

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

ANGELITA BARTH

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CARIOTÍPICA DE *Astyanax bifasciatus*  
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) FRENTE À MORFOFISIONOMIA DO RIO IGUAÇU

PONTA GROSSA

2018

ANGELITA BARTH

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CARIOTÍPICA DE *Astyanax bifasciatus*  
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) FRENTE À MORFOFISIONOMIA DO RIO IGUAÇU

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.  
Coorientador: Dr. Vinícius Abilhoa.

PONTA GROSSA

2018

B283 Barth, Angelita  
Diversidade morfológica e cariotípica de *Astyanax bifasciatus*  
(Teleostei, Characidae) frente à morfofisionomia do rio Iguazu / Angelita Barth.  
Ponta Grossa, 2018.  
96 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.  
Coorientador: Prof. Dr. Vinícius Abilhoa.

1. Geomorfologia. 2. Análises integrativas. 3. Evolução. I. Artoni, Roberto  
Ferreira. II. Abilhoa, Vinícius. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia  
Evolutiva. IV.T.

CDD: 574



## Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



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



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2018

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

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, no auditório do Programa, 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) **Angelita Barth**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador UEPG), Dr<sup>a</sup> Patricia Barbosa (UNESPAR) e Dr. Mateus Henrique Santos (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Diversidade Morfológica e Carlotípica de *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) frente à Morfofisionomia do Rio Iguaçu**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 21 de fevereiro de dois mil e dezoito.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Barbosa (UNESPAR)

Prof. Dr. Mateus Henrique Santos (UEPG)

*Roberto Ferreira Artoni*  
*Patricia Barbosa*  
*Mateus Henrique Santos*

Dedico este trabalho aos  
meus pais Vera e Ademar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida que sempre me guiaram, protegeram e me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais Vera Barth e Ademar Barth que sempre me apoiaram, nunca mediram esforços para me ver bem, me deram todo o amor e carinho do mundo e suportaram junto comigo a distância e a saudade. Pois morar longe da família é difícil tanto para quem vai embora, quanto para quem fica. Obrigada por tudo, vocês são meu exemplo, amo vocês!

Ao meu Orientador, professor Dr. Roberto Ferreira Artoni por me receber de braços abertos, ter toda paciência, carinho e atenção comigo. Agradeço também pelas orientações, auxílio e empenho na busca dos resultados.

Ao meu coorientador, professor Dr. Vinícius Abilhoa pelas contribuições, a preocupação, o carinho, o empenho nas coletas, e os ensinamentos me passados.

À professora Dra. Carla Andreia Lorscheider da UNESPAR pela confiança e carinho que sempre teve comigo, me indicando para o mestrado. Sem sua indicação nada disso seria possível!

Ao técnico do laboratório de Genética Evolutiva da UEPG, senhor Miguel Airton Carvalho pelo auxílio nas coletas e a prontidão no atendimento sempre que necessitei.

À secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva Zoli Oliveira pelo bom atendimento prestado.

Ao meu colega de laboratório Jonathan Pena Castro por me ensinar diversas técnicas e auxiliar na sua execução, por me socorrer quando eu fazia algo errado e por ressuscitar meu notebook diversas vezes. Johnny, você é ninja!

À minha colega de laboratório Luz Elena De la Ossa Guerra pela parceria dentro laboratório na execução das técnicas e fora dele como amiga e em discussões construtivas.

Aos demais colegas de laboratório, Matheus Azambuja, Bruno Kubis, Fernanda Silva, Camila dos Anjos e Miguel Soto pela parceria e auxílio;

Ao Augusto Ferreira pela elaboração do mapa da localização dos pontos de coleta deste trabalho e pelo auxílio nas coletas.

À Ana Paolla Potachevicz por me permitir a “invasão” do laboratório de microbiologia e a utilização de equipamentos.

Ao meu coorientado Kevin Kriger pelo auxílio na análise das lâminas.

Ao meu colega da UFPR Roger Dalcin por me ensinar a realizar as análises morfométricas.

À Maelin Silva pela coleta dos espécimes do baixo Iguaçu.

Aos colegas do laboratório de Citogenética de peixes da UFSCar, especialmente Cassia Yano, Terumi Hatanaka e o professor Marcelo de Bello Cioffi, pelos ensinamentos que me foram passados, também pelo carinho e paciência que tiveram comigo.

Ao Felipe Barby, que foi um grande companheiro de laboratório e um amigo.

À Thais Dulz e Ieda Schleger pelo apoio no início do mestrado e o acolhimento em sua casa quando me mudei para Ponta Grossa. Também pelos bons conselhos.

À Dona Lídia Kozluk (*in memorian*) por ser minha “vovó” em Ponta Grossa. Que você esteja com Deus vovó!

