente investigação objetivou contribuir sobre a interpretação dos padrões evolutivos e diferenciação de populações deste complexo de espécies.

Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- 1-As populações apresentam diferenciação morfométrica?
- 2-Qual é o seu nível de isolamento reprodutivo?
- 3-As características cariotípicas das populações possuem diferenças?
- 4-Qual o cenário evolutivo dessas populações?

3 Material e Métodos

3.1 Objeto de estudo e caracterização dos locais de coleta

Nesse estudo foi amostrado um total de 232 espécimes de *Astyanax scabripinnis* (Figura 1) provenientes de quatro localidades: 59 exemplares (27

machos e 32 fêmeas) de Campos do Jordão (Ribeirão Grande 662m, coordenadas - S 22°46'286" e WO 45°26'707"; número de voucher MZUEL nº 5656) – SP; 78 exemplares (25 machos e 53 fêmeas) de Campos do Jordão (Córrego das Pedras 1590m, coordenadas S 22°43'332" e WO 45°33'074"; MZUEL nº 5655) – SP; 63 exemplares (28 machos e 35 fêmeas) de Campos do Jordão (Cabeceira do Ribeirão Grande 1850m, coordenadas S 22°43'378" e WO 45°27'128"; MZUEL nº 5657) – SP (Figuras 2 e 3) e 32 exemplares (19 machos e 13 fêmeas) de Maringá (Córrego Tatupeba 400m, coordenadas S 23°29'592" e WO 52°01'041"; MZUEL nº 5654) – PR (Figuras 2 e 4).

Estudos anteriores indicam que as três populações de *A. scabripinnis* de Campos do Jordão apresentam cariomorfos com $2n=50$ cromossomos, sendo que as populações de Ribeirão Grande (1850m) e Córrego das Pedras (1590m) apresentam cromossomos B e não estão em simpatria com outras espécies de peixes (Néo, Moreira-Filho e Camacho, 2000; Salvador et al., 1992, respectivamente). A população de Ribeirão Grande (662m) não possui presença deste elemento e estão em simpatria com outras espécies de peixes (Néo, Moreira-Filho e Camacho, 2000). A localidade de Maringá (400m) apresenta, por sua vez, três cariomorfos distintos de *A. scabripinnis* em simpatria, $2n=50$, $2n=48$ e $2n=46$, todos com presença de cromossomos B (Fernandes e Martins-Santos, 2005), e destes com outros peixes.



Figura 1 - Exemplar de *A. scabripinnis*. Barra: 1 cm.

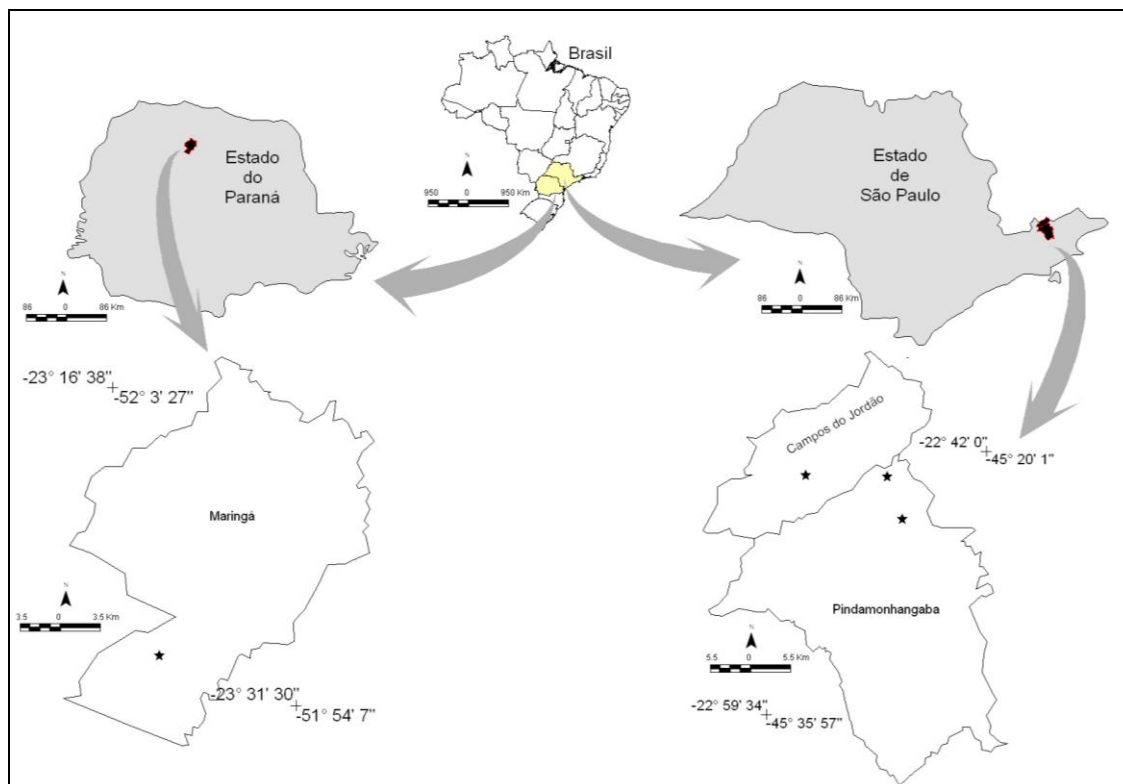


Figura 2 - Localização dos pontos de coleta.

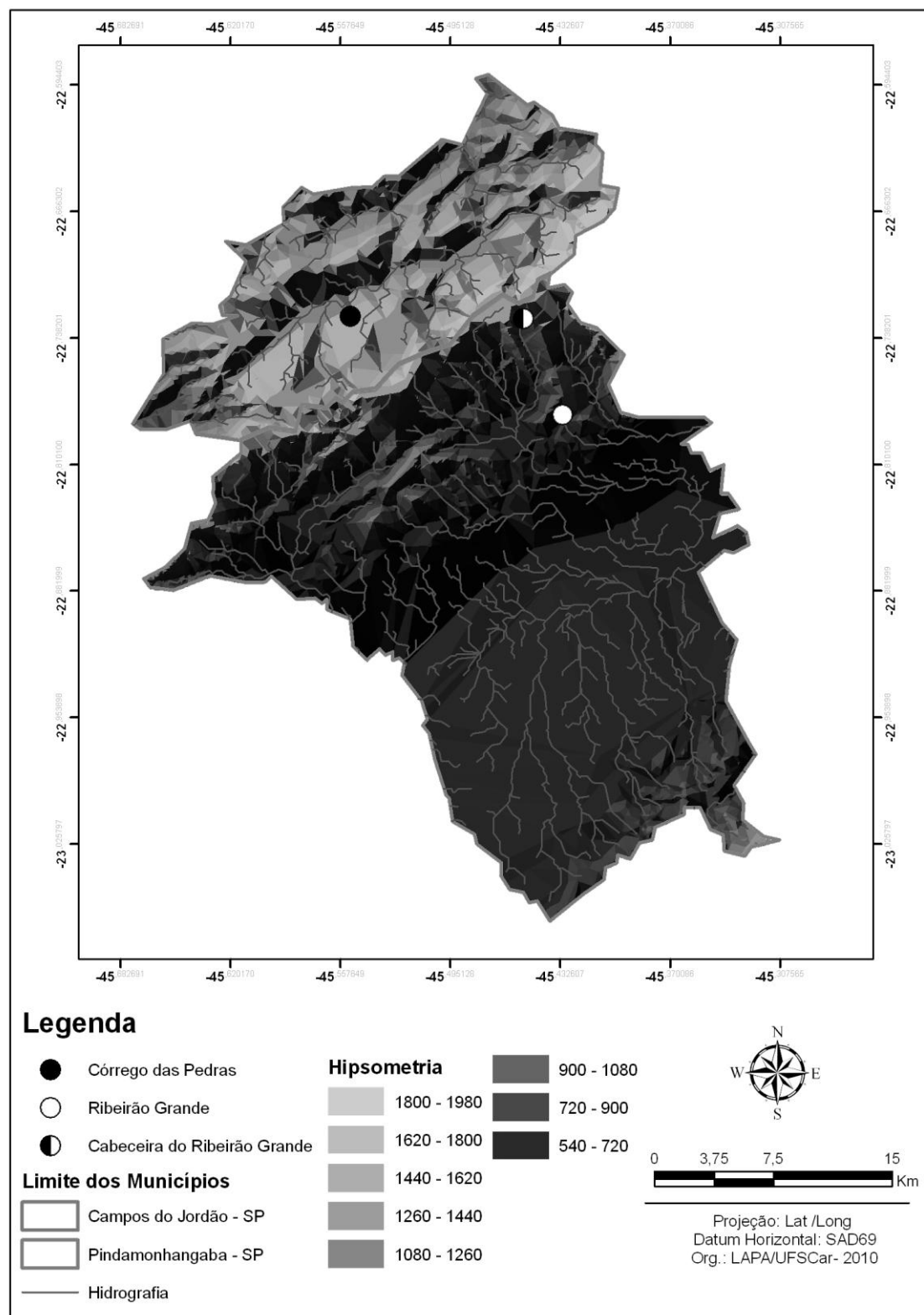


Figura 3 - Mapa hidrográfico da região de coleta em Campos do Jordão - SP.

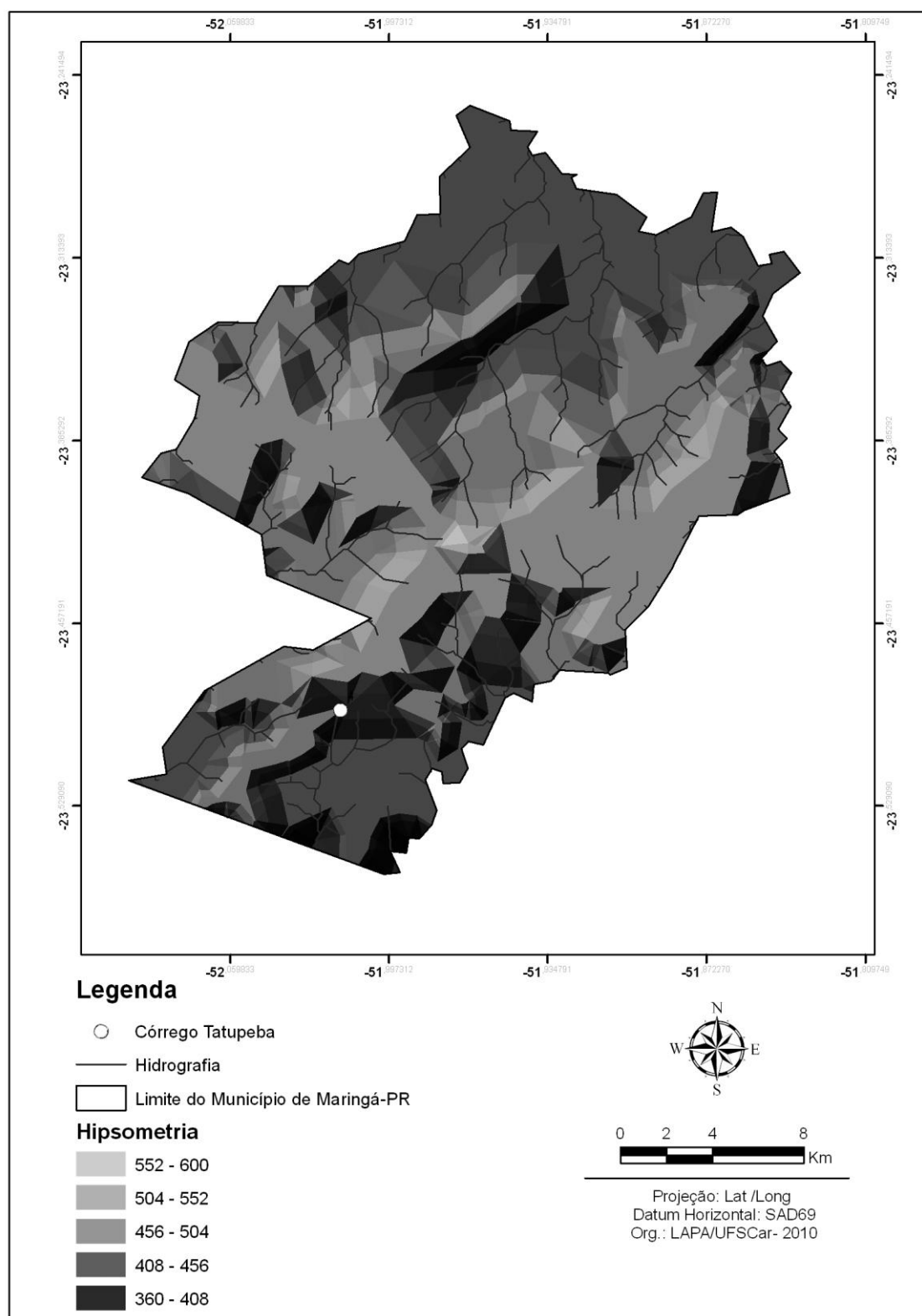


Figura 4 - Mapa hidrográfico da região de coleta em Maringá - PR.

3.2 Metodologias

3.2.1 Citogenética convencional

Utilizou-se a técnica descrita por Bertollo et al. (1978) (Protocolo anexo 5.1.1), para obtenção de cromossomos mitóticos. Para visualização das metáfases, os cromossomos foram corados com Giemsa (anexo 5.1.2).

Os cromossomos foram organizados e classificados de acordo com seu tipo morfológico, em metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a), conforme a razão dos braços (Levan et al., 1964), sendo ordenados em ordem decrescente de tamanho nos idiogramas (anexo 5.1.3).

Os idiogramas foram construídos com o software Easy Idio 1.0 (Diniz e Melo, 2006).

3.2.2 Citogenética Molecular

A obtenção dos cromossomos mitóticos, para observação de presença de cromossomos B e caracterização dos cariomorfos para a FISH (hibridação *in situ* fluorescente), foi realizada de acordo com a técnica descrita por Bertollo et al. (1978).

Para a identificação das regiões de rDNA 18S e 5S na dupla FISH, utilizou-se uma sonda marcada de 18S, obtida pelo DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2004), usando os primers NS1 5'-GTAGT CATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTC ACCTACGGA-3' (White et al., 1990) e a sonda 5S, obtida usando os primers A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (Martins e Galetti, 1999). A marcação da sonda 18S foi feita pelo kit Biotin Nick Translation (Roche), e a de 5S pelo kit Dig Nick Translation (Roche) seguindo-se as informações do fabricante.

A hibridação foi realizada em condições de alta estrringência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2 X SSC, 10% sulfato dextrano), seguindo o procedimento geral descrito por Pinkel et al. (1986) (Anexo 5.2.1). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos Streptavidina Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e Anti Digoxigenina Rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de imagens DP 71 (Olympus).

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

3.2.3 Morfometria geométrica

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

Para a análise morfométrica foram selecionados 17 marcos anatômicos ao longo do corpo (Figura 5). O software tpsDig 2.16 (Rohlf, 2010a) foi utilizado para transformar cada marco anatômico em coordenadas Cartesianas. A partir da matriz gerada, foi efetuada uma superposição de Procrustes por quadrados mínimos, e as demais análises necessárias, com o uso dos softwares Morpho J 1.02j (Klingenberg, 2011) e Past 2.10 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

A diferença da forma do corpo entre as populações foi testada com a análise de variáveis canônicas (CVA) associada a uma análise de variância multivariada (MANOVA). Foi também efetuada uma análise de função discriminante (DFA) para inferência de dimorfismo sexual significativo intra e interpopulacional.

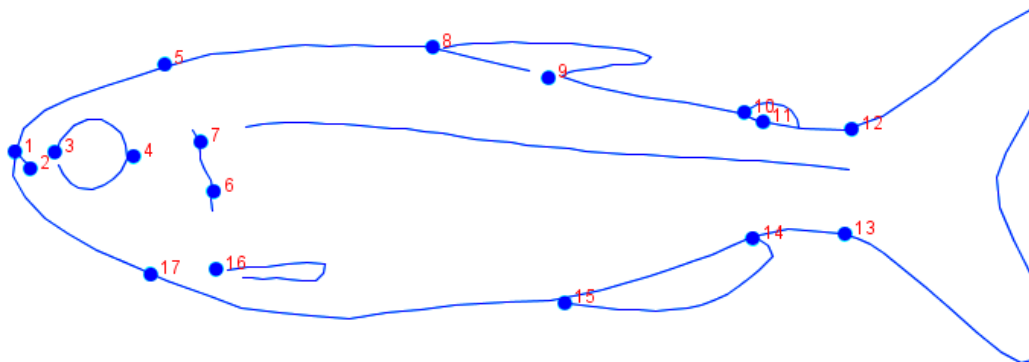


Figura 5 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica: Ponto 1: Região anterior do focinho; Ponto 2: Região posterior do focinho; Ponto 3: Região orbital anterior; Ponto 4: Região orbital posterior; Ponto 5: Região dorsal da cabeça; Ponto 6: Curvatura inferior do opérculo; Ponto 7: Curvatura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

3.2.4 Ensaios de reprodução

Para os ensaios de reprodução, foram realizados no total 44 cruzamentos com casais individualizados mantidos em aquários individuais, sob luz 24 horas, a temperatura de 26°C. Os exemplares foram alimentados duas vezes ao dia, com ração para peixes ornamentais. Os cruzamentos foram organizados segundo a tabela 1:

Tabela 1 - Cruzamentos realizados. Legenda: **CP** - Córrego das Pedras 1590m; **RB** - Ribeirão Grande 1850m; **RA** - Ribeirão Grande 662m.