Aos coordenadores e funcionários do reservatório da SANEPAR em Piraquara, pela autorização de coleta no reservatório, também pelo auxílio prestado e pela preocupação que tiveram durante as coletas realizadas no local.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação de Biologia Evolutiva, pelas contribuições e pelo conhecimento transmitido.

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

Ao Museu de História Nacional do Capão da Imbuia por me ceder material biológico e equipamentos.

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

Aos professores da banca, pelas contribuições.

Agradeço imensamente a todos os que estiveram envolvidos direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Não corras atrás das borboletas, plante uma flor em seu  
jardim e as borboletas virão até ela.”

D. Elhers

## RESUMO

Os processos geomorfológicos que ocorrem na formação dos ambientes afetam a história evolutiva das espécies, o que no caso das espécies de peixes dulcícolas é ainda mais efetivo, podendo remeter à ligação ou separação das bacias hidrográficas no passado. Uma vez que tais processos afetam a distribuição, abundância e diversificação dos peixes nestas regiões geográficas. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi inferir a diversidade e variabilidade de *Astyanax bifasciatus* ao longo da bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Para isto, foram utilizadas análises morfométricas relacionadas ao tamanho do corpo e da cabeça dos indivíduos do alto, médio e baixo rio Iguaçu. Além de análises citogenéticas, incluindo a coloração convencional com Giemsa, a localização das regiões organizadoras de nucléolo por impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs), a detecção da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C, e a hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S, do gene DNAsn U2 e de sequências de DNA telomérico. Os resultados das análises morfológicas indicaram significativa diferenciação entre as populações de *A. bifasciatus* das três regiões da bacia do rio Iguaçu, sendo a localização das nadadeiras o caráter mais variável. A citogenética revelou mesmo número diplóide de cromossomos (50) para as populações do médio e alto rio Iguaçu, assim como mesmo número fundamental (86) e fórmula cariotípica ( $6m+24sm+6st+14a$ ). Já a população do baixo rio Iguaçu teve número diploide de 48 cromossomos,  $NF=82$  e  $FC=6a+22sm+6st+14a$ . As Ag-RONs foram múltiplas para a população do médio Iguaçu e simples para as do alto e baixo Iguaçu, com sua localização em sua maioria coincidente com o DNAr 18S. O bandamento C demonstrou marcações centroméricas e pericentroméricas para as três populações, assim como marcações teloméricas heterogêneas entre elas. As marcações de 5S e 18S foram variáveis, com marcações de 5S coincidindo a sítios heterocromáticos em todas as populações. Os sítios de DNAsn U2 foram variáveis entre as populações, com sua localização em um par cromossômico na população do médio Iguaçu e em apenas um homólogo nas demais. O mapeamento do DNA telomérico na população do baixo rio Iguaçu, revelou marcações na região telomérica da maioria dos cromossomos, bem como, na região centromérica de um par cromossômico. Portanto, estes diferentes níveis de análise demonstraram grande diferenciação entre as populações de *A. bifasciatus* do alto, médio e baixo rio Iguaçu, provavelmente em decorrência de eventos tectônicos ocorridos na região.

Palavras chave: Geomorfologia, Análises Integrativas, Evolução.

## ABSTRACT

The geomorphological processes that occur in the formation of environments affect the evolutionary history of the species, which in the case of freshwater is even more effective, and can refer to the connection or separation of the hydrographic basins in the past. Since these processes affect the distribution, abundance and diversification of fish in these geographical regions. In this regard, the objective of the present work was to infer the diversity and variability of *Astyanax bifasciatus* along the Iguaçú river basin. For this, was used morphometric analyzes related to the body and head size of the individuals of the upper, middle and lower regions of the Iguaçú river basin. And cytogenetic analyzes, including conventional staining with Giemsa, localization of nucleolar organizer regions by impregnation with silver nitrate, detection of constitutive heterochromatin by C-banding method and fluorescent in situ hybridization using rDNA probes 5S and 18S, snDNA U2 gene and telomeric DNA sequences. The results of the morphological analyzes indicated a significant differentiation between the populations of *A. bifasciatus* of the three regions of the Iguaçú river basin, the location of the flippers being the most variable character. The cytogenetics revealed the same diploid number of chromosomes (50) for the populations of the middle and upper regions of the Iguaçú river, as well as the same fundamental number (86) and karyotype formula ( $6m+24sm+6st+14a$ ). Already the population of the lower region of the Iguaçú river had a diploid number of 48 chromosomes,  $NF=82$  and  $FC=6a+22sm+6st+14a$ . The Ag-NORs were multiple for the medium population of the Iguaçú river, and simple for those upper and lower populations of the Iguaçú river, with their locations coincident with 18S rDNA. The C-banding demonstrated centromeric and pericentromeric markers for the three populations of the Iguaçú river, as well as heterogeneous telomeric markers between them. The 5S and 18S markers were variable for the populations of the Iguaçú river, with 5S markers coincident with heterochromatic sites in all populations. The U2 snDNA sites were variable between the populations, with their location in one chromosomal pair in the population of the middle region of the Iguaçú river and only one homologous in the other populations. The mapping of telomeric DNA in the lower population of the Iguaçú river revealed markers in the telomeric region of the most of chromosomes, as well as in the centromeric region of a chromosomal pair. These different levels of analysis showed a great differentiation between the populations of *A. bifasciatus* of the medium and lower regions of the Iguaçú river, probably arising to tectonic events that occurred in the region.

Keywords: Geomorphology, Integrative Analysis, Evolution.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01- Exemplar de *Astyanax bifasciatus*. A barra corresponde a 1 cm..... 18
- Figura 02- Bacia Hidrográfica do rio Iguaçu. Em destaque os pontos de coleta nas regiões do alto rio Iguaçu (amarelo, onde foram coletados os espécimes utilizados nas análises morfométricas e citogenéticas). Médio Iguaçu (rosa, onde ocorreu a coleta dos espécimes para as análises morfométricas e vermelho, para a citogenética). E baixo Iguaçu (roxo, local de coleta dos espécimes para morfometria e verde, para citogenética)..... 29
- Figura 03- Localização dos marcos anatômicos em *A. bifasciatus*, segundo Pavanelli e Oliveira (2009). 1 Ponta do focinho; 2 Região dorsal da cabeça; 3 Inserção anterior da nadadeira dorsal; 4 Inserção posterior da nadadeira dorsal; 5 Inserção anterior da nadadeira adiposa; 6 Inserção posterior da nadadeira anal; 7 Inserção da nadadeira ventral; 8 Inserção da nadadeira peitoral; 9 Região ventral da cabeça; 10 Região posterior da pré-maxila. A barra corresponde a 1 cm..... 31
- Figura 04- Porcentagem de variação explicada por cada componente principal..... 43
- Figura 05- Componentes principais que explicam a maior variação dos dados morfométricos (CP1 26, 415% e CP2 20,656%). Em azul a população do alto Iguaçu, em verde a do médio Iguaçu e em vermelho a do baixo Iguaçu... 44
- Figura 06- Variáveis Canônicas demonstrando a formação de três grupos distintos correspondentes as populações de *A. bifasciatus*. A variável canônica 1 contém 61,674% da variação dos dados e a variável canônica 2 contém 38,326%. Em azul a população alto Iguaçu, em verde a do médio Iguaçu e em vermelho a do baixo Iguaçu..... 45
- Figura 07- Cariótipos de *A. bifasciatus* elaborados com coloração convencional (Giemsa) com destaque (à direita) para os cromossomos marcados com Ag-RONs. Alto Iguaçu (a e b), médio Iguaçu (c e d), baixo Iguaçu (e e f). Barra = 10µm. Legenda (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtlocêntrico, (a) acrocêntrico..... 47
- Figura 08- Marcações de heterocromatina constitutiva em *A. bifasciatus* através de bandamento C. Em (a) alto Iguaçu, (b) médio Iguaçu e (c) baixo Iguaçu.

	Barra=10µm.Legenda: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.....	48
Figura 09-	Localização com marcadores cromossômicos de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) em <i>A. bifasciatus</i> . Com destaque à direita os cromossomos com marcador de DNAsn U2. Em (a) alto Iguaçu, (b) médio Iguaçu e (c) baixo Iguaçu. Barra = 10µm. Legenda: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.....	49
Figura 10-	Mapa do ponto de coleta na região do baixo Iguaçu (vermelho), com destaque à esquerda para o espécime de <i>A. bifasciatus</i> coletado na região.....	65
Figura 11-	Resultados da análise citogenética em <i>A. bifasciatus</i> do baixo rio Iguaçu. Em (a) ideograma mostrando a localização das marcações teloméricas intersticiais no par cromossômico 9. Em (b) o cariótipo com as marcações de DNA telomérico. Barra=10µm. Legenda: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Valores de p gerados a partir da análise de variáveis canônicas para as populações do alto, médio e baixo rio Iguaçu.....	44
Tabela 02-	Tabela comparativa dos dados citogenéticos de populações de <i>Astyanax bifasciatus</i> da bacia do rio Iguaçu.....	57