Cruzamento (♂ x ♀)	Nº indivíduos ♂	Localidade	Nº indivíduos ♀	Localidade
1	7	CP	7	CP
2	7	RB	7	RB
3	5	CP	5	RA
4	5	RA	5	CP
5	5	RA	5	RB
6	5	RB	5	RA
7	5	CP	5	RB
8	5	RB	5	CP

A indução seminatural foi feita com extrato de hipófise de carpa diluído em solução fisiológica 0,9%, na concentração de 0,3 mg/mL em dose única para os machos, aplicada intra-peritonalmente após 12 horas da primeira aplicação nas fêmeas. Nas fêmeas a concentração utilizada do hormônio foi de 0,5 mg/mL (solução estoque) e aplicada em duas doses: a primeira para final de maturação dos ovos a 10% da solução estoque e a segunda dose indutória de desova na concentração plena da solução de hormônio.

Após a desova, os parentais foram sacrificados para confirmação da sexagem, análises citogenéticas e morfométricas.

3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foi realizada MEV para visualização de caracteres sexuais secundários entre machos e fêmeas das populações de *A. scabripinnis* do Ribeirão Grande capturados a 1850m e a 662m de altitude, utilizando exemplares íntegros. Os

exemplares foram sacrificados por anestesia profunda (Benzocaína 1%) e imediatamente conservados em álcool 70%. Sem preparo especial, as nadadeiras peitorais e pélvicas puderam ser submetidas *in natura* a análise de MEV sob pressão atmosférica. As imagens foram capturadas sob aumentos entre 300X a 2.000X sob tensão de 15 kV em um microscópio eletrônico de varredura Fei Quanta 250.

4. Resultados

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos

Capítulo I - Evidências de especiação em duas populações do peixe neotropical *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *Incertae sedis*)

Abstract

The Neotropical fish *Astyanax scabripinnis* occurs as isolated populations along a wide geographic area. These populations occur at different environmental regimen which can lend to local adaptation. Two isolated populations of the same river, located at different altitudes (1850m e 662m) were analyzed by geometric morphometrics, morphological, and cytogenetic karyotype analysis, and reproductive data, in order to observe the differentiation and consequently show the speciation of these two populations, along with evolutionary inferences. The results obtained in the geometric morphometry showed that the populations are different. The general canonical variate analysis (CVA) showed distinction between the populations, and the discriminant function analysis (DFA) revealed intra-and inter sexual dimorphism. The CVA analysis, both to male or female separated also accused significant morphometric difference. The analysis of secondary sexual characteristics, such as the absence of spicules in males in the population from below, suggesting an apomorphic character for the genus *Astyanax*. Both populations have the same macro karyotype structure, except for the absence of B chromosomes in the population from above. The fluorescence in situ hybridization showed differences for both markers (18S rDNA and 5S rDNA), and reproductive data suggest pre-zygotic reproductive isolation between two populations. The set of data show the absence of gene flow and speciation between two populations, followed by independent evolutionary pathways.

Keywords: Evolution, cytogenetics, geometric morphometry.

Resumo

O peixe neotropical *Astyanax scabripinnis* ocorre em uma ampla distribuição geográfica e com populações isoladas a diferentes altitudes, tornando esses animais modelos para o estudo evolutivo. Duas populações isoladas do mesmo rio, localizadas em diferentes altitudes (1850m e 662m), foram analisadas por morfometria geométrica, análise morfológica, análise cariotípica e citogenética e dados reprodutivos, com o objetivo de observar a diferenciação e

consequentemente evidenciar a especiação dessas duas populações, juntamente com inferências evolutivas. Os resultados obtidos na morfometria geométrica mostram que as populações são diferentes. A análise de variáveis canônicas geral (CVA) mostrou distinção entre as populações, sendo que a análise de função discriminante (DFA) evidenciou dimorfismo sexual intra e interpopulacional. A CVA separada, tanto de macho quando para fêmeas também acusou diferença morfométrica significativa. A análise de caracteres sexuais secundários, como a ausência de espículas nos machos na população de baixo, sugere um caractere apomórfico para o gênero *Astyanax*. Ambas as populações possuem a mesma macro estrutura cariotípica, a exceção da ausência de cromossomos B na população de baixo. A hibridação *in situ* fluorescente mostrou diferenças para ambos marcadores (rDNA 18S e rDNA 5S), e os dados reprodutivos sugerem isolamento reprodutivo pré-zigótico entre as duas populações. O conjunto de dados evidenciam ausência de fluxo gênico e especiação entre as duas populações, seguindo por caminhos evolutivos independentes.

Palavras-chave: Evolução, citogenética, morfometria geométrica.

Introdução

Populações isoladas entre si e localizadas em ambientes distintos, que possuem variação em diversos caracteres sejam eles morfológicos, genéticos, ontogenéticos, possuem um importante papel nos estudos de diversificação evolutiva, sendo que muitas percepções sobre processos evolutivos vêm através de estudos sobre a variação destas espécies (Badyaev et al, 2000).

O gênero *Astyanax* pertence a um grupo de peixes amplamente distribuídos na América Central e do Sul, sendo um dos táxons dominantes, com mais de 90 espécies distribuídas em praticamente todos os cursos de água da região Neotropical (Géry, 1977; Lima et al., 2003). Estudos citogenéticos e evolutivos são de especial interesse nesse grupo, contribuindo para a elucidação das inter-relações entre as espécies (Vicari et al, 2008) e para a definição das unidades evolutivas.

Dentro desse gênero, o “complexo de espécies” *A. scabripinnis* é bastante diversificado, com relação a caracteres morfológicos e cromossômicos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991). Suas populações estão

restritas a pequenos riachos ou a cabeceiras de pequenos tributários (Britski, 1972; Caramaschi, 1986) sendo que a presença de cromossomos supranumerários, ou cromossomos B foram descritos para 21 populações. Destas, algumas isoladas há milhões de anos em diferentes bacias hidrográficas e separadas por centenas de quilômetros (Moreira-Filho et al., 2004).

Duas populações de *A. scabripinnis* isoladas entre si, localizadas no município de Campos do Jordão - SP, em especial, possuem características que as tornam interessantes ao estudo da evolução do grupo, uma vez que estas possuem o mesmo cariótipo e estão localizadas no mesmo Rio, em diferentes altitudes, a cabeceira do Rio Ribeirão Grande, a 1850m e a 662m de altitude, sendo que para esta última não há registro da presença de cromossomos B e está em simpatria com outras espécies de peixes, como *A. altiparanae*, *Characidium*, *Neoplecostomus*, *Pareiorhina*, *Hartia* e *Rhamdia* (Néo, Moreira-Filho e Camacho, 2000).

Dessa maneira, as duas populações de *A. scabripinnis*, até então identificadas com o mesmo epíteto específico, foram analisadas no presente estudo, através de diversos marcadores e metodologias, com o objetivo de melhor caracterizar essas populações quanto sua diferenciação e especiação, estabelecendo inferências evolutivas entre elas.

Material e Métodos

Morfometria geométrica

Foram amostrados em setembro de 2010 um total de 122 espécimes de *Astyanax scabripinnis* provenientes de duas populações: 59 exemplares (27 machos e 32 fêmeas) de Campos do Jordão-SP (Ribeirão Grande 662m, número de voucher, MZUEL nº 5656) e 63 exemplares (28 machos e 35 fêmeas) de Campos do Jordão-SP (Cabeceira do Ribeirão Grande 1850m, MZUEL nº 5657).

Para as análises de morfometria geométrica as imagens de cada exemplar foram obtidas utilizando uma câmera Canon Powershot a495, de 10 megapixels de resolução a uma distância focal padronizada em 30cm. O software TpsUtil 1.46 (Rohlf, 2010b) foi utilizado para o agrupamento e formatação dos dados para a extensão tps. Foram selecionados 17 marcos

anatômicos (Figura 1), de maneira a representar somente a forma global do corpo, procurando-se eliminar os pontos das variáveis que não correspondem a morfologia corporal.

O software tpsDig 2.16 (Rohlf, 2010a) foi utilizado para colocar os marcos nas fotos e transformar cada marco anatômico em coordenadas Cartesianas. Esse processo foi realizado em tréplicas, com a finalidade de certificar a ausência de erros na marcação dos pontos, sendo posteriormente avaliado com o teste de Hotteling, através do software Past 2.10 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

A partir disso, com uso do software Morpho J 1.02j (Klingenberg, 2011), foi efetuada uma superposição de Procrustes por quadrados mínimos, eliminando as variações em posição, escala e orientação, separando assim, a forma do tamanho (Klingenberg, 2002). Este método sobrepõe todos os indivíduos, centralizando e rotacionando cada configuração entre os marcos homólogos, de maneira que a deformação gerada pelas diferenças em relação à posição dos pontos anatômicos são devidas à variação morfológica. Essas deformações são denominadas de deformações parciais (Bookstein, 1991).

As diferenças da forma do corpo entre as populações foram detectadas através de análises de variáveis canônicas junto com uma análise de variância multivariada (MANOVA/CVA), sendo que adicionalmente foram realizadas análises de função discriminante (DFA), a fim de verificar o dimorfismo sexual. Para essas análises, utilizou-se o software Morpho J 1.02j (Klingenberg, 2011).

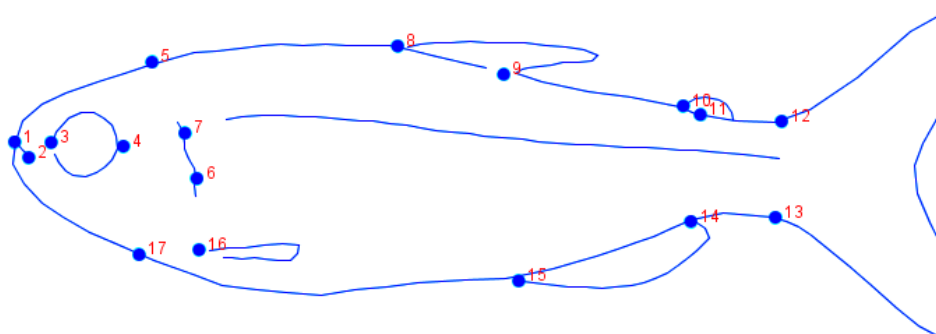


Figura 1 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica: Ponto 1: Região anterior do focinho; Ponto 2: Região posterior do focinho; Ponto 3: Região orbital anterior; Ponto 4: Região orbital posterior; Ponto 5: Região dorsal da cabeça; Ponto 6: Curvatura inferior do opérculo; Ponto 7: Curvatura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

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foi realizada MEV para visualização de caracteres sexuais secundários em nadadeiras anais, entre machos e fêmeas das populações de *A. scabripinnis* do Ribeirão Grande capturados a 1850m e a 662m de altitude, utilizando exemplares íntegros. Os exemplares foram sacrificados por anestesia profunda (Benzocaína 1%) e imediatamente conservados em álcool 70%. Sem preparo especial, as nadadeiras peitorais e pélvicas puderam ser submetidas *in natura* a análise de MEV, em pressão atmosférica. As imagens foram capturadas com aumentos entre 300X a 2.000X, sob tensão de 15 kV em um microscópio eletrônico de varredura Fei Quanta 250.

Ensaio de reprodução

Ensaio de reprodução foram realizados, a fim de testar o isolamento reprodutivo dessas populações, após aclimatação de 24 horas em laboratório. Foram realizados no total 24 cruzamentos com casais mantidos em aquários individuais, a temperatura de 26°C. Os exemplares foram alimentados duas vezes ao dia, com ração para peixes ornamentais. Os cruzamentos foram organizados da seguinte maneira: 7 machos x 7 fêmeas do Ribeirão Grande 662m; 7 machos x 7 fêmeas do Ribeirão Grande 1850m; 5 machos do Ribeirão Grande 662m x 5 fêmeas do Ribeirão Grande 1850m e 5 machos do Ribeirão

Grande 1850m x 5 fêmeas do Ribeirão Grande 662m, em todos os casos com os casais separados em aquários independentes. A escolha dos casais foi realizada de maneira aleatória.

A indução seminatural foi feita com extrato de hipófise de carpa diluído em solução fisiológica 0,9%, na concentração de 0,3 mg/mL em dose única para os machos, aplicada intra-peritonalmente após 12 horas da primeira aplicação nas fêmeas. Nas fêmeas a concentração utilizada do hormônio foi de 0,5 mg/mL (solução estoque) e aplicada em duas doses: a primeira para final de maturação dos ovos a 10% da solução estoque e a segunda dose indutória de desova na concentração plena da solução de hormônio. Após a desova os parentais foram sacrificados para sexagem, análises citogenéticas e morfométricas.

Citogenética e hibridação in situ fluorescente.

A obtenção dos cromossomos mitóticos, para observação de presença de cromossomos B, caracterização dos cariomorfos e FISH, foi realizada de acordo com a técnica descrita por Bertollo et al. (1978).

Para a identificação das regiões de rDNA 18S e 5S na dupla FISH, utilizou-se uma sonda marcada de 18S, obtida pelo DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2004), usando os primers NS1 5'-GTAGT CATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTC ACCTACGGA-3' (White et al., 1990) e a sonda 5S, obtida usando os primers A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (Martins e Galetti, 1999). A marcação da sonda 18S foi feita pelo kit Biotin Nick Translation (Roche), e a de 5S pelo kit Dig Nick Translation (Roche) seguindo-se as informações do fabricante.

A hibridação foi realizada em condições de alta estrringência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2XSSC, 10% sulfato dextrano), seguindo o procedimento geral descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos Streptavidina Alexa Fluor (Invitrogen) e Anti Digoxigenina Rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em microscopio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus).

Idiograma

A construção do idiograma das populações foi baseada no cariótipo padrão descrito por Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000), utilizando o software Easy Idio 1.0 (Diniz e Melo, 2006). As localizações do rDNA 18S e rDNA 5S no idiograma foi elaborada de acordo com os resultados obtidos na FISH.

Resultados e Discussão

Morfometria geométrica

Análise morfométrica

Foi realizada análise da variação morfológica em três amostras de 122 exemplares, sendo os indivíduos sexados e agrupados de acordo com seu local de coleta. A análise da existência de erro de medição (alocação dos marcos) indicou que não existem erros sistemáticos na alocação dos marcos (Wilks's lambda: 0,9058; $p=0,9998$) indicando a confiabilidade da amostra.

A análise geral das duas populações, utilizando as deformações relativas como variáveis independentes nas análises multivariadas (MANOVA/CVA) indicou que há diferença entre as populações para a forma do corpo (teste com 10.000 permutações para distância de Mahalanobis e distância de Procrustes entre os grupos, todos com $p < 0,0001$) (Figura 2).

Foi efetuada uma análise de função discriminante (DFA) nas populações, buscando-se investigar possíveis diferenças entre machos e fêmeas. A análise mostrou que há dimorfismo sexual significativo entre as populações, intra e interpopulacional (Wilks's lambda=0,4026; $df_1=170$; $f=1,95$, $p < 0,0001$).

Devido à influência do dimorfismo sexual, foram realizadas análises separadas para os machos e fêmeas.

O CVA das fêmeas mostrou nítida separação entre as populações (teste com 10.000 permutações para distância de Mahalanobis e Procrustes entre os grupos, todos com $p < 0,0001$). Os indivíduos do Ribeirão Grande (1850m), correspondendo ao primeiro quadrante positivo, apresentam uma contração da região da nadadeira anal e uma dilatação na região ventral, próximo a nadadeira peitoral. Possuem também a cabeça e o focinho mais fino e achatado. Na porção negativa do 1º eixo canônico está a população de Ribeirão Grande (662m), com uma dilatação na região da nadadeira anal,

correspondendo aos pontos 14 e 15. A região da cabeça se apresenta mais dilatada que na outra população. Observa-se que esta população apresenta o corpo mais fusiforme (Figura 3 A).

O CVA dos machos também mostrou separação entre as populações e o padrão de variação morfológica semelhante das fêmeas (teste com 10.000 permutações para distância de Mahalanobis e Procrustes entre os grupos, todos com $p < 0,0001$) (Figura 3 B).

Os resultados obtidos nas análises morfométricas mostram que as duas populações estudadas de *A. scabripinnis* encontram-se relativamente bem diferenciadas morfometricamente entre si, inclusive com dimorfismo sexual intra e interpopulacional. Diferenças morfométricas podem indicar indivíduos adaptados a ambientes distintos, sob influência de pressões seletivas, que podem refletir consequentemente na divergência genética (Swain e Foote, 1999).

Conforme apontaram Moreira-Filho e Bertollo (1991), a variação morfológica e cromossômica desse grupo indica ser um complexo de espécies. Devido ao tamanho pequeno e isolamento dessas populações, estas podem ser afetadas por deriva genética, seguindo por diferentes caminhos evolutivos (Kavalco e Moreira-Filho, 2003).

Na população de Ribeirão Grande (1850m) nota-se que a região anterior do corpo é mais dilatada que a posterior, sendo que na população de baixa altitude (662m), a região posterior do corpo que é a mais dilatada. Isso pode indicar uma seleção a favor para maior uso da nadadeira caudal nas populações de baixa altitude. Adicionalmente, na população de baixa altitude, a forma geral do corpo é mais fusiforme, sugerindo um melhor aproveitamento hidrodinâmico na competição contra predadores e na busca de alimento (Sibbing e Nagelkerke, 2001).

Corroborando com essa ideia, Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000b) apontam que apesar de faltar análises ecológicas específicas, notam-se duas importantes diferenças ecológicas entre alta e baixa altitude, nos locais onde ocorre o complexo de espécie *A. scabripinnis*: em altas altitudes (acima de 1.000m), a presença reduzida de predadores, como os peixes *Rhamdia hilarii* e *Hoplias malabaricus*, e larvas de insetos aquáticos. E também a menor diversidade de espécies de peixes em altas altitudes, indicando assim um

maior nível de competição por recurso e predação em baixas altitudes, com maior quantidade de espécies.