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
1.1 CARACTERIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IGUAÇU.....	13
1.1.1 Aspectos Gerais.....	13
1.1.2 Aspectos Históricos.....	14
1.2 QUEM SÃO OS <i>Astyanax</i> ?.....	16
1.3 MARCADORES MORFOLÓGICOS E CITOGENÉTICOS.....	19
1.3.1 Marcadores Morfológicos.....	19
1.3.2 Marcadores da Citogenética Clássica.....	20
1.3.3 Marcadores da Citogenética Molecular.....	22
1.4 ANÁLISES INTEGRATIVAS.....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 JUSTIFICATIVA.....	27
2.2 OBJETIVOS.....	28
2.2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2.2 Objetivos específicos.....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 ÁREA DE ESTUDOS.....	29
3.2 TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS.....	30
3.2.1 Análises morfométricas.....	30
3.2.2 Análise citogenética convencional.....	31
3.2.3 Análise citogenética molecular.....	33
3.2.4 Análise das lâminas e montagem dos cariótipos.....	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
4.1 DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CARIOTÍPICA DE <i>Astyanax bifasciatus</i> (TELEOSTEI, CHARACIDAE) FRENTE À MORFOFISIONOMIA DO RIO IGUAÇU.....	36
4.2 INFERINDO A DIVERSIFICAÇÃO CARIOTÍPICA POR FUSÃO CÊNTRICA EM <i>Astyanax bifasciatus</i> DO BAIXO RIO IGUAÇU.....	63
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
<b>ANEXOS</b> .....	94

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 CARACTERIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IGUAÇU

#### 1.1.1 Aspectos Gerais

O rio Iguaçu recebeu este nome devido aos índios Kaingangue e Guarani e tem como significado “água grande” ou “muita água” na língua nativa destes índios (PARANÁ, 2010). A bacia do rio Iguaçu localiza-se na região sul do Brasil, ao sul do estado do Paraná e norte de Santa Catarina, com uma área que se estende por 72.000 km<sup>2</sup> na região sudeste da América do Sul, abrangendo além das áreas do sul do Brasil, regiões do nordeste da Argentina (PARANÁ, 2010). A maior parte da bacia está em território paranaense: 2.257 Km e 330 m (MAACK, 1981) e situa-se entre as latitudes 25°05'S e 26°45'S e longitudes 48°57'W e 54°50'W, possuindo uma área de drenagem de 69.373 Km<sup>2</sup>.

As nascentes do rio Iguaçu surgem da porção oeste da serra do Mar, com altitude em torno de 1.200 m na sua cabeceira, em seguida o rio Iguaçu entra no primeiro planalto, com altitudes variando entre 800 e 1000 m (SILVA; LERMEN; NERY, 2001). A passagem do rio para o segundo planalto ocorre no limite da escarpa Devoniana (SILVA; LERMEN; NERY, 2001). Enquanto que sua entrada no terceiro planalto ocorre junto à escarpa Triássico-Jurássica (SOUZA, 2004). As águas da bacia do rio Iguaçu são despejadas no rio Paraná, caracterizando o limite oeste da bacia, do terceiro planalto e do estado do Paraná, com altitude de aproximadamente 80 m na sua foz (SILVA; LERMEN; NERY, 2001).

De acordo com Paraná (2009) em todo percurso, que se inicia na região metropolitana de Curitiba, o rio Iguaçu percorre cerca de 1.300 Km até sua foz no rio Paraná, no município de Foz do Iguaçu. Ao longo da sua extensão o rio Iguaçu recebe uma quantidade considerável de afluentes, sendo 61 rios na margem direita e 42 rios na margem esquerda (GONÇALVES, 2007), os quais possuem grande relevância do ponto de vista evolutivo, além de serem muito complexos do ponto de vista da biologia da conservação (VIRTULE; ABILHOA, 2009).

A bacia hidrográfica do Iguaçu abrange uma área total, dentro do estado do Paraná, de cerca de 28% da área do estado, que comporta uma população de 4.405.882 habitantes, em torno de 43% da população paranaense (PARANÁ, 2010). Dentre a população que se distribui no entorno da bacia do Iguaçu, cerca de 2,5 milhões vivem na área metropolitana, sendo a grande maioria da área da bacia ocupada com a classe de uso misto (SILVA; LERMEN; NERY, 2001). Aparecendo áreas de agricultura intensiva na região de Guarapuava, seguindo no sentido

sudoeste, até a divisa com Santa Catarina e havendo uma concentração de cobertura florestal na região do médio e baixo Iguaçu, enquanto que no alto Iguaçu, as áreas são tomadas predominantemente pelo uso urbano com intensa atividade industrial (SILVA; LERMEN; NERY, 2001).

O índice de atendimento para abastecimento público de água da bacia do rio Iguaçu é de 98%, já o índice de atendimento de coleta de efluentes domésticos fica em torno de 51% (PARANÁ, 2010). Nos domínios do baixo Iguaçu, em usos rurais, há um grande potencial de contaminação agrícola e a região caracteriza-se por ser um núcleo com alto volume de agrotóxicos comercializados, em contrapartida, nos usos urbanos há um déficit na infraestrutura de esgotos e drenagem (SOUZA, 2004). A região do alto Iguaçu, em usos rurais, apresenta-se como um núcleo com alto volume de agrotóxicos comercializados e na sua porção urbana, o revés está na concentração de indústrias com alto potencial contaminante (PARANÁ 2010). A área do médio Iguaçu apresenta potencial contaminante na baixa infraestrutura de esgotos e drenagem (PARANÁ, 2010).

Com relação a preservação da mata ciliar ao longo da bacia, pode-se destacar que a região a oeste está composta pela floresta Estacional Semidecidual, embora sua cobertura original seja composta por floresta de Araucária ou Ombrófila Mista em suas variações Montana, Submontana e Alto-Montana, ocorrendo ainda vegetações de várzea e campos dispersos nos três planaltos (PARANÁ, 2010). A bacia hidrográfica abriga também uma grande quantidade de Unidades de Conservação, dentre elas estão: o Parque Estadual do Rio Guarani, em Três Barras, e o de Palmas, em Palmas. Áreas de interesse ecológico como a Reserva Florestal do Pinhão, no município de Pinhão e a Floresta Estadual do Passa Dois, na Lapa; (PARANÁ, 2010). Além de áreas de proteção ambiental estaduais (APA's) como a da Serra da Esperança e a da Escarpa Devoniana (PARANÁ, 2010).

### 1.1.2 Aspectos Históricos

O processo geomorfológico de formação da bacia do rio Iguaçu remete ao final do Cretáceo e ao Terciário, momento em que a borda leste do Brasil passou a subir em razão dos movimentos tectônicos sucessionais, provocados pela ruptura da Gondwana e consequentemente a formação dos continentes e do Oceano Atlântico (MINEROPAR, 2017). Já a evolução da Cordilheira dos Andes, fez com que os rios da bacia tivessem seu curso voltado para o interior do continente (MINEROPAR, 2017). A formação da bacia também está ligada a movimentos verticais escalonados, responsáveis pelo soerguimento da Serra do Mar e a

origem dos três planaltos Paranaenses (DOMINGUES, 2005). No primeiro planalto, próximo das nascentes do rio, existem largos vales elaborados por entre paisagens suavemente onduladas (MAACK, 1981). Já na passagem do primeiro para o segundo planalto, bem como desse para o terceiro, se observam vales de rupturas que indicam linhas de rejuvenescimento fluvial (MAACK, 1981).

A influência da atividade tectônica sobre a bacia do rio Iguaçu pode ser evidenciada por uma série de características, como afirma Salamuni (1998). Tal autor ao analisar as sub-bacias formadoras do rio Iguaçu detectou a presença de vales e drenagens medianamente assimétricos, além de padrões de drenagem subparalelos, o que indica a presença de morfoestruturas que subparalelizam formas superficiais. Ainda, Salamuni (1998) destaca mudanças no grau de meandramento na bacia, devido a falhamentos tectônicos que favoreceram o barramento do rio, bem como alterações no direcionamento do canal da bacia na região de Curitiba.

Segundo Maack (1981) o rio Iguaçu é um rio antecedente, ou seja, é o rio que entalha as superfícies rapidamente, contrabalançando os efeitos dos levantamentos tectônicos, sendo, contemporâneo ao episódio tectônico. Além disso, é um rio consequente (SUGUIO; BIGARELLA, 1979), determinado pelo declive da paisagem, coincidindo, em grosso modo, com o mergulho das camadas geológicas. Os rios nessa formação estão fortemente encaixados, ocupando áreas de fraqueza das rochas efusivas, constituídas pela intensa fragmentação destas rochas e pela sequência e disjunção dos derrames de basalto (JUSTUS, 1990). Tais características podem ser observadas nos segmentos retilíneos dos rios, cotovelos e pelos lajeados, corredeiras, saltos, quedas e ilhas rochosas (JUSTUS, 1990).

Outro evento geológico importante ocorrido durante a história biogeográfica da bacia hidrográfica do rio Iguaçu foi a formação das cataratas do Iguaçu, no período Terciário (MINEROPAR, 2001). Tal evento ocorreu da seguinte forma: entre 65 e 2 milhões de anos atrás, na bacia do rio Paraná, os movimentos tectônicos provocaram o afundamento da parte sudoeste e o levantamento da parte leste, direcionando e aprofundando os sistemas de drenagem (MINEROPAR, 2001). A força erosiva mais intensa no rio Paraná do que em seus afluentes entalhou seu canal profundamente, contribuindo para a queda na foz de cada afluente (MINEROPAR, 2017). Ainda, os derrames de basalto ocorridos durante o Cretáceo são os responsáveis pela forma de degraus que as cataratas apresentam, sendo registrados três derrames na região de Foz do Iguaçu (MINEROPAR, 2017).