No presente estudo é corroborada essa observação em que nenhuma outra espécie foi encontrada em simpatria com *A. scabripinnis* na população de alta altitude (Cabeceira do Ribeirão Grande, 1850m). Já na população de baixa altitude (Ribeirão Grande 662m), verificou-se a ocorrência de outras espécies coletadas em simpatria com *A. scabripinnis*: *A. altiparanae*, *Characidium* sp., *Neoplecostomus* sp., *Pareiorhina* sp., *Hartia* sp. e *Rhamdia* sp.

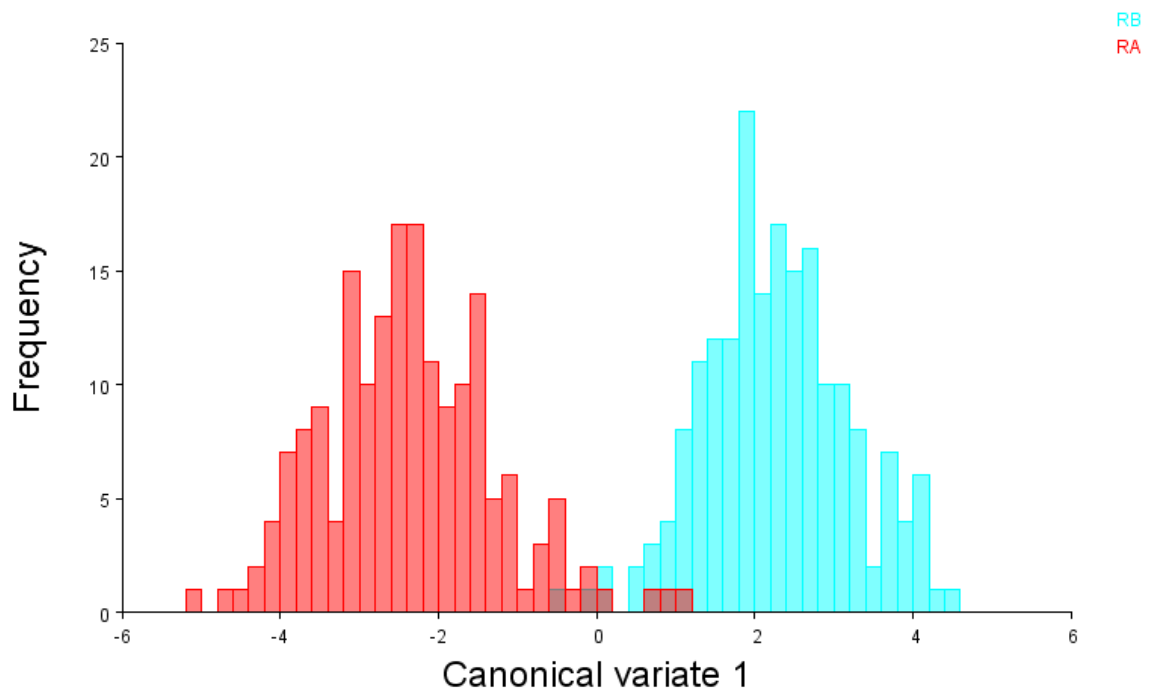


Figura 2 – Posição dos escores das duas populações de *Astyanax scabripinnis* no espaço do primeiro eixo canônico. **RA**: Ribeirão Grande 662m; **RB**: Cabeceira Ribeirão Grande 1850m.

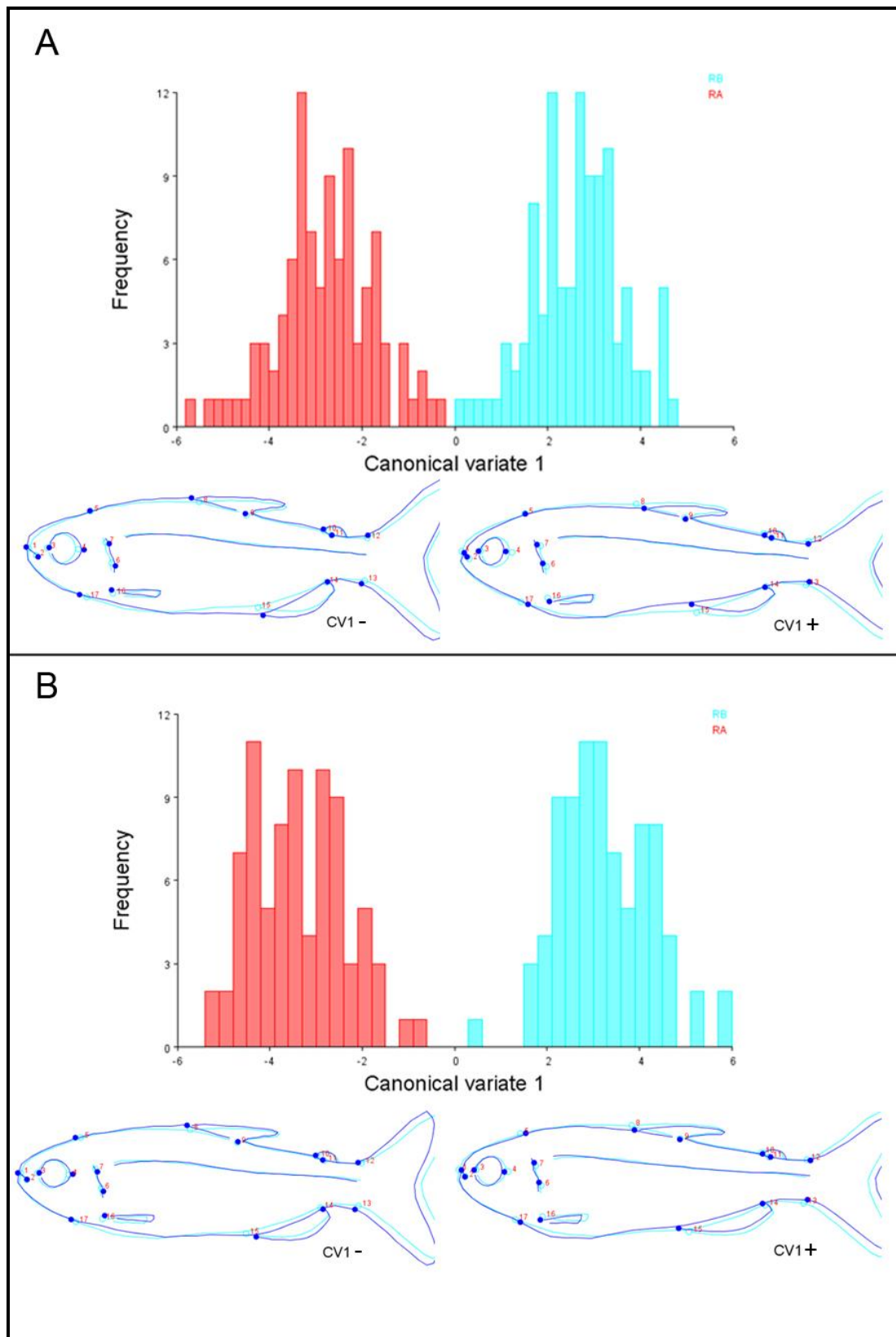


Figura- 3 – A: Gráfico do CVA das fêmeas; **B:** Gráfico do CVA dos machos das duas populações, juntamente com a representação da deformação (azul escuro) do CV em relação à configuração de referência (azul claro). **RA:** Ribeirão Grande 662m; **RB:** Cabeceira Ribeirão Grande 1850m. Fator de escala do desenho dos peixes: 10,0.

Adicionalmente à análise morfométrica, o exame das nadadeiras anais e peitorais dos machos mostrou diferença entre a população do Ribeirão Grande (662m) e Ribeirão Grande (1850m). Os machos da população de Rib. Grande (1850m) apresentam espículas com aspecto áspero ao tato, tanto nas nadadeiras peitorais (dados não mostrados) quanto na nadadeira anal. Diferentemente, os machos do Ribeirão Grande (662m) não possuem estas estruturas (Figura 4).

A presença de espículas em nadadeiras tem sido relatada em várias espécies de characídeos, incluindo outras espécies de *Astyanax* (Andrade et al., 1984; Andrade et al., 2004; Porto-Foresti et al., 2005), sendo considerada uma característica sexual secundária temporária que aparece geralmente durante o período reprodutivo e apenas em machos, apesar de relatos raros da presença em fêmeas (Ihering e Azevedo, 1936). No presente estudo, ambas as populações foram coletadas durante o mesmo período reprodutivo (setembro de 2010), sendo essa característica ausente nos machos da população de baixa altitude. Tal condição pode ser considerada uma característica derivada no grupo, reforçando o grau de isolamento e especiação dessa população em relação à de alta altitude.

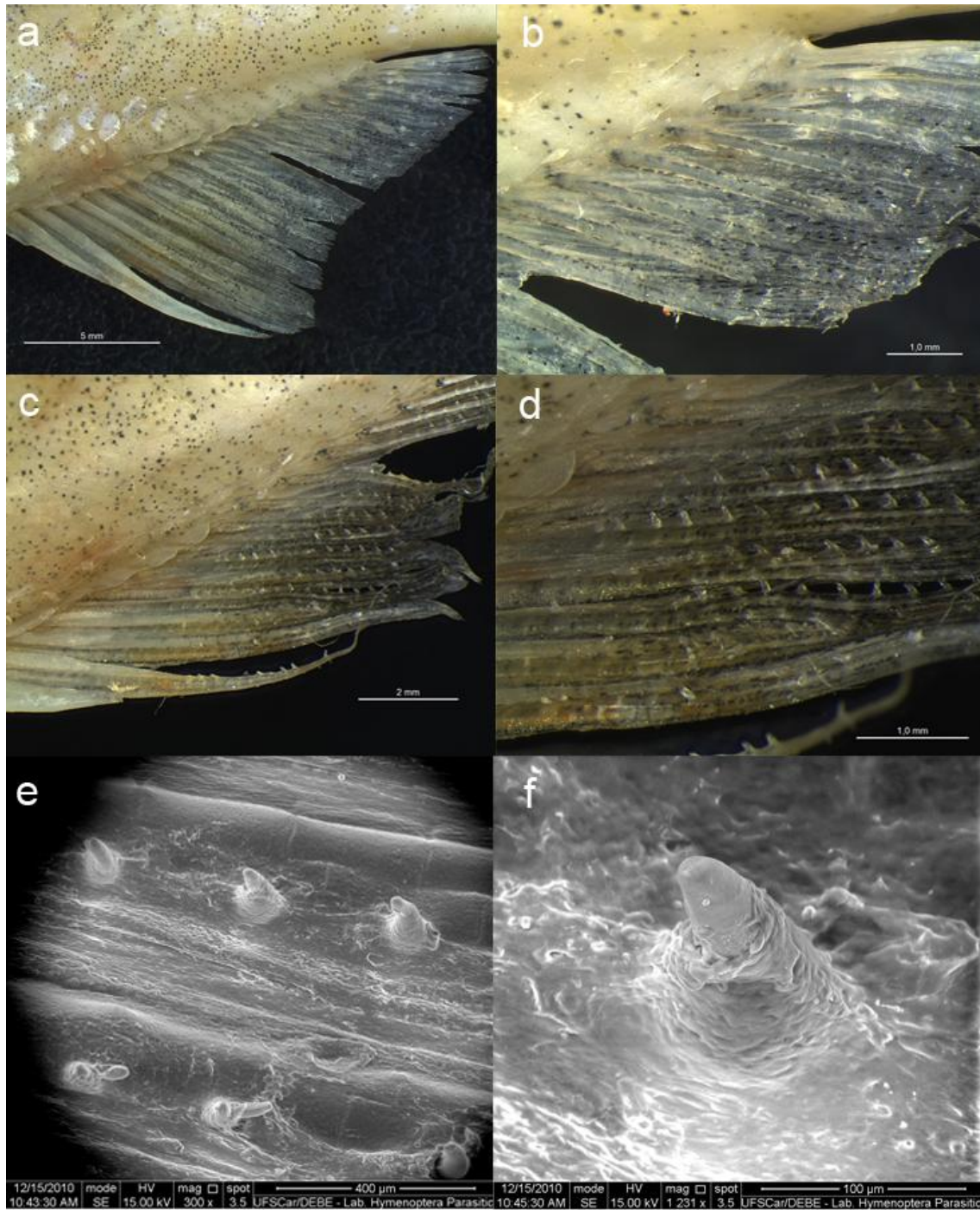


Figura 4 – Fotos mostrando em detalhes a nadadeira anal de macho com e sem espícula. **a:** Nadadeira anal de macho de Ribeirão Grande (662m); **b:** detalhe da nadadeira sem presença de espículas; **c:** Nadadeira anal de macho de Ribeirão Grande (1850m); **d:** detalhe da nadadeira com espículas; **e** e **f:** Micrografia eletrônica da varredura mostrando espícula em detalhes.

Reprodução

Os ensaios de reprodução mostraram que somente os cruzamentos entre espécimes da mesma população produziram descendência. Os 10 cruzamentos interpulacionais para obtenção dos híbridos não desovaram ou espermiaram, mesmo com estímulo hormonal e nas mesmas condições

ambientais controladas em que os demais cruzamentos foram realizados. Observou-se, inclusive, que as fêmeas mostravam-se agressivas na presença do macho da outra população, perseguindo e afastando-o.

Os dados observados sugerem isolamento reprodutivo pré-zigótico, não havendo, portanto, fluxo gênico entre as populações. Tais condições aumentam a probabilidade de acasalamento entre indivíduos aparentados, tornando as populações altamente endogâmicas. Esse isolamento pode levar a importantes processos evolutivos, culminando em especiação alopátrica (Futuyma, 2002).

Hibridação in situ fluorescente

A análise da dupla FISH nas duas populações evidenciou diferença no número e localização dos sítios de rDNA 18S e rDNA 5S. Quatro sítios de rDNA 18S foram localizados, na região distal do braço curto de um par submetacêntrico e outro subtelocêntrico, na população de Ribeirão Grande (1890m) (Figura 5a), enquanto que para a população de Ribeirão Grande (662m) foram localizados seis sítios, em um par acrocêntrico e dois pares subtelocêntricos (Figura 5d).

Para os sítios de rDNA 5S, na população de Ribeirão Grande (1890m), foram localizados seis sítios, em dois pares acrocêntricos e um par metacêntrico (Figura 5b), enquanto que em Ribeirão Grande (662m), foram localizados oito sítios, em pares subtelocêntricos e acrocêntricos (Figura 8e). Não foi observada localização de rDNA 5S ou 18S sobre o cromossomo B na população do Ribeirão Grande (1890m). Ainda, em um dos cromossomos do par 22 de Ribeirão Grande (662m) a localização *in situ* indica sintenia entre o rDNA 18S e o rDNA 5S (Figura 6f). A interpretação da localização dos sítios está mostrada no idiograma (Figura 6a e 6b).

O número e a localização dos sítios de rDNA 18S em *Astyanax* é considerado variável e múltiplo (Néo et al., 2000; Ferro et al., 2001; Mantovani et al., 2005 e Vicari et al., 2008a), pois mecanismos de transposição seriam responsáveis por essa variação (Fernandes e Martins-Santos, 2006; Vicari et al., 2008b).

Em relação ao rDNA 5S, este tende a ser mais conservado em *Astyanax*, estando predominantemente localizado na região proximal de um par

acrocêntrico e outro par metacêntrico (Ferro et al., 2001; Almeida-Toledo et al., 2002; Mantovani et al., 2005 e Vicari et al., 2008a). Todavia, a ocorrência de mais pares cromossômicos que portam esse rDNA tem sido registrada (Ferro et al., 2001; Vicari et al., 2011). A presença de oito sítios de rDNA 5S em *Astyanax*, como o apresentado para a população de Ribeirão Grande (662m), evidencia uma condição altamente derivada nessa população.

Com relação à sintonia do rDNA 5S com o rDNA 18S, como observado em Ribeirão Grande (662m), em diferentes grupos de peixes esta condição pode ser considerada menos derivada (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti, 2004; Vicari et al. 2006). Almeida-Toledo et al. (2002) observaram dados semelhantes aos localizados no presente trabalho, com um sítio de rDNA 5S co-localizado com rDNA 28S em um dos pares acrocêntricos, em uma população de *A. scabripinnis* do Rio Tietê – SP e uma população de *A. fasciatus* do rio Mogi-Guaçu – SP. Os autores inferem sobre a presença elementos móveis, do tipo transposons no genoma dos peixes, como sendo responsáveis pelos diferentes sítios observados, sendo que esses marcadores cromossômicos são importantes ferramentas citotaxonômicas, indicando relacionamento próximo entre as espécies, quando a localização dos sítios é homóloga, entre as espécies.