A formação das cataratas do Iguaçu e a compartimentalização geológica da bacia, são responsáveis pela ictiofauna peculiar observada na mesma (SAMPALIO, 1988). Pois segundo

Abilhoa e Duboc (2004), as observações geomorfológicas e paleoclimáticas existentes indicam que a ictiofauna da bacia do rio Iguaçu passou por processos únicos que levaram ao seu aparecimento e riqueza. Assim, esta é caracterizada por um elevado grau de endemismo e pela ausência de peixes migradores mais comuns na bacia do rio Paraná (SAMPAIO,1988). O número de espécies presentes na bacia é pequeno (JÚLIO, Jr; BONECKER; AGOSTINHO 1997), são aproximadamente 84, muitas delas exóticas (INGENITO; DUBOC; ABILHOA, 2004). Dentre as espécies nativas, aproximadamente 70% são endêmicas e destas endêmicas 30% correm risco de extinção (BAUMGARTNER, et al.,2012). A distribuição longitudinal da ictiofauna ao longo da bacia não é uniforme, pois algumas espécies são encontradas apenas em regiões de maior altitude, próximas das cabeceiras desse sistema, enquanto outras são exclusivas das regiões do curso médio e baixo (ABILHOA et. al., 2011). Neste sentido, o número de espécies de peixes nas cabeceiras do rio Iguaçu é menor comparada ao restante da bacia, o que é corroborado por Brown e Mathews (1995), segundo os quais a diversidade tende a diminuir em direção às cabeceiras dos rios, sugerindo a existência de relação entre a dimensão do hábitat e diversidade específica.

## 1.2 QUEM SÃO OS *Astyanax*?

A região Neotropical apresenta uma ictiofauna muito diversa (VARI; MALABARBA, 1998). Dentre as ordens de peixes encontradas na região Neotropical destacam-se: Siluriformes, Characiformes, Ciclideos, Cyprinotiformes e Gymnotiformes (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). A ordem Characiformes apresenta pelo menos 2.109 espécies recentes válidas (ESCHMEYER; FONG, 2016) e abrange animais com morfologia e tamanho variados, que habitam ambientes lênticos e lóticos e podem ser herbívoros, ilíacos, predadores e lepidófagos (MOREIRA, 2007). Dentre as famílias de Characiformes, Characidae é a maior e mais complexa, compreendendo cerca de 170 gêneros, que exibem grande heterogeneidade entre si (OLIVEIRA et al., 2011), e habitam diversos ambientes de água doce com distribuição no continente Americano, desde a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina (LUCENA, 1993).

Dentro da família Characidae, o gênero *Astyanax* descrito por Baird e Girard (1854) é um dos mais especiosos e compreende animais conhecidos como lambaris ou piabas, sendo considerado um dos gêneros dominantes na América do Sul (GÉRY, 1977). De acordo com Vazzoller e Menezes (1992) os peixes deste gênero se caracterizam pela grande similaridade morfológica existente entre eles, o que dificulta sua classificação a nível específico. Além disso,

os *Astyanax* são animais não migratórios, com fecundação externa e ausência de cuidado parental (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Como características morfológicas apresentam tamanho reduzido raramente maior que 150 mm, corpo comprimido, nadadeira caudal adiposa, linha lateral completa e relativamente curva para frente, pré-maxilar não protrátil, dentes com cúspides sendo os pré-maxilares dispostos em duas fileiras de cinco dentes, além de escamas de tamanho normal recobrando a base da nadadeira caudal (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

O gênero *Astyanax* já foi classificado dentro de Tetragonopterinae, mas uma revisão recente na filogenia da subfamília reorganizou a filogenia do gênero (LIMA et al., 2003), o qual foi alocado ao grupo *Incertae sedis*. Porém, como a filogenia de *Astyanax* não é bem elucidada, observam-se inúmeros complexos de espécies, termo este utilizado quando mais de uma espécie pode estar representada e, devido ao alto grau de variação estas não podem ser delimitadas. Podendo ocorrer em alopatria, parapatria e também em simpatria (MAYR, 1942), os quais são *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991), *A. altiparanae* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004) e *A. fasciatus* (ARTONI et al., 2006).