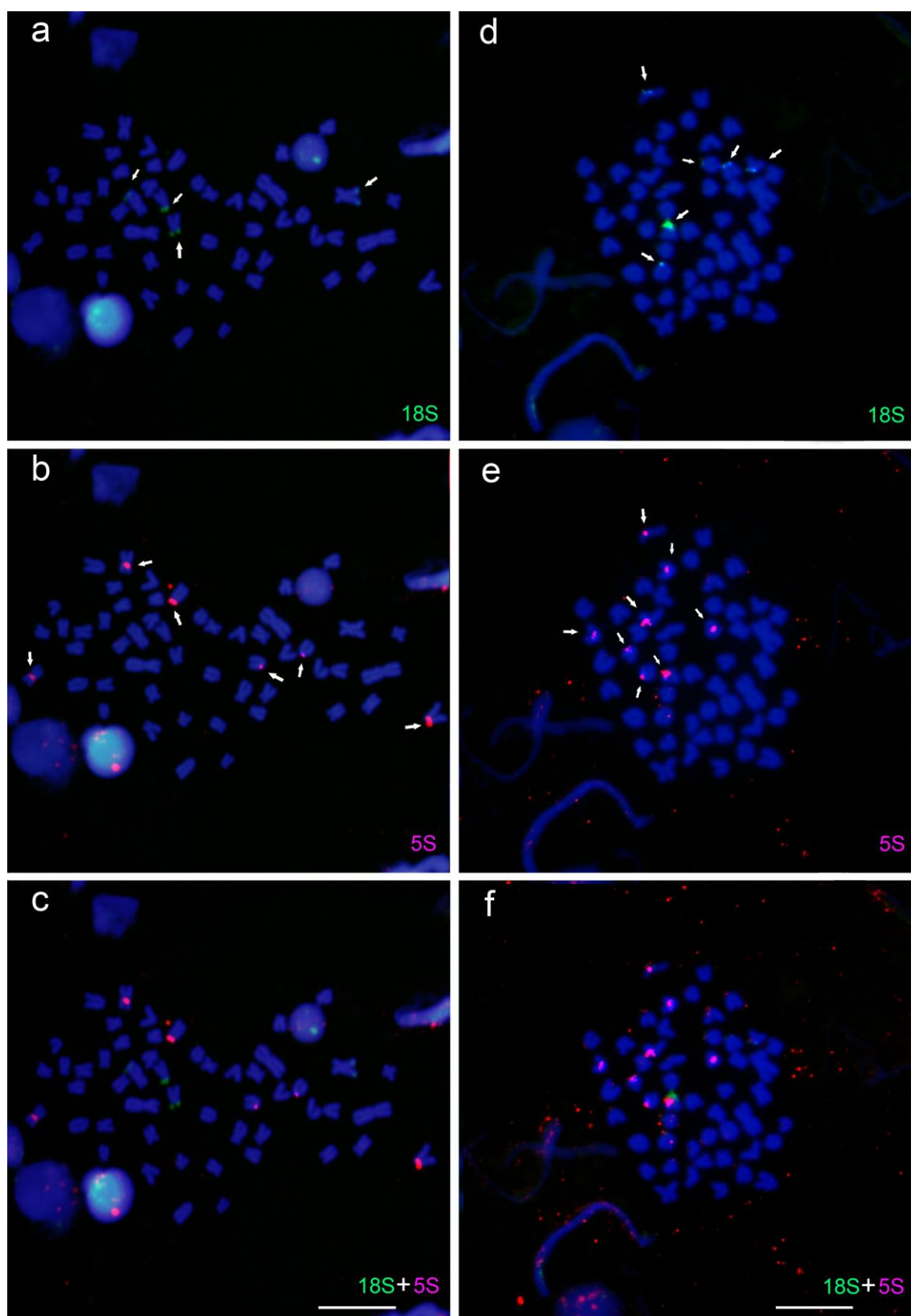


Figura 5 – Hibridação *in situ* fluorescente com sondas para **rDNA 18S** (a e d) e **rDNA 5S** (b e e). Sobreposição das imagens (c e f). Ribeirão Grande (1850m), imagens (a-c); Ribeirão Grande (662m), imagens (d-f). As pontas da seta indicam região de hibridação. Barra: 10μm.

Idiograma

Ambas as populações compartilham uma macroestrutura cariotípica muito similar, evidenciada pelos seus idiogramas (Figura 6a e 6b), com o número diploide $2n=50$ cromossomos sendo: 3 pares metacêntricos, 11 pares submetacêntricos, 5 pares subtelocêntricos e 6 pares acrocêntricos. Apenas a população da Cabeceira do Ribeirão Grande (1850m) apresentou cromossomo B, totalmente heterocromático equivalente em morfologia (metacêntrico) e ao tamanho do par 1 (Figura 6a). Na população de baixa altitude (662m) não foi registrada presença de cromossomos B, corroborando os dados anteriores de Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000), que sugerem que condições ambientais específicas mais favoráveis podem permitir uma maior tolerância para esse elemento, justificando a presença ou ausência desse cromossomo em diferentes populações de *A. scabripinnis*.

Estes peixes são originalmente típicos de cabeceiras de rios, em populações isoladas a grandes altitudes, sendo estes os locais mais favoráveis para a espécie. Populações localizadas em regiões mais baixas estão no limite ecológico de distribuição para esta espécie, assim como a simpatria com outras espécies, conseqüentemente desfavorecendo a tolerância ecológica para a presença do cromossomo B na população de baixa altitude (Néo, Moreira-Filho e Camacho 2000). Contudo, em algumas situações já foram encontrados cromossomos B em populações de *A. scabripinnis* em baixas altitudes, a exemplo da localidade do Córrego Tatupeba (400 m), município de Maringá, Paraná, Brasil (Fernandes e Martins-Santos, 2005). Esta pode ser uma situação particular em decorrência de migração a jusante das cabeceiras deste córrego, ou mesmo representar uma condição biogeográfica diferenciada que amplia a distribuição de cromossomos B em *Astyanax*.

Analisando-se os dados em conjunto pode-se inferir que, as duas populações representam espécies crípticas distintas, acumulando diferenças ao longo do tempo do isolamento reprodutivo, devido à especiação alopátrica. Contudo, a grande similaridade cariotípica entre estas "espécies" sugere uma especiação recente ou que a estabilidade cariotípica, a exceção do cromossomo B e as diferenças observadas na localização dos genes ribossomais 5S e 18S, não tenham acompanhado as diferenças morfológicas acumuladas ao longo deste tempo evolutivo.

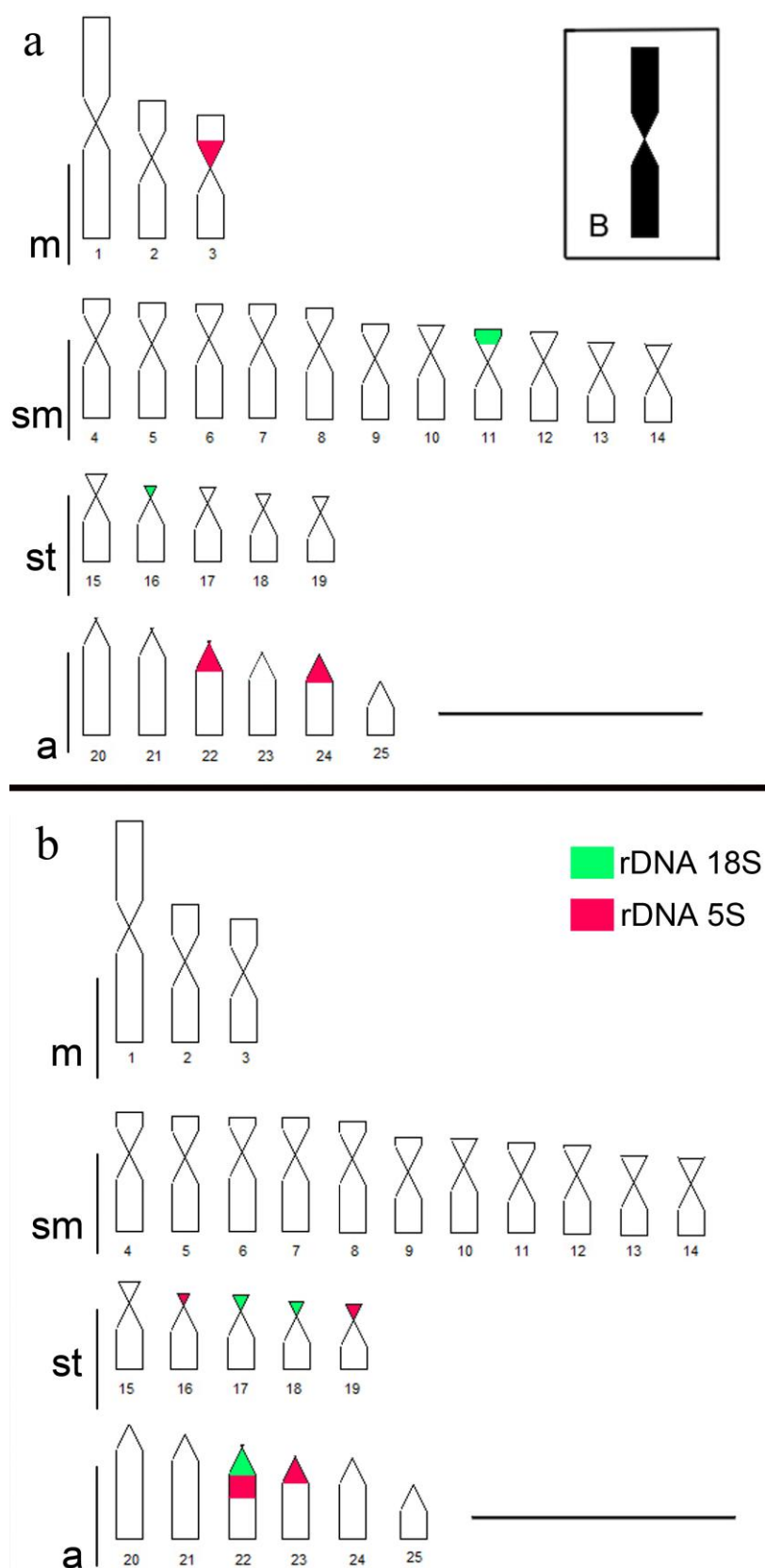


Figura 6 – Idiograma das populações de Ribeirão Grande 1850m (a) e 662m (b), com base no cariótipo de Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000). É apresentada a interpretação do resultado obtido no FISH, para sonda de rDNA18S e 5S. O cromossomo B observado na população de Ribeirão Grande 1850m foi o metacêntrico grande, totalmente heterocromático. Barra: 10µm.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da dissertação no item **Referências Bibliográficas**.

Capítulo II

Cenário evolutivo para diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *Incertae sedis*)

Capítulo II - **Cenário evolutivo para diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *Incertae sedis*).**

Abstract

The species complex *Astyanax scabripinnis* is a good model system for evolutionary studies, with many implications of this approach are derived from studies involving this organism, since these fish have a wide geographical range and isolated populations at different altitudes. In this study, five populations of *A. scabripinnis* were analyzed by geometric morphometry, cytogenetic markers and data of induced breeding in order to obtain the evolutionary scenario of these populations. Morphometric data indicate that populations are well differentiated from each other, including intra and interindividual dimorphism. Information of the induced reproduction in three populations suggests pre-zygotic isolation between them. The cytogenetic data suggest apparent macrostructural similarity, however, the results of FISH of 18S rDNA and 5S rDNA show differences in all populations. The data set suggests that individuals are adapted to different environments in a complex evolutionary scenario, in which the populations were related in a recent geological time. However due to the allopatric and sympatric isolation, they are evolving independently, currently reinforcing the existence of different cryptic species.

Key words: Evolution, allopatry, morphometric analysis, cytogenetic.

Resumo

O complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* é um ótimo modelo para estudos evolutivos, sendo que muitas inferências dessa abordagem são obtidas a partir de estudos envolvendo esse organismo, uma vez que esses peixes possuem uma ampla abrangência geográfica e populações isoladas a diferentes altitudes. No presente trabalho, cinco populações de *A. scabripinnis* foram analisadas por morfometria geométrica, marcadores citogenéticos e dados de reprodução induzida, a fim de obter o cenário evolutivo dessas populações estudadas. Os dados morfométricos apontam que as populações encontram-se bem diferenciadas entre si, inclusive com dimorfismo intra e interindividual. As informações de reprodução induzida em três populações sugere isolamento pre-zigótico entre elas. Os dados citogenéticos apontam

aparente semelhança macroestrutural, contudo resultados de FISH de rDNA 18S e rDNA 5S mostram diferenças em todas as populações. O conjunto dos dados sugere que os indivíduos estão adaptados a ambientes distintos em um cenário evolutivo complexo, em que as populações estiveram relacionadas em um tempo geológico recente. Contudo devido ao isolamento alopátrico e simpátrico, estão evoluindo independentemente, reforçando atualmente a existência de espécies crípticas distintas.

Palavras-chave: Evolução, alopatria, análise morfométrica, citogenética

Introdução

O gênero *Astyanax* corresponde a peixes conhecidos popularmente como piabas ou lambaris, sendo um dos táxons dominantes na América do Sul, uma vez que está distribuído em praticamente todos os cursos de água da região Neotropical (Géry, 1977, Lima et al., 2003).

A grande quantidade de estudos envolvendo esse gênero, a exemplo de *A. scabripinnis*, com 78 resultados de referências no FishBase (Froese e Pauly, 2011), 62 no NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2011) e 680 no Google Acadêmico (2011), mostram o interesse pela comunidade científica em estudar esse grupo, devido seu grande potencial como organismo modelo para estudos evolutivos.

O “complexo de espécies” *Astyanax scabripinnis* é bastante diversificado, com relação a caracteres morfológicos e cromossômicos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991). Suas populações estão restritas a pequenos riachos ou a cabeceiras de pequenos tributários (Bristki, 1972; Caramaschi, 1986) sendo que a presença de cromossomos supranumerários, ou cromossomos B foram descritos para 21 populações de *A. scabripinnis*, algumas destas isoladas das outras há milhões de anos em diferentes bacias hidrográficas e separadas por centenas de quilômetros (Moreira-Filho et al., 2004). De acordo com Shibatta e Artoni (2005), o isolamento populacional por vicariância (exemplo, eventos geológicos) é um dos fatores capazes de promover especiação alopátrica em *Astyanax*.

Esses atributos mostram que *Astyanax scabripinnis* representa um excelente material para estudos genéticos e evolutivos, sendo que o uso de diferentes marcadores é fundamental, uma vez que permitem inferências na

identificação dos indivíduos e consequentemente o estudo das populações (Ryder, 1986; Povh et al., 2008).

A análise da variação da forma desses peixes, assim como a relação com outros caracteres e o ambiente, permite identificar os prováveis fatores adaptativos associados, bem como averiguar o grau de isolamento das populações alopátricas e simpátricas, proporcionando uma ideia sobre sua evolução em tais condições.

Nesse sentido, o presente trabalho visa caracterizar diversas populações isoladas e/ou simpátricas de *A. scabripinnis* de diferentes altitudes, em auxílio à sistemática e presença de cromossomos B, buscando-se interpretar os fatores evolutivos relacionados.

Material e Métodos

Morfometria geométrica

Foram amostrados um total de 232 espécimes de *Astyanax scabripinnis* provenientes de quatro localidades: 59 exemplares (27 machos e 32 fêmeas) de Campos do Jordão (Ribeirão Grande 662m, número de voucher MZUEL nº 5656) – SP; 78 exemplares (25 machos e 53 fêmeas) de Campos do Jordão (Córrego das Pedras 1590m, MZUEL nº 5655) – SP; 63 exemplares (28 machos e 35 fêmeas) de Campos do Jordão (Cabeceira do Ribeirão Grande 1850m, MZUEL nº 5657) – SP e 32 exemplares (19 machos e 13 fêmeas) de Maringá (Córrego Tatupeba 400m, MZUEL nº 5654) – PR. Os animais de Ribeirão Grande (662m e 1850m) são os mesmos utilizados pelo artigo 1 deste trabalho

As imagens de cada indivíduo foram obtidas utilizando uma câmera Canon PowerShot A495 de 10 megapixels de resolução. O software TpsUtil 1.46 (Rohlf, 2010b) foi utilizado para o agrupamento e formatação dos dados para a extensão tps. Foram selecionados 17 marcos anatômicos ao longo do corpo (Figura 1).

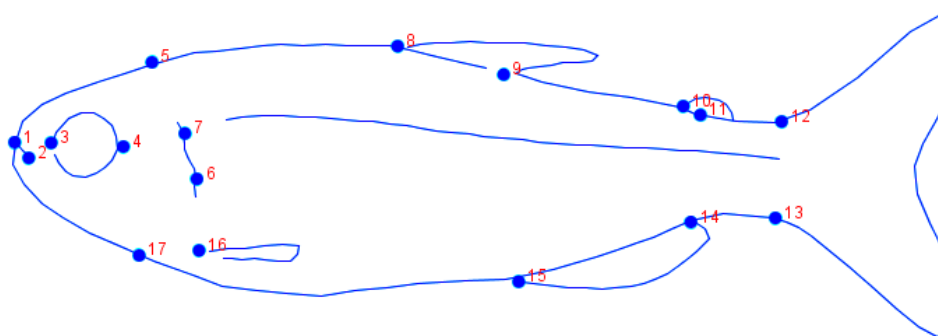


Fig. 1 - Marcos anatômicos selecionados para a análise morfométrica: Ponto 1: Região anterior do focinho; Ponto 2: Região posterior do focinho; Ponto 3: Região orbital anterior; Ponto 4: Região orbital posterior; Ponto 5: Região dorsal da cabeça; Ponto 6: Curvatura inferior do opérculo; Ponto 7: Curvatura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

O software tpsDig 2.16 (Rohlf, 2010a) foi utilizado para colocar os marcos e transformar cada marco anatômico em coordenadas Cartesianas. A partir disso, com uso do software Morpho J 1.02j (Klingenberg, 2011), foi efetuada uma superposição de Procrustes por quadrados mínimos, eliminando variação em posição, escala e orientação, separando a forma do tamanho (Klingenberg, 2002). Este método superpõe todos os indivíduos, centralizando e rotacionando cada configuração entre os marcos homólogos, gerando uma configuração de referência, de maneira que a deformação gerada pelas diferenças em relação à posição dos pontos anatômicos são devidas à variação dos pontos homólogos à configuração de referência. Essas deformações são denominadas de deformações parciais (Bookstein, 1991).

Para se testar a existência de variação morfológica entre as populações foi usada uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) (Klingenberg, Barluenga e Meyer, 2002) onde a variável resposta foram as deformações parciais e a variável classificadora, a população de origem. Para determinar se existia dimorfismo sexual intra populacional, foi usada uma análise de Hotelling (Hotelling, 1931).

Todas as análises morfométricas foram realizadas com o uso dos softwares Morpho J 1.02j (Klingenberg, 2011) e Past 2.10 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

Idiograma

A construção do idiograma das populações foi baseada nos cariótipos descritos por Salvador et al. (1992); Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000) e Fernandes e Martins-Santos (2005). O software Easy Idio 1.0 (Diniz e Melo, 2006) foi usado para a elaboração do idiograma.

Citogenética e hibridação in situ fluorescente.

A obtenção dos cromossomos mitóticos, para observação de presença de cromossomos B, caracterização dos cariomorfos e FISH, foi realizada de acordo com a técnica descrita por Bertollo et al. (1978).

Para a identificação das regiões de rDNA 18S e 5S na dupla FISH, utilizou-se uma sonda marcada de 18S, obtida pelo DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2004), usando os primers NS1 5'-GTAGT CATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTC ACCTACGGA-3' (White et al., 1990) e a sonda 5S, obtida usando os primers A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (Martins e Galetti, 1999). A marcação da sonda 18S foi feita pelo kit Biotin Nick Translation (Roche), e a de 5S pelo kit Dig Nick Translation (Roche) seguindo-se as informações do fabricante.

A hibridação foi realizada em condições de alta estrringência (2,5 ng/ μ L sonda, 50% formamida, 2XSSC, 10% sulfato dextrano), seguindo o procedimento geral descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos Streptavidina Alexa Fluor (Invitrogen) e Anti Digoxigenina Rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 μ g/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de imagens DP 71 (Olympus).

Ensaio de reprodução

Para os ensaios de reprodução, foram realizados no total 44 cruzamentos com casais individualizados mantidos em aquários individuais, sob luz 24 horas, a temperatura de 26°C. Os exemplares foram alimentados duas vezes ao dia, com ração para peixes ornamentais. Os cruzamentos foram organizados segundo a tabela 1:

Tabela 2 - Cruzamentos realizados. Legenda: **CP** - Córrego das Pedras 1590m; **RB** - Ribeirão Grande 1850m; **RA** - Ribeirão Grande 662m.

Cruzamento (♂ x ♀)	Nº indivíduos ♂	Localidade	Nº indivíduos ♀	Localidade
1	7	CP	7	CP
2	7	RB	7	RB
3	5	CP	5	RA
4	5	RA	5	CP
5	5	RA	5	RB
6	5	RB	5	RA
7	5	CP	5	RB
8	5	RB	5	CP

A indução seminatural foi feita com extrato de hipófise de carpa diluído em solução fisiológica 0,9%, na concentração de 0,3 mg/mL em dose única para os machos, aplicada intra-peritonalmente após 12 horas da primeira aplicação nas fêmeas. Nas fêmeas a concentração utilizada do hormônio foi de 0,5 mg/mL (solução estoque) e aplicada em duas doses: a primeira para final de maturação dos ovos a 10% da solução estoque e a segunda dose indutória de desova na concentração plena da solução de hormônio.

Após a desova, os parentais foram sacrificados para confirmação da sexagem, análises citogenéticas e morfométricas.

Resultados e discussão

Análise morfométrica geral

Foi realizada análise da variação morfológica em três amostras de 122 exemplares, sendo os indivíduos sexados e agrupados de acordo com seu local de coleta. A análise da existência de erro de medição (alocação dos marcos) indicou que os erros são aleatoriamente distribuídos (Wilks's lambda: 0,9101; $p=0,615$) indicando a confiabilidade da amostra.

A análise de função discriminante (DFA) em todas as populações mostrou que há dimorfismo sexual significativo para todas as populações, intra e interpopulacional (Wilks's lambda=0,5236; $df_1=170$; $f=2,69$, $p < 0,0001$).

Devido à influência do dimorfismo sexual, foram realizadas análises separadas para os machos e fêmeas.

A análise geral das populações, utilizando as deformações relativas como variáveis resposta nas análises multivariadas (MANOVA/CVA) indicou que há diferença entre as populações (teste com 10.000 permutações para distância de Mahalanobis e Procrustes entre os grupos, todos com $p < 0,0001$), separando-as nos quatro eixos canônicos, com o eixo canônico 1 CV1 explicando 59,4% e o CV2, 29,3% da variação entre os grupos (Figura 2).

Na análise das fêmeas, o espaço dos eixos canônicos separa as 4 localidades (Maringá 400m (MG), Ribeirão Grande 662m (RA), Ribeirão Grande 1850m (RB) e Córrego das Pedras 1590m (CP)). No primeiro eixo canônico ocorre a separação entre RA e MG (escores positivos) de CP e RB (escores negativos). Os indivíduos de Maringá (400m) e Ribeirão Grande (662m), na porção canônica positiva do 1º eixo, apresentam uma dilatação na região da nadadeira anal, que corresponde aos marcos 14 e 15. Também apresentam o corpo mais fusiforme. Na porção canônica negativa do primeiro eixo, estão as populações de Córrego das Pedras (1590m) e Ribeirão Grande (1850m), apresentando uma contração da região da nadadeira anal e uma dilatação na região ventral, próximo a nadadeira peitoral (Figura 3).

No segundo eixo canônico, explicando 29,622% da variação, ocorre a discriminação dos grupos de populações formadas apenas no primeiro eixo canônico positivo, sendo que no segundo eixo canônico positivo, estão as populações de Córrego das Pedras (1590m) e Ribeirão Grande (662m). Estas apresentam a cabeça e órbitas oculares maiores em relação às populações do segundo eixo canônico negativo (Ribeirão Grande 1850m e Maringá 400m) (Figura 3).

O CVA dos machos também mostrou separação entre as populações e o padrão de variação morfométrica semelhante das fêmeas (teste com 10.000 permutações para distância de Mahalanobis e Procrustes entre os grupos, todos com $p < 0,0001$), com o primeiro eixo canônico explicando 58,807% da variação e o segundo eixo canônico, 32,957% (Figura 4).

Os resultados obtidos nas análises morfométricas gerais mostram que as populações estudadas de *A. scabripinnis* encontram-se relativamente bem diferenciadas entre si, inclusive com dimorfismo sexual, com diferenças entre

machos e entre fêmeas de diferentes populações. Essa variação claramente associada com a população de origem pode indicar adaptação a ambientes distintos, se essa adaptação for produzida por pressões seletivas. Pode-se refletir em divergência genética (Swain e Foote, 1999). Conforme apontaram Moreira-Filho e Bertollo (1991), a variação morfológica e cromossômica desse grupo indicava que se tratava de um complexo de espécies.

As populações de altitudes altas e baixas, na análise morfométrica geral, discriminando machos e fêmeas, ficaram separadas no CV1, sendo no CV1-, as de alta altitude e no CV1+ as de baixa. Em todos os casos, o CV1 explica a maior parte da variação. Assim, as análises morfométricas apontam existir efeito de seleção natural na diferenciação das populações, uma vez que analisando a forma do corpo, nota-se que nas populações de alta altitude, a região anterior do corpo é mais dilatada que a posterior, sendo que nas de baixa altitude, a região posterior do corpo que é a que se apresenta mais dilatada. Isso pode indicar um maior uso da nadadeira caudal nas populações de baixa altitude. Adicionalmente, nas populações de baixa altitude, a forma geral do corpo é mais fusiforme, indicando um melhor aproveitamento hidrodinâmico na competição contra predadores e na busca de alimento (Sibbing e Nagelkerke, 2001).

Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000) sugeriram que apesar da ausência de dados ecológicos, observam-se duas importantes diferenças ecológicas entre populações de *A. scabripinnis* de alta e baixa altitude. Em altas altitudes praticamente não são encontrados predadores para *Astyanax*, e verificaram ainda uma menor diversidade de peixes, enquanto que em baixas altitudes (abaixo de 1000 m) esta situação se inverte.

Corroborando essa observação, no presente estudo, nenhuma outra espécie de peixe foi encontrada em simpatria com *A. scabripinnis*, nas populações de alta altitude Córrego das Pedras (1590m) e Cabeceira do Ribeirão Grande (1850m). Já nas populações de baixa altitude, em Ribeirão Grande (662m), outras espécies foram coletadas em simpatria com *A. scabripinnis*: *A. altiparanae*, *Characidium* sp., *Neoplecostomus* sp., *Pareiorhina* sp., *Hartia* sp. e *Rhamdia* sp. Em Maringá, no Córrego Tatupeba (400m), foram encontradas também em simpatria com *A. scabripinnis*: *Gymnotus* sp., *Astyanax* sp., entre outras.

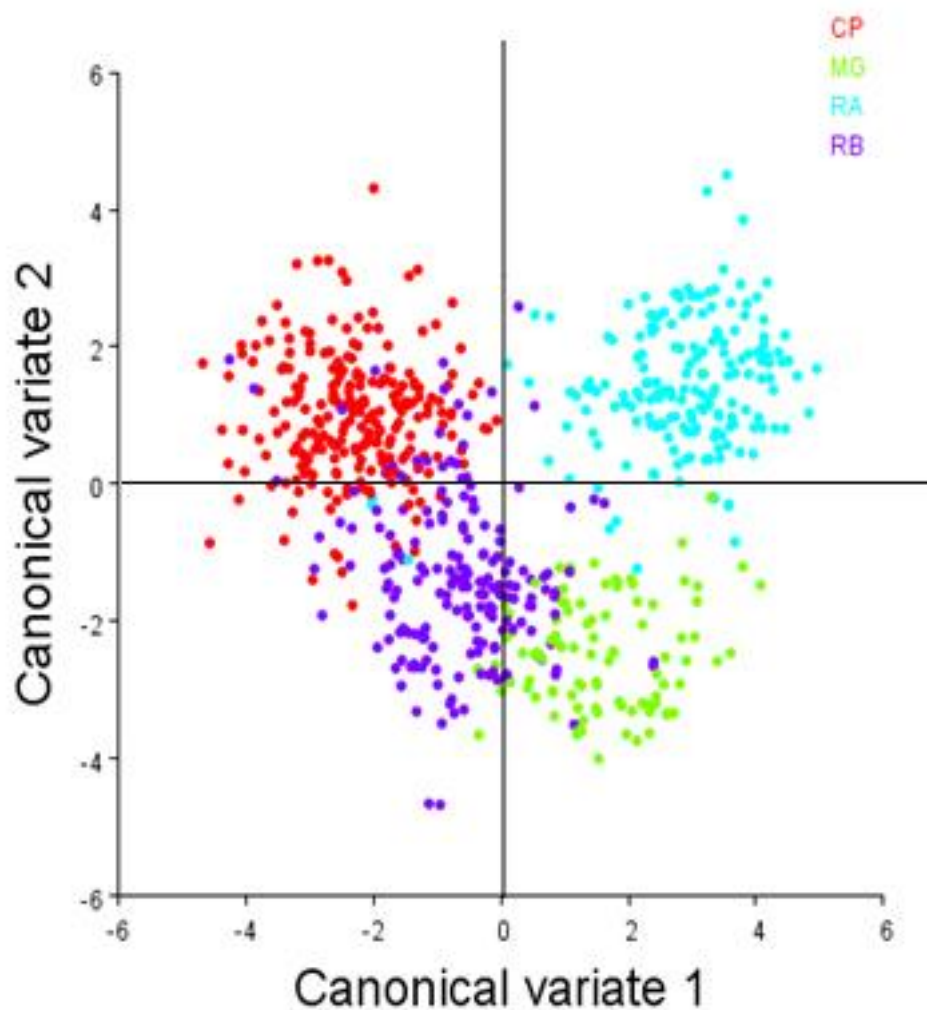


Fig. 2 – Posição dos escores das quatro localidades, no espaço do primeiro e do segundo eixo canônico. Nota-se a separação das quatro localidades nos eixos canônicos. Na figura: **CP**: Córrego da Pedras 1590m; **MG**: Maringá 400m; **RA**: Ribeirão Grande 662m; **RB**: Cabeceira Ribeirão Grande 1850m.

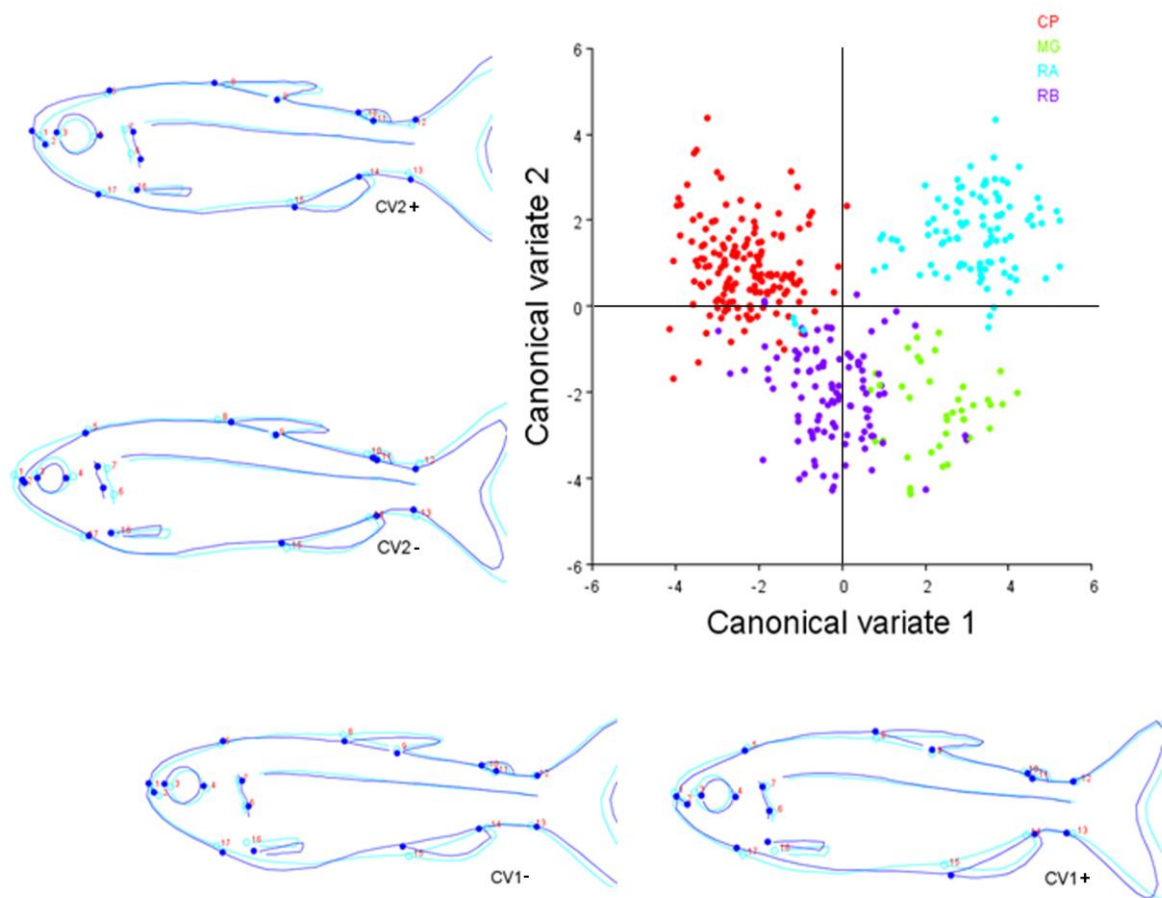


Fig. 3 - Posição dos escores das fêmeas das quatro localidades, no espaço do primeiro e do segundo eixo canônico, juntamente com a representação da deformação (azul escuro) de cada CV em relação à configuração de referência (azul claro). No gráfico: **CP**: Córrego das Pedras; **MG**: Maringá; **RA**: Ribeirão Grande 662m; **RB**: Cabeceira Ribeirão Grande 1850m. Magnificação das figuras: 10,0.

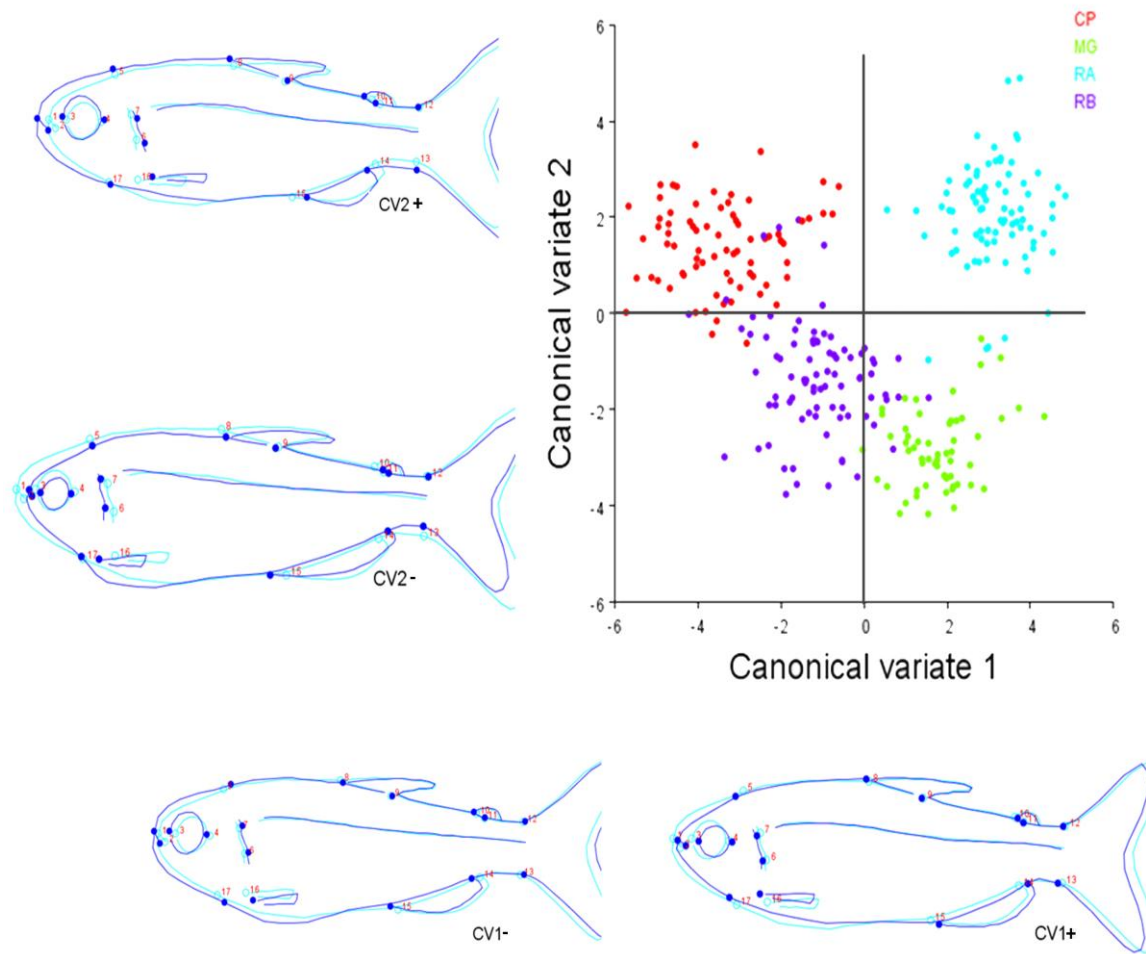


Fig. 4 - Posição dos escores dos machos das quatro localidades, no espaço do primeiro e do segundo eixo canônico, juntamente com a representação da deformação (azul escuro) de cada CV em relação à configuração de referência (azul claro). No gráfico: **CP**: Córrego das Pedras; **MG**: Maringá; **RA**: Ribeirão Grande 662m; **RB**: Cabeceira Ribeirão Grande 1850m. Magnificação das figuras:10,0.