Eigenmann (1917) considerou *Astyanax* um gênero morfológicamente primitivo na família Characidae além de identificar linhas de evolução divergentes. Kantek et al. (2007) evidenciou em seus estudos genéticos, que *Astyanax* exibe diferentes números diploides em condição de alopatria. Enquanto que Morelli (1988) afirma que existe também a possibilidade de ocorrência de diferentes números diploides entre indivíduos considerados da mesma espécie, mas pertencentes a bacias hidrográficas distintas. Portanto, a grande variabilidade cariotípica dentro de *Astyanax* dificulta estimativas sobre a evolução cromossômica do grupo, sobretudo em espécies com alto grau de polimorfismo, fato que se torna ainda mais complexo devido a muitas espécies apresentarem distribuição restrita a certas bacias hidrográficas, cujas populações foram pouco estudadas (PAZZA; KAVALCO, 2007). Porém características biológicas podem explicar a diversidade do grupo, uma vez que espécies que ocorrem em cabeceiras de riachos formam pequenas populações isoladas, com evolução independente favorecendo a fixação de rearranjos cromossômicos (MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr; BERTOLLO, 2004). Barreiras físicas, químicas e bióticas podem impedir o contato entre populações contribuindo para a variação genética como consequência da ausência de fluxo gênico entre elas (BARBOSA, 2013).

Uma espécie de *Astyanax* recentemente estudada taxonomicamente e descrita por Garavello e Sampaio (2010) a partir de *Astyanax* sp. B de Sampaio (1988) é *Astyanax bifasciatus*. Tal espécie possui corpo claro, nadadeira anal, caudal e dorsal avermelhadas, mancha umeral preta verticalmente alongada, sendo a porção superior mais larga que a inferior,

seguida de uma mancha pós-umeral difusa (BAUMGARTNER et al., 2012). Faixa longitudinal escura e larga, mais evidente a partir da segunda mancha umeral que se prolonga sobre os raios caudais medianos prateada, espaço entre o 3º infraorbital e o pré-opérculo ausente ou reduzido. (BAUMGARTNER et al., 2012) (Figura 01).



Figura 01. Exemplar de *Astyanax bifasciatus*. A barra corresponde a 1cm.

Com relação ao seu comprimento padrão, a altura do corpo pode estar contida entre 2,4 a 3,0 vezes este, o pedúnculo caudal 8,1 a 10,1 vezes, o comprimento da cabeça entre 3,9 a 4,4, 14 vezes, pré-dorsal 1,9 a 2,1 e pedúnculo caudal 7,9 a 9,9 vezes, o tamanho do focinho de 3,4 a 4,4 vezes, diâmetro orbital 2,4 a 2,7 e distância interorbital 2,9 a 3,3 vezes o comprimento padrão para a espécie (BAUMGARTNER et al., 2012). *A. bifasciatus* possui 5 dentes com 7 cúspides na série interna do pré-maxilar, 3 a 5 na série externa e 1 a 2 dentes no maxilar (BAUMGARTNER et al., 2012). Linha lateral completa com 36 a 39 escamas, 6 a 7 séries de escamas acima da linha lateral e 4 a 5 abaixo, nadadeira dorsal com 9 raios, peitoral com 10 a 14, pélvica com 7 e anal com 19 a 24 raios e por fim apresenta 8 ou 9 rastos braquiais superiores e 11 a 13 inferiores (BAUMGARTNER et al., 2012) (Figura 01).

*Astyanax bifasciatus* é uma das espécies mais abundantes no baixo rio Iguaçu, cuja distribuição geográfica é aparentemente restrita a esta bacia hidrográfica (BAUMGARTNER et al., 2012). Considerada herbívora, pode alternativamente alimentar-se de insetos, seu ritmo alimentar intensifica-se durante o outono na calha central do rio Iguaçu, padrão não evidenciado em seus tributários (BAUMGARTNER et al., 2012). Indivíduos desta espécie iniciam sua atividade reprodutiva com comprimento padrão médio de 47 mm nos machos e 53 mm nas fêmeas, e apesar de reproduzirem-se durante todo o ano, a maior intensidade reprodutiva ocorre na primavera e início do verão (BAUMGARTNER et al., 2012).

### 1.3 MARCADORES MORFOLÓGICOS E CITOGENÉTICOS

#### 1.3.1 Marcadores Morfológicos

A primeira ferramenta utilizada para a identificação das espécies de peixes, assim como a fonte inicial de conhecimento para estudos evolutivos é a morfologia (STRAUSS; BOND, 1990), pois existem inúmeras formas de peixes, com características anatômicas específicas que ajudam na identificação e classificação das diferentes espécies (COELHO et al. 1995; ALVES; COELHO; COLLARES-PEREIRA, 2001). Por outro lado, existem espécies crípticas onde a morfologia não é capaz de distinguir com segurança as espécies, sendo necessária a utilização de metodologias complementares, como o sequenciamento de genes (TENEVA, 2009). Variações morfológicas naturais ocorrem entre os indivíduos/populações de uma mesma espécie de peixe, o que de acordo com Barlow (1961) pode surgir devido a dois fatores: a uma variação “geográfica” entre populações por divergência genética na resposta fenotípica aos diversos fatores ambientais, ou devido a uma variação intra-populacional, que tanto pode ser afetada pela variação no tamanho do corpo e dimorfismo sexual, como por efeitos funcionais relacionados com a idade, nutrição, sazonalidade, entre outros.

Tratando-se de morfologia, tanto as variáveis merísticas quanto as morfométricas são importantes (COLLARES-PEREIRA, 1983). As variáveis merísticas podem ser entendidas como aquelas cuja variação é descontínua e as variáveis morfométricas como aquelas de variação contínua (COLLARES-PEREIRA, 1983). Ambas podem ser percebidas através da observação dos segmentos do corpo ou outros caracteres, que durante o processo de evolução corresponderam à segmentação do corpo, como, por exemplo, o número de escamas e de raios das barbatanas (COLLARES-PEREIRA, 1983). Tais características, entretanto, podem sofrer influência dos fatores ambientais, promovendo variações tanto a nível inter como intraespecífico (STRAUSS, 1985).

As variáveis morfométricas presentes nos indivíduos podem ser detectadas por meio da morfometria, que é o estudo da forma e do tamanho dos indivíduos, e como estas variáveis se relacionam entre si, ou seja, é qualquer análise quantitativa da variação morfológica dos organismos, que reflete as adaptações ecológicas das espécies (MORAES, 2003). De acordo com Peres-Neto, Valentin e Fernandez (1995), as análises morfométricas apresentam vários propósitos: para taxonomistas permitem mensurar diferenças entre espécies, criando referências para comparações. Para ecólogos e evolucionistas possibilitam a discussão de que a forma e o tamanho dos organismos devem refletir aspectos evolutivos. Já para geneticistas evidenciam a

herdabilidade dos caracteres morfométricos por meio da quantificação e separação das influências ambientais no fenótipo dos organismos (PERES-NETO; VALENTIN; FERNANDEZ, 1995).

As técnicas de morfometria vêm se aperfeiçoando ao longo do tempo e podem ser utilizadas nas descrições taxonômicas (MORAES, 2003; CAVALCANTI; LOPES, 1991), como ocorre com muitas espécies de peixes (WILLIG; OWEN; COLBERT, 1986; KEENLYNE et al., 1994; GÜRKAN, 2008; BOUSSOU et al., 2010). Para a descrição morfométrica da forma dos indivíduos, são necessários três vetores alométricos, o que prediz a utilização de ferramentas multivariadas (CAVALCANTI; LOPES, 1993). No caso dos peixes, as técnicas de análise multivariada possuem um alto potencial na investigação dos padrões de diferenciação morfológica e crescimento, podendo ser inferida a diferenciação intra ou interespecífica dos mesmos, por meio de um conjunto de medidas (CAMPELLO; BEMVENUTI, 2002).

Atualmente, uma vertente da morfometria originada nos anos 80 vem sendo utilizada, a morfometria geométrica, que consiste em um conjunto de técnicas para estudo morfológico onde são utilizados marcos anatômicos ou contornos (ROHLF; MARCUS, 1993). A variável morfológica testada pode ser qualquer medida em uma configuração de marcos anatômicos, que não muda seu valor quando todos os comprimentos são multiplicados por um fator escalar (BOOKSTEIN, 1991). Para comparar apenas algumas variáveis, é possível desconsiderar as demais da análise, concentrando as inferências em um ponto comum, de forma que todos os pontos analisados apresentem o mesmo tamanho e sejam rotacionados segundo um mesmo critério (KENDALL, 1989). Desta forma, são geradas coordenadas, as quais localizam um ponto no espaço da forma corpórea do animal, onde as distâncias empregadas não são lineares ou euclidianas (KENDALL, 1989). Os resultados são obtidos por meio da inferência da distância entre dois pontos neste espaço multidimensional, pois a distância entre duas formas indica o quanto elas são diferentes (KENDALL, 1989).

### 1.3.2 Marcadores da Citogenética Clássica

Desde as primeiras revisões citogenéticas em 1978, com análises de números diploides, vários estudos cromossômicos têm fornecido resultados que auxiliam na identificação e diferenciação de espécies de peixes (PAIZ, 2013). Porém um pequeno número de espécies/subespécies de peixes foram cariotipadas, dentre 34.544 espécies recentes válidas

(ESCHMEYER; FONG, 2017), existindo assim, diversas lacunas referentes às caracterizações básicas para diversos grupos (PAIZ, 2013).

Variações a nível cromossômico são muito comuns nos peixes, alterações no número diploide podem ser decorrentes de fissões ou fusões