Morfometria e cromossomo B

Nesse item, somente fêmeas do Córrego das Pedras (1590m) (CP) foram submetidas à análise devido ao número amostral não ser suficiente nos machos portadores de cromossomos B, assim como para as demais populações. A CVA agrupou segundo a presença e ausência de cromossomo B (10.000 permutações para distâncias de Mahalanobis e Hotelling entre os grupos, $p < 0,0001$). Observa-se variação morfológica na região anterior do corpo, sendo que os indivíduos com a presença de cromossomos B apresentaram a região ventral menos dilatada em relação aos indivíduos sem cromossomos B (Figura 5). Adicionalmente, a análise de função discriminante (DFA) mostrou diferença significativa (com 1000 permutações, $p < 0,0001$).

Segundo Sibbing e Nagelkerke (2001) a região ventral está relacionada à hidrodinâmica, na capacidade e velocidade de natação, sendo que uma menor profundidade corporal e comprimento do pedúnculo caudal indica uma maior velocidade natatória. Neste caso, é sugestivo de que a presença de cromossomo B possa estar relacionada a uma vantagem adaptativa sobre exemplares que não possuem este cromossomo nos ambientes analisados.

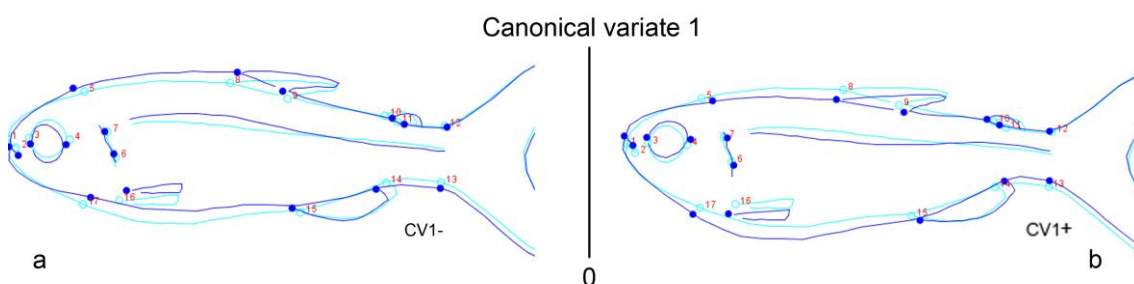


Fig. 5 - Representação da deformação em relação à configuração de referência. Linha azul escura, deformação. Linha azul clara, média. O eixo canônico negativo (**a**) corresponde às fêmeas com presença de cromossomo B. Já o eixo canônico positivo (**b**) corresponde às fêmeas com ausência de cromossomo B. Magnificação: 170.0.

Análise morfométrica para os cariomorfos $2n=48$ e $2n=50$.

Foi efetuada uma análise morfométrica específica para a localidade de Maringá, com vistas a buscar diferenças morfométricas para os dois cariomorfos encontrados. Devido à influência do dimorfismo, machos e fêmeas foram analisados separadamente.

Para as fêmeas, a CVA mostrou que há diferença entre os cariomorfos (10.000 permutações para distâncias de Mahalanobis e Procrustes entre os grupos, $p < 0,0001$). A análise de função discriminante apontou diferença significativa entre os cariomorfos (1.000 permutações, $p < 0,0001$). Os indivíduos $2n = 50$ apresentaram o corpo mais fusiforme, em relação aos $2n = 48$ (Figura 6). Já para os machos, a CVA acusou diferença (10.000 permutações para distâncias de Mahalanobis e Procrustes entre os grupos, $p=0,0006$), contudo a análise de função discriminante (1.000 permutações, $p=0,2800$) mostrou que essa diferença não é significativa.

Possivelmente os dados para os machos não foram significativos devido ao número amostral pequeno. Entretanto, os resultados reforçam os dados citogenéticos, de que as diferenças encontradas indicam a existência de

diferentes espécies no complexo *A. scabripinnis* nessa região (Fernandes e Martins-Santos, 2005).

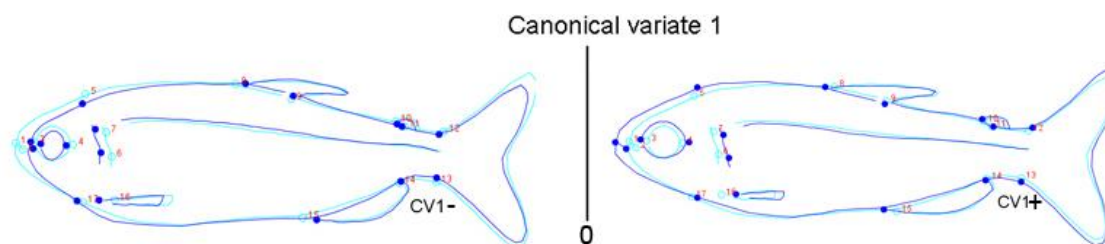


Fig. 6 – Representação da deformação em relação à configuração de referência. Linha azul escura, deformação. Linha azul clara, média. O eixo canônico negativo (**CV1-**) corresponde às fêmeas com presença de cromossomo B. Já o eixo canônico positivo (**CV1+**) corresponde às fêmeas com ausência de cromossomo B. Magnificação:150,0.

Idiogramas

Todas as populações possuem $2n=50$ cromossomos diferenciados em $6m+22sm+10st+12a$ e número de braços (NF) igual a 88, sendo que apenas na localidade de Maringá também foi observado um cariomorfo com $2n=48$ cromossomos, diferenciados em $8m+26sm+6st+8a$ (NF = 88).

O caráter $2n=50$ cromossomos é considerado ancestral no complexo “*scabripinnis*” e rearranjos do tipo translocação Robertsoniana estariam relacionados com a origem de números diploides menores (Vicari et al., 2008a), como observado em uma das populações de Maringá. Nossos dados reforçam esta hipótese e sugerem que outros rearranjos cromossômicos devem estar envolvidos na diversificação do cariótipo em *A. scabripinnis*, Embora o número de braços cromossômicos (NF) seja constante nas populações aqui analisadas (NF = 88), a localização dos genes ribossomais mostram uma diversidade cariotípica interpopulacional maior que o cariótipo evidencia.

Confirmamos no presente estudo que o cromossomo B observado em três das populações analisadas, Córrego das Pedras (1590m), Ribeirão Grande (1850m) e para o cariomorfo $2n=50$ de Maringá (400m), foram semelhantes, sendo do tipo metacêntrico grande, quase do mesmo tamanho aos do par 1 do complemento A e totalmente heterocromático. Também um cromossomo B parcialmente heterocromático foi evidenciado para o cariomorfo $2n=48$ da população de Maringá. Apenas na população de Ribeirão Grande 662m não foi encontrada a presença desse elemento supranumérico (Figura 7). Embora

sejam semelhantes na forma e tamanho relativo, outras análises são requeridas para uma comparação mais efetiva a nível da citogenética molecular entre estes cromossomos B nas diferentes populações.

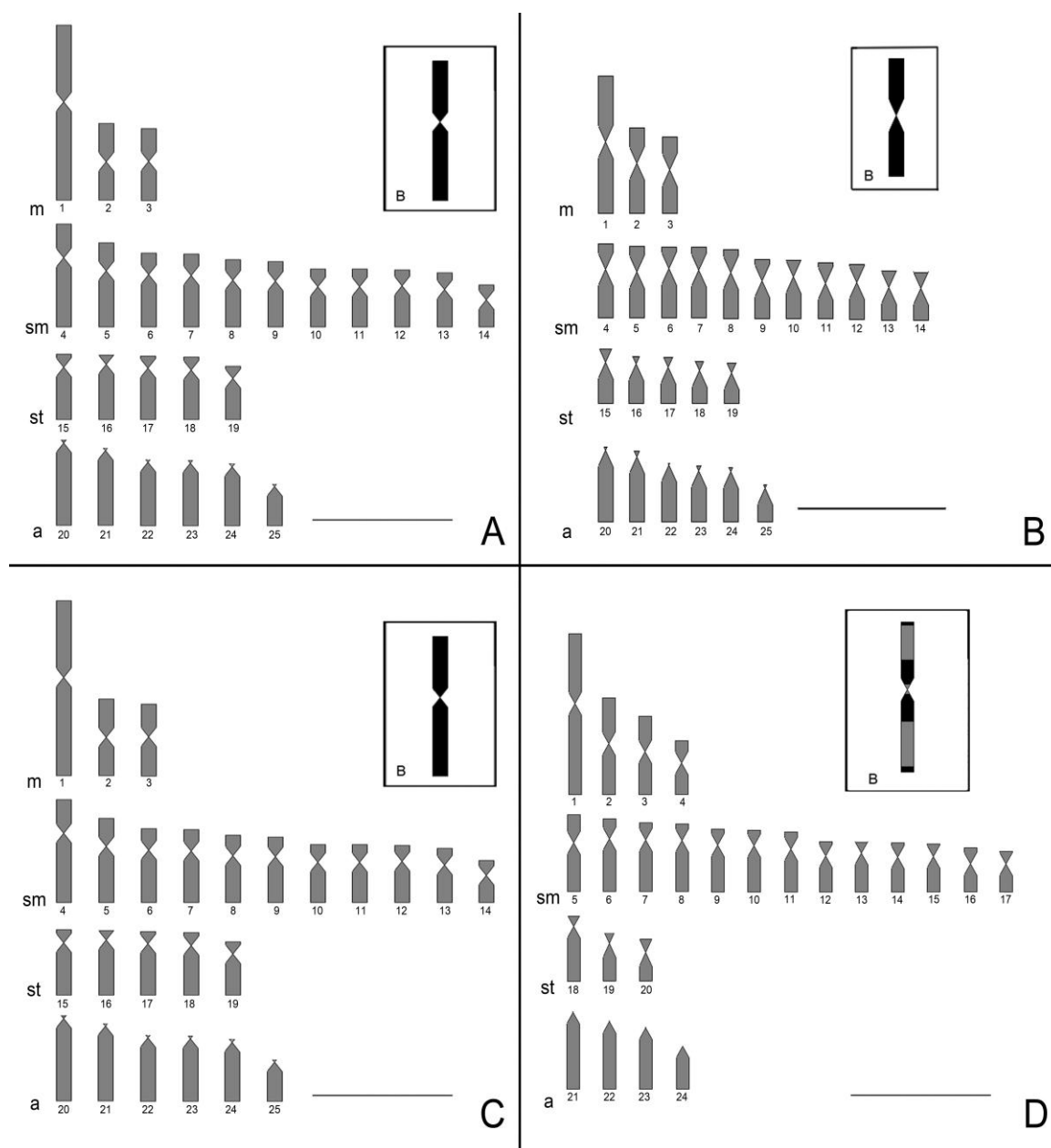


Fig. 7 – Idiograma das populações, mostrando em destaque o cromossomo B e sua heterocromatina. **A** – Córrego das Pedras (segundo cariótipo descrito por Salvador et al., (1992)); **B** – Ribeirão Grande 1850m e 662m (Rib. Grande 662m possui cariótipo igual, contudo o B é ausente), (segundo cariótipo descrito por Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000)); **C** – Maringá citótipo 2n=50 e **D** – Maringá citótipo 2n=48 (segundo cariótipo descrito por Fernandes e Martins-Santos (2005)). Barra: 10µm.

Hibridação in situ fluorescente

A análise da dupla FISH revelou sítios distintos de marcação para o rDNA maior (18S) e para o rDNA menor (5S) para todas as cinco populações analisadas. Quatro sítios de rDNA 18S foram localizados na população de

Ribeirão Grande (1850m) (Figura 8a), enquanto que para a população de Ribeirão Grande (662m) foram localizados seis sítios (Figura 8d) (As mesmas populações mostradas no artigo 1). A população do Córrego das Pedras (1590m) apresentou oito sítios para o rDNA maior (Figura 8g). Nas populações de Maringá (400m), $2n=48$ e $2n=50$, foram localizados oito sítios 18S (Figuras 8j e 8m). A exceção das populações de Maringá, em que o DNA ribossomal 18S foram observados na região terminal do maior par metacêntrico, em pares submetacêntricos medianos e subtelocêntricos, os cromossomos portando esses cístrons ribossomais nas demais populações ocorreram somente em pares subtelocêntricos e acrocêntricos, sempre na região terminal desses cromossomos.

Para os sítios de rDNA 5S, na população de Ribeirão Grande (1850m), foram localizados seis sítios, na região proximal/intersticial do braço curto de um par mediano e em dois pares pequenos (Figura 8b), enquanto que nos exemplares do Ribeirão Grande (662m), foram localizados oito sítios em pares subtelocêntricos e acrocêntricos (Figura 8e). Na população do Córrego das Pedras (1590m) foram localizados seis sítios do rDNA menor. Detalhe para a localização do sítio intersticial, perto do centrômero, de um par metacêntrico pequeno (Figura 8h). Nas populações de Maringá, $2n=48$ e $2n=50$ (Figura 8k e 8n, respectivamente), foram encontrados três sítios 5S. Em nenhuma das populações amostradas foi observada localização de rDNA 5S ou 18S sobre o cromossomo B e somente as populações do Ribeirão Grande (662m) e Córrego das Pedras (1590m) mostraram marcações em sintenia para os rDNA maior e menor (Figura 8f; i).

Diversos autores (Néo et al., 2000; Ferro et al., 2001; Mantovani et al., 2005 e Vicari et al., 2008a) comentam que o número de sítios e a localização do rDNA 18S em *Astyanax* é variável e múltiplo, sendo que sugere-se que mecanismos de transposição estariam relacionados para explicar essa grande variação (Fernandes e Martins-Santos, 2006; Vicari et al., 2008b), dados que corroboramos no presente estudo.

Diferentemente do que ocorre com o rDNA maior, os sítios de rDNA 5S em *Astyanax* tendem a ser conservados na região proximal do braço longo de dois pares cromossômicos, sendo um par acrocêntrico e outro metacêntrico (Ferro et al., 2001; Almeida-Toledo et al., 2002; Mantovani et al., 2005 e Vicari

et al., 2008a). Contudo há registro da ocorrência de mais pares cromossômicos portando esse sítio em algumas populações (Ferro et al., 2001). As populações do Ribeirão Grande (1850m) e Córrego das Pedras (1590m) apresentaram três pares cromossômicos portando sítios de rDNA 5S, com marcações homólogas ao já descrito na literatura para *Astyanax* (Almeida-Toledo et al. 2002; Mantovani et al. 2005; Vicari et al. 2008a; Vicari et al., 2011).

A sintenia do rDNA 5S com o rDNA 18S localizada em Ribeirão Grande (662m), em diferentes grupos de peixes esta característica pode ser considerada uma condição ancestral (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti, 2004; Vicari et al. 2006). Adicionalmente, dados semelhantes foram observados por Almeida-Toledo et al. (2002), com um sítio de rDNA 5S co-localizado com rDNA 28S em um dos pares acrocêntricos, em uma população de *A. scabripinnis* do Rio Tietê – SP e uma população de *A. fasciatus* do rio Mogi-Guaçu – SP.

Uma diversidade de marcação tão grande para a localização do rDNA menor como a aqui verificada nunca havia sido registrada em peixes. Os oito sítios de rDNA 5S da população do Ribeirão Grande (662m), assim como para os três sítios das populações de Maringá exemplificam esta dispersão atípica desta classe de DNA ribossomal. Mecanismos de dispersão como rearranjos cromossômicos, trocas inespecíficas entre cromossomos não homólogos e mecanismos de transposição são requeridos na tentativa de explicar essa diversidade de cistrons 5S.

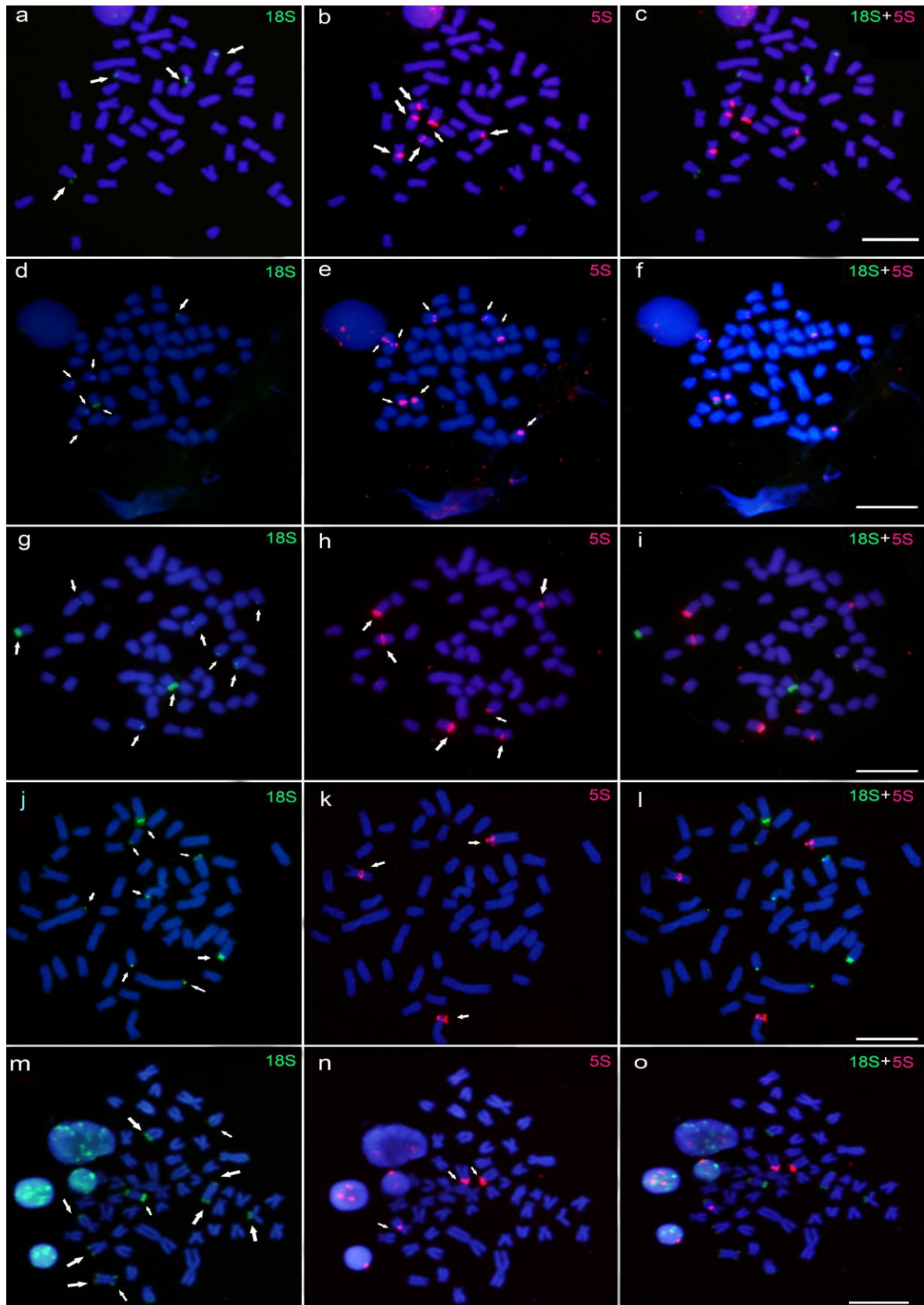


Fig. 8 – Hibridação *in situ* fluorescente com as sondas de rDNA 18S e rDNA 5S. (a, d, g, j e m, sonda 18S); (b, e, h, k e n, sonda 5S); (c, f, i, l e o, sobreposição das imagens), para as populações de Ribeirão Grande (1890m); Ribeirão Grande (662m); Córrego da Pedras (1590m), Maringá (400m) $2n=48$ e Maringá (400m) $2n=50$, respectivamente. As setas indicam a localização dos sítios do DNA ribossomal evidenciado pela FISH. Barra: $10\mu\text{m}$.

Ensaio de reprodução

Os ensaios de reprodução induzida semi-natural mostraram que somente os cruzamentos entre espécimes da mesma população produziram descendência. Os 20 cruzamentos de hibridação cruzada interpopulacional não resultaram em descendência, demonstrando um possível isolamento reprodutivo com ausência de indução a desova e espermição, mesmo com estímulo hormonal e nas mesmas condições ambientais em que os demais cruzamentos intrapopulacionais foram realizados. Também não fertilizaram ou produziram embriões os ovos obtidos por extrusão manual e fertilização a seco como convencionalmente é realizado para outros peixes. Observou-se, inclusive, que as fêmeas mostravam-se agressivas na presença de macho da outra população, perseguindo e afastando-os.

Os dados observados sugerem isolamento reprodutivo pré-zigótico e quebra de fluxo gênico entre as populações. Esta condição favorece a endogamia e pode resultar em especiação alopátrica (Futuyma, 2002).

Em conclusão, analisando-se o conjunto dos dados para as populações de *A. scabripinnis*, pode-se inferir um cenário evolutivo complexo, em que em um tempo geológico as populações estiveram relacionadas e no presente momento estão evoluindo independentemente. Os dados morfométricos agruparam todas as populações como espécies diferentes, bem como mostrou a influência do cromossomo B na morfologia corporal das fêmeas da população amostrada. A suposta similaridade da macroestrutura cariotípica entre as populações de Campos de Jordão e Maringá $2n=50$, com exceção do cariomorfo de Maringá $2n=48$, reforça a condição de um recente relacionamento temporal entre elas. Contudo as diferenças cariotípicas verificada por marcadores de citogenética molecular, somada as observações de reprodução, indicam divergência evolutiva devido às restrições de fluxo gênico.

Assim, o conjunto de dados sugere que existam espécies distintas em alopatria e em simpatria nas populações analisadas.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da dissertação no item **Referências Bibliográficas**.

Conclusões

No presente trabalho cinco populações de *Astyanax scabripinnis* foram analisadas com marcadores morfométricos e morfológicos, comportamento reprodutivo, além da citogenética.

A análise morfométrica mostrou nítida separação entre todas as populações. Com essa ferramenta, também foi possível inferir que há dimorfismo sexual intra e interpopulacional.

Os dados reprodutivos sugerem que há isolamento pré-zigótico entre as populações de Campos do Jordão.

Aliada a essa análise, dados de morfologia e citogenética evidenciaram similaridades e diferenças entre as populações em suporte a sistemática do grupo. Os dados das análises comparadas sugerem conservação de características ancestrais, tanto para a morfometria geométrica quanto para os cariótipos. Contudo, são apontadas diferenças anatômicas e cariotípicas, tanto nas populações isoladas em alopatria quanto para as populações simpátricas, de modo a valorizar a ausência de fluxo gênico entre estas.

As análises específicas mostraram diferenças na adaptação dos peixes em relação ao ambiente, tanto para a forma do corpo sugerindo melhor aproveitamento hidrodinâmico, quanto para a presença de cromossomos B, sendo este mais tolerável em ambientes favoráveis para a manutenção deste elemento. A diferença da morfologia corporal dos peixes que possuem esse cromossomo sugere um possível efeito adaptativo nas populações.

Observa-se, portanto, que essas populações são bastante diversas entre os caracteres analisados e que cada uma das populações de *A. scabripinnis* aqui analisadas representam espécies crípticas, evoluindo independentemente.

Referências Bibliográficas

- Adams, D. C.; Rohlf, F. J.; Slice, D. E.; Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, v. 71, p. 5 – 16, 2004.
- Almeida-Toledo, L.F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonillo, C.; Porto-Foresti, F.; Daniel-Silva, M. F. Z. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet. Genet. Res.*, v. 97, p. 229 – 233, 2002.
- Andrade, D. R.; Menin, E.; Ribeiro, S. P. Periodicidade da característica sexual secundária em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) Pisces, Characidae. *Rev. Seiva*, v. 44, n. 93, p. 9-12, 1984.
- Andrade, D. R.; Godinho, A. L.; Godinho, H. P.; Shimoda, E. Biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* (osteichthyes, characidae) na represa de Três Marias. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, v. 11, n. 3, p. 123-128, 2004.
- Artoni, R. F.; Vicari, M. R.; Bertollo, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Publicatio UEPG*, v. 6, n. 1, 2000.
- Artoni, R. F.; Shibatta, O. A.; Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Almeida, M. C.; Vicari, M. R.; Bertollo, L. A. C. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, v.4, p.197 – 202, 2006.
- Badyaev, A. V.; Hill, G. E.; Stoeck, A. M.; Nolan, P. M.; McGraw, K. J. The evolution of sexual size dimorphism in the house finch. II. Population divergence in relation to local selection. *Evolution*, v. 54, p. 2134 – 2144, 2000.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. E Moreira-Filho, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal Genetics*, v.1, p. 103 – 120, 1978.
- Britski, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática, p. 79-108. In: *Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguai. Poluição e piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, 1972, 108p.
- Britski, H. A.; Sato, Y.; Rosa, A. B. S. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco*. Brasília: CODEVASF, 1988. 115p.
- Bookstein, F. L. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, 1991.
- Bookstein, F. L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*. v. 58, p. 313-365, 1996.

- Buckup, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: Caramaschi, E. P.; Mazzoni, R.; Peres-Neto, P. R (eds). *Ecologia de Peixes de Riachos*. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, Rio de Janeiro, 1999.
- Calcagnotto, D.; Schaefer, S. A.; DeSalle, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, n. 36, v. 1, p. 135 - 153, 2005.
- Camacho, J. P.; Sharbel, T. F.; Beukeboom, L. W. B – chromosome evolution. *The Royal Society*. n. 355, p. 163-178. 2000.
- Caramaschi, E. P. *Estudos da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, Botucatu, SP. 1986.
- Clabaut, C.; Bunje, P. M. E.; Salzburger, W.; Meyer, A. Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptative character of the tanganyikan cichlid fish radiations. *Evolution*, n. 61, v. 3, p. 560-578, 2007.
- Diniz, D.; Melo, P. X. *Easy Idio*, versão 1.0, 2006.
- 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.
- Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.*, n.17, v.6, p. 368-376, 1981.
- Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas*, v. 141, p. 328-332, 2004.
- Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Parana´, Brazil. *Genetica*, v. 124, p. 301-306, 2005.
- Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C.; Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Parana´ river basin. *Brazil. Genet. Mol. Biol.*, v.29, p. 464 – 468, 2006.
- Ferreira-Neto, M.; Vicari, M. R.; Camargo, E. F., de; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology*, v.32, n.4, p. 792 – 796, 2009.
- Ferro, D. A. M; Néo, D. M; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): population distribution and functional diversity. *Genetica*, v. 110, p. 55 – 62, 2001.
- Ferro, D. A. M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica*, n. 119, p. 147–153, 2003.

- Fitch, W. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *The American Naturalist*, n. 111, p. 223 - 257, 1977.
- Froese, R.; Pauly, D. (Eds). *FishBase*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. acesso em: 21 nov. 2011.
- Futuyma, D. *Biologia Evolutiva*. 2a. ed. Funpec, 2002, 631p.
- Germann, C.; Pollet, M.; Tanner, S.; Backeljau, T.; Bernasconi, M. V. Legs of deception: disagreement between molecular markers and morphology of long-legged flies (Diptera, Dolichopodidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, n. 48, p. 238-247, 2009.
- Gery, J. *Characoids of the World*. New Jersey, T. F. H. Publications, 1977, 672 p.
- Google Scholar, Disponível em: < <http://scholar.google.com.br>>. Acesso em 21 nov. 2011.
- Graça, W. J.; Pavanelli, C. S. *Peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM, 2007.
- Greenwood, P. H.; Rosen D. E.; Weitzman, S. H.; Myers, G. S. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 131, n. 4, p.339 - 456, 1966.
- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser*, v. 41, p. 95 - 98, 1999.
- Hall, T. A. *Phylogenetic tree made easy. A how to manual for molecular biologists*. Massachusetts: Sinauer Associates, 179p.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D.; PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* v. 4, n.1, p. 1-9, 2001.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 122, p. 239–244, 2004.
- Hebert, P. D. N.; Ratnasingham, S.; deWaard, J. R.; Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* v. 270, p. 96 - 99, 2003.
- Hotelling, H. The Generalization of Student's Ratio. *Ann. Math. Statist.*, v. 2, n. 3, p. 360 – 378, 1931.
- Howell, W. M.; Black, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014 – 1015, 1980.
- Ihering, R. V.; Azevedo, P. As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). *Arch. Inst. Biol.*, v. 7, n. 3, p. 75-110, 1936.

- Jesus, C. M.; Moreira-Filho, O. Chromosomal location 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia*, v. 56, p. 281–287, 2003.
- Kantoussan, J.; Ecoutin, J. M.; Fontenelle, G.; Thiaw, O. T.; Morais, L. T.; Laë, R. The relevance of size parameters as indicators of fishery exploitation in two West African reservoirs. *Aquatic Ecology*, v. 43, p. 1167-1178, 2009.
- Kavalco, K. F.; Moreira-Filho, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia*, v. 56, n. 4, p. 453-461, 2003.
- Kavalco, K. F. *Estudos Evolutivos no Gênero Astyanax (Pisces, Characidae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- Klingenberg, C. P.; Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, v. 287, p. 3-10, 2002.
- Klingenberg, C. P.; Barluenga, M.; Meyer, A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* v. 56, p.1909–1920, 2002.
- Klingenberg, C. P.; MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, v. 11; p. 353-357, 2011.
- Kligerman, A. D.; Bloom, S. E. Rapid chromosome preparation from solid tissues of fishes. *J. Fish Res. Board. Can.* v. 43, p. 266-269, 1977.
- Langerhans, R. B.; Layman, C. A.; Langerhans, A. K.; Dewitt, T. J. Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 80, p. 689-698, 2003.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v. 52, p. 201-220, 1964.
- Lewinsohn, D. K.; Prado, P. I. *Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento*. São Paulo: Editora Contexto, 2002.
- Lima, F. C. T. et al. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E.; S. O. Kullander; Ferraris JR. C. J. (Org.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p. 106-169.
- Maistro, E. L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Occurrence of macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, v. 87, p. 101-106, 1992.
- Maistro, E. L.; Foresti, F.; Oliveira, C. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Revista Brasileira de Genética*, v. 17, n. 2, p. 153-156, 1994.
- Malabarba, L. R. Monophyly of Cheirodontinae, characters and major clades. p.193-233. In: Malabarba, L. R., Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S; & Lucena, C. A.

- S (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, EDIPUCRS, 1998, 603p.
- Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Mestriner, C. A.; Moreira-Filho, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, v. 109, p. 161-168, 2000.
- Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Moreira-Filho, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, v.123, p. 211 – 216, 2005.
- Marinho, M. M. F.; Lima, F. C. T. *Astyanax ajuricaba*: a new species from the Amazon basin in Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotrop. Ichthyol.*, v. 7, n. 2, p. 169 - 174, 2009.
- Martins, C.; Galetti, P. M. Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom. Res.*, v. 7, p. 363–367, 1999.
- Menezes, M. R.; Quasim, S. Z. Biochemical genetics of some Indian fishes. *Indian Journal of Fisheries*, n. 40, v. 3, p. 142-155, 1993.
- Mestriner C. A.; Galetti, P. M. Jr; Valentini, S. R.; Ruiz, I. R. G; Abel L. D. S; Moreira-Filho O; Camacho, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* an isochromosome. *Heredity*, v.85, p. 1 – 9, 2000.
- Mizoguchi, S. M. H. N.; Martins-Santos, I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas*, n. 127, p. 249-253, 1997.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. *Brazil J. Genet.* v. 14, p. 331–357, 1991.
- Moreira-Filho O.; Galetti JR., P. M.; Bertollo, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenetic Genome Research*, v. 106, p. 230-234, 2004.
- Moreira, C. L. R. *Relações filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei, Ostariophysi)*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2007.
- Murray, M. G.; Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research, Stanford*, v.8, n.19, p.4321-4325, 1980.
- Nelson, J. S. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, New York, 600p. 1994.
- Nelson, J. S. *Fishes of the world*. 4 ed., Hoboken, John Wiley & Sons, 624p. 2006.
- Néo, D. M.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity*, v. 85, p. 136-141, 2000
- Oliveira, E. C.; Ferreira, E. J. G. Ocorrência de ovos e larvas de Characiformes migradores no Rio Negro, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 32, p. 163-168, 2002.

- Oliveira, C.; Foresti, F.; Hilsdorf, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 35, p. 81 – 100, 2009.
- Pie, M. R.; Baggio, R. A.; Boeger, W. A.; Patella, L. A.; Ostrensky, A.; Vitule, J. R. S.; Abilhoa, V. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçu River. *Journal of Fish Biology*, v. 75, p. 2357 – 2362, 2009.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 2934–2938, 1986.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E. L.; Foresti, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a smallstream. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, n. 3, p. 377-380, 1997.
- Porto-Foresti, F.; Castilho-Almeida, R.B.; Foresti, F. Biologia e criação do lambari-dorabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: *Espécies Nativas para Piscicultura no. Santa Maria*: Ed UFMS, 2005, 468p.
- Povh, J. A.; Lopera-Barrero, N. M.; Ribeiro, R. P.; Lupchinski Jr, E.; Gomes, P. C.; Lopes, T. S. Genetic monitoring of fish repopulation programs using molecular markers. *Ciencia e Investigación Agraria*, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2008.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. L. (EDS.). *Checklist of the freshwater fishes of the South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 2003, 729 p.
- Rocon-Stange, E. A.; Almeida-Toledo, L. F. Supernumerary B chromosome restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, v. 16, p. 601 – 615, 1993.
- Rohlf, F. J.; Morphometrics, *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, v. 21, p. 299-316, 1990.
- Rohlf, F. J.; *tpsDig*, version 2.16. Departament of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>), acessado em 22/Agosto/2011), 2010a.
- Rohlf, F. J.; *tpsUtil*, version 1.46. Departament of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>), acessado em 22/Agosto/2011), 2010b.
- Ryder, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, n. 1, p. 9 -1 0, 1986.
- Saitou N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* v.4, p. 406-425, 1987.
- Salvador, L. B.; Moreira-Filho, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, v. 69, p. 50 - 56, 1992.
- Sharp, F. R.; Jickling, G. C.; Stamova, B.; Tian, Y.; Zhan, X.; Liu, D.; Kuczynski, B.; Cox, C. D.; Ander, B. P. Molecular markers and mechanisms of stroke: RNA studies of blood in animals and humans. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 31, p. 1513 – 1531, 2011.

- Shibatta, O. A.; Artoni, R. F. Sobre a identidade das populações alopátricas de *Astyanax* (Characiformes, Characidae) das formações Furna 1 e Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*. v.11, n.2, p.7-12, 2005.
- Sibbing, F. A.; Nagelkerke, L. A. J. Resource partitioning by Lake Tana barbs predicted from fish morphometrics and prey characteristics, *Reviews in Fish Biology and Fisheries* n. 10, p. 393–437, 2001.
- Song, H.; Buhay, J. E.; Whiting, M. F.; Crandall, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified, *PNAS*, n. 36, v. 105, 2008.
- Stamatakis, A.; Hoover, P.; Rougemont, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers, *Systematic Biology*, n. 75, v. 5, p. 758 - 771, 2008.
- Swain, D. P.; Foote, C. J. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, n. 43, p. 113-128, 1999.
- Swofford, D. L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0, 2002. Disponível em <<http://paup.csit.fsu.edu/index.html>>. Acesso em 24 nov. 2011.
- Sumner, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, v. 74, p. 304 - 306, 1972.
- Telenius, H.; Carter, N. P.; Bebb, C. E.; Nordenskjöld, M.; Ponder, B. A.; Tunnacliffe, A. Degenerate oligonucleotideprimed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, v.13, p. 718–725, 1992.
- Torres, R. A.; Matoso, D. A.; Artoni, R. F. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de peixes neotropicais. *Publicatio UEPG, Ciências Biológicas e da Saúde*, n. 10, v. 2, p. 27-37, 2004.
- Tinti, F.; Ungaro, N.; Pasolini, P.; Pafilis, M. de; Garoia, F.; Guarniero, I.; Sabelli, B.; Marano, G.; Piccinetti, C. Development of molecular and morphological markers to improve species-specific monitoring and systematics of Northeast Atlantic and Mediterranean skates (Rajiformes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 288, p. 149-165, 2003.
- Vari, R. P.; Malabarba, L. R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: *Phylogeny and Classification of neotropical Fishes* (Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 1-11. 1998.
- Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genet. Mol. Biol.*, v. 29, p. 621–625, 2006.
- Vicari, M. R.; Noleto, R. B.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 173–179, 2008a.

- Vicari, M. R.; Artoni, R. F.;, Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*. *Cytogenet. Gen. Res.*, v. 122, p. 67 – 72, 2008b.
- Vicari, M. R.; Nogaroto, V.; Noletto, R. B.; Cestari, M. M.; Cioffi, M. B.; Almeida, M. C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C.; Artoni, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol.*, v. 76, p. 1094-1116, 2010.
- Vicari, M. R.; Pistone, H. F. de M.; Castro, J. P.; Almeida, M. C.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J. P. M.; Artoni, R. F. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica*, v.139, p. 1073 – 1081, 2011.
- Vrijenhoek, R. C.; Conservation of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, n. 53, p. 394-412, 1998.
- Ward R. D.; Zemlak T. S.; Innes B. H.; Last, P. R.; Hebert, P. D. N.; DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 360, p. 1847-1857, 2005.
- Weitzman, S. H.; Vari, R. P. Miniaturization in South American freshwaters fishes: an overview and discussion. *Proceedings Biological Society Washington*, v. 101, n. 2, p. 444-465, 1988.
- White T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, L. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego, 1990, 482 pp.

5 Anexos

5.1 Protocolos – Citogenética Convencional

5.1.1 Obtenção de metáfases mitóticas – método direto (Bertollo et al., 1978)

Injetar intraperitonealmente no peixe, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução de colchicina (0,025%), na proporção de 1ml por 100g de massa corpórea do animal;

Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 40 minutos sacrificando-o posteriormente para a retirada de seu órgão hematocitopoiético: rim anterior ou posterior;

Colocar o tecido em 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C;

Fragmentar esse material, com auxílio de pinça de dissecação desprovida de agulha, aspergindo e expirando o material até que fique homogêneo;

Transferir o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga. Deixá-lo em estufa ou banho-maria a 37°C por 20 minutos (pedaços de tecidos ainda não desfeitos são descartados);

Acrescentar 1ml de fixador Carnoy recém preparado (álcool metílico : ácido acético 3:1), e ressuspender o material deixando-o em temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugá-lo durante 10 minutos a $1,19 \times 10^12g$;

Descartar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur;

Adicionar 6-8 ml de fixador;

Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a $1,19 \times 10^12g$;

Descartar o sobrenadante e repetir esse procedimento;

Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não esteja muito diluída e nem muito concentrada (cerca de 1 ml de fixador para 0,5 ml de sedimento). Ressuspender o material com cuidado até ficar homogêneo;

Colocar uma lâmina limpa em água a 60° C. Pingar três gotas da suspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina pré-aquecida e secar ao ar;

O material deve ser guardado em tubos tipo eppendorf e mantidos em freezer à -20°C.

5.1.2 Método de coloração convencional Giemsa

Para analisar o número e morfologia dos cromossomos, as lâminas preparadas com a suspensão celular foram coradas com solução do corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄) a 5% durante aproximadamente 10 minutos e em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

5.1.3 Identificação cromossômica

A identificação cromossômica foi realizada baseada nos critérios da relação de braços (RB), proposta por Levan et al., (1964) e classificados como metacêntricos (m) (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB= 1,71 a 3,00); subtelocêntricos (st) (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB>7,00). As metáfases foram capturadas por câmara CCD Olympus DP71 com resolução de 13mp acoplada a um Microscópio Olympus BX 40 com o programa ImageProPlus 5.0.

5.2 Protocolos Citogenética Molecular

5.2.1 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Pinkel et al., 1986).

I – Obtenção das sondas

Para a identificação das regiões de DNAr 5S foi utilizada a sonda obtida usando os primers A 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (Martins e Galetti, 1999). A sonda de DNAr 18S foi obtida a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti., 2004).

II - Marcação de sonda por *nick translation*

Misturar 4 µl do mix de *nick translation* com 1,5 µg do DNA de interesse e completar com água destilada, para volume final de reação de 20 µl. Deixar a reação durante 1h e 30min a 15°C. Após adicionar 2 µl de EDTA 0,5 M e deixar a reação a 65°C durante 15 min, para inativação da reação.

III – Marcação da sonda por PCR

Nas reações de amplificação e marcação por PCR, utilizou-se os nucleotídeos modificados dUTP biotina ou dUTP digoxigenina.

IV – Observação dos tamanhos dos fragmentos em gel

Misturar 3 µl da reação de nick translation ou de PCR com 1 µl de azul de bromofenol e aplicar em gel de agarose 1% e 3 µl gel red;

Aplicar a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos;

V – Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

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

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

Incubar as lâminas em 90 µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;

Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;

Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez;

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

Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação;

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

Desnaturar em série alcoólica, a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;

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

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

Preparar câmara úmida à 37°C;

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

VI - Lavagens

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

Lavar as lâminas três vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada sob agitação;

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

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

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

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/ 800 µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

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

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

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

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

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

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

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

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/800 µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

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

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

V – Montagem da lâmina

Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI – 4'-6 diamidino – 2 - phenilindole (50 µg/ml);

Colocar 25 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

5.2.3 Análise dos Marcadores citogenéticos

Para cada uma das técnicas aplicadas foram examinadas 30 células metafásicas ou meióticas. As preparações foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 40 e capturadas com câmera digital CCD Olympus DP71 13 mp. Para a análise com DAPI foi utilizado filtro de comprimento de onda variando de 360 a 390 nm.

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

I - Analise marcação tréplicas

Wilks's lambda: 0,9101

df1:68

df2:1326

F: 0,9405

P(same):0,615

Pillai trace: 0,09181

df1:68

df2:1328

F:0,9396

P(same):0,6171

Eigenvalue 1: 0,06412 Percent: 66,31

Eigenvalue 2: 0,03258 Percent:33,69

Hotelling's pairwise comparisons, Bonferroni corrected \ uncorrected

	001FCP1	001FCP2	001FCP3
001FCP1		0,402282	0,313431
001FCP2	1		0,954604
001FCP3	0,940292	1	

Wilks' s lambda: 0,9058

df1:68

df2:666

F: 0,4969

P(same):0,9998

Pillai trace: 0,09591

df1:68

df2:668

F:0,4948

P(same):0,9998

Eigenvalue 1: 0,07888 Percent: 77,18

Eigenvalue 2: 0,02332 Percent:22,82

	079FRA1	079FRA2	079FRA3
079FRA1	0	0,999923	0,872295
079FRA2	1	0	0,997036
079FRA3	1	1	0

II – CVA geral

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: Análises

Classification criterion: Pop

Groups	Observations
1. CP	234
2. MG	96
3. RA	180
4. RB	189

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

Eigenvalues % Variance Cumulative %

1.	4,40380786	59,396	59,396
2.	2,17634175	29,353	88,749
3.	0,83422634	11,251	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	CP	MG	RA
MG	5,3109		
RA	5,2524	4,4664	
RB	3,3222	3,7469	4,5966

Procrustes distances among groups:

	CP	MG	RA
MG	0,0363		
RA	0,0234	0,0293	
RB	0,0174	0,0249	0,0199

Classification criterion: Pop

Groups	Observations
1. RA	180
2. RB	189

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	5,40411213	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	RA
RB	4,6381

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

	RA
RB	<.0001

Procrustes distances among groups:

	RA
RB	0,0199

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

	RA
RB	<.0001

III – DFA geral

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- F, MG

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03392611

Mahalanobis distance: 8,5762

T-square: 2303,4661, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- F, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02288193

Mahalanobis distance: 5,6693

T-square: 1960,9793, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- F, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01720377

Mahalanobis distance: 3,9469

T-square: 985,1087, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- M, CP

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01170905

Mahalanobis distance: 2,4736

T-square: 311,8237, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- M, MG

Difference between means:

Procrustes distance: 0,04178945

Mahalanobis distance: 8,6925

T-square: 3170,3327, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- M, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02472018

Mahalanobis distance: 7,1761

T-square: 2763,4191, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, CP -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02336737

Mahalanobis distance: 5,1136

T-square: 1437,2259, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, MG -- F, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02814000

Mahalanobis distance: 6,8048

T-square: 1295,5588, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, MG -- F, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02386291

Mahalanobis distance: 5,8789

T-square: 982,8269, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, MG -- M, CP

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03404849

Mahalanobis distance: 8,0013

T-square: 1642,6554, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, MG -- M, MG

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02138513

Mahalanobis distance: 4,7375

T-square: 519,7162, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, MG -- M, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02398111

Mahalanobis distance: 5,8213

T-square: 892,0742, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, MG -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02409312

Mahalanobis distance: 7,0031

T-square: 1306,2305, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RA -- F, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01999839

Mahalanobis distance: 5,4156

T-square: 1494,4644, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RA -- M, CP

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02648801

Mahalanobis distance: 5,7563

T-square: 1413,9728, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RA -- M, MG

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03773389

Mahalanobis distance: 7,6782

T-square: 2132,5616, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RA -- M, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01214132

Mahalanobis distance: 3,0240

T-square: 407,3785, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RA -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02746888

Mahalanobis distance: 6,4912

T-square: 1914,7750, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RB -- M, CP

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02030072

Mahalanobis distance: 3,1943

T-square: 446,4122, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RB -- M, MG

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03557951

Mahalanobis distance: 5,7090

T-square: 1204,1258, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RB -- M, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02006214

Mahalanobis distance: 4,9748

T-square: 1131,6378, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: F, RB -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01806732

Mahalanobis distance: 3,0052

T-square: 421,4573, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: M, CP -- M, MG

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03877593

Mahalanobis distance: 10,1690

T-square: 3349,0491, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: M, CP -- M, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02717395

Mahalanobis distance: 7,0892

T-square: 1957,0882, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: M, CP -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02110581

Mahalanobis distance: 4,1949

T-square: 697,2407, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: M, MG -- M, RA

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03103473

Mahalanobis distance: 7,1557

T-square: 1713,1325, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: M, MG -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02470268

Mahalanobis distance: 5,2552

T-square: 937,8082, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: M, RA -- M, RB

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02281723

Mahalanobis distance: 6,6289

T-square: 1811,9977, P-value (parametric): <.0001

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

IV – CVA fêmeas

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: F

Classification criterion: Pop

Groups	Observations
1. CP	159
2. MG	39
3. RA	99
4. RB	105

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	5,13365582	57,158	57,158
2.	2,66048281	29,622	86,780
3.	1,18736653	13,220	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	CP	MG	RA
MG	6,1548		
RA	5,5577		5,1511
RB	3,9584	4,6556	5,0309

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

	CP	MG	RA
MG	<.0001		
RA	<.0001		<.0001
RB	<.0001	<.0001	<.0001

Procrustes distances among groups:

	CP	MG	RA
MG	0,0339		
RA	0,0229		0,0281
RB	0,0172	0,0239	0,0200

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

	CP	MG	RA
MG	<.0001		
RA	<.0001		<.0001
RB	<.0001	<.0001	<.0001

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: F

Classification criterion: Pop

Groups Observations

1. RA 99
2. RB 105

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	7,39713497	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	RA
RB	5,4151

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

	RA
RB	<.0001

Procrustes distances among groups:

	RA
RB	0,0200

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

	RA
RB	<.0001

V – CVA machos

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: M

Classification criterion: Pop

Groups	Observations
1. CP	75
2. MG	57
3. RA	81
4. RB	84

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	6,74205467	58,807	58,807
2.	3,77843420	32,957	91,763
3.	0,94431687	8,237	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	CP	MG	RA
MG	6,7546		
RA	6,6806	5,2822	
RB	4,1527	4,1452	5,5789

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

	CP	MG	RA
MG	<.0001		
RA	<.0001	<.0001	
RB	<.0001	<.0001	<.0001

Procrustes distances among groups:

	CP	MG	RA
MG	0,0388		

RA	0,0272	0,0310	
RB	0,0211	0,0247	0,0228

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

	CP	MG	RA
MG	<.0001		
RA	<.0001	<.0001	
RB	<.0001	<.0001	<.0001

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: M

Classification criterion: Pop

Groups		Observations
1.	RA	81
2.	RB	84

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	11,11594082	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	RA
RB	6,6287

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

RA

RB <.0001

Procrustes distances among groups:

RA
RB 0,0228

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

RA
RB <.0001

VI – CVA análise B

Dataset: Análise B FCP

Classification criterion: Presença B

Groups	Observations
1. n	19
2. s	9

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	1906,32608233	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

n
s 90,0879

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

n
s <.0001

Procrustes distances among groups:

n
s 0,0283

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

n
s <.0001

VII – DFA análise B

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: n -- s

Difference between means:

Procrustes distance: 0,02830546

Mahalanobis distance: 90,0879

T-square: 49564,4782, P-value (parametric): 0,0921

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Classification/misclassification tables

Group 1: n

Group 2: s

From discriminant function:

True	Allocated to		
Group	Group 1	Group 2	Total

Group 1	19	0	19
Group 2	0	9	9

From cross-validation:

True Group	Allocated to		Total
	Group 1	Group 2	
Group 1	19	0	19
Group 2	0	9	9

VIII – CVA Análise citótipos Maringá

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: F

Classification criterion: Cit.

Groups	Observations
1. a	9
2. b	9

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	988,27288588	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

a	
b	59,2778

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

a	
b	<.0001

Procrustes distances among groups:

	a
b	0,0340

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

	a
b	<.0001

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: M

Classification criterion: Cit.

Groups	Observations
1. a	3
2. b	12

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

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	35,66960882	100,000	100,000

Mahalanobis distances among groups:

	a
b	13,9000

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

a
b 0,0006

Procrustes distances among groups:

a
b 0,0174

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

a
b 0,2772

IX – DFA citótipos Maringá

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: a -- b

Difference between means:

Procrustes distance: 0,03395497

Mahalanobis distance: 59,2778

T-square: 15812,3662, P-value (parametric): 0,0997

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

Procrustes distance: <.0001

T-square: <.0001

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

Classification/misclassification tables

Group 1: a

Group 2: b

From discriminant function:

True	Allocated to		
Group	Group 1	Group 2	Total
Group 1	9	0	9
Group 2	0	9	9

From cross-validation:

True	Allocated to		
Group	Group 1	Group 2	Total
Group 1	9	0	9
Group 2	0	9	9

Discriminant Function Analysis 'Discriminant function ...'

Comparison: a -- b

Difference between means:

Procrustes distance: 0,01735732

Mahalanobis distance: 13,9000

T-square: 463,7049, P-value (parametric): 0,4436

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

Procrustes distance: 0,2800

T-square: 0,0040

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

5.4 Parecer 02/2008 (protocolo 04509/08) da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**SCEEa**

SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAIS

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

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 - Ponta Grossa - PR - BRASIL
Bloco M Sala 12 - Campus Universitário em Uvaranas
Fone (42) 3220-3108 - Fax: (42) 3220-3102
e-mail: seccoesp@uepg.br Home page: www.uepg.br

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



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Taxons autorizados

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

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

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

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

Código de autenticação: 85979796



Página 2/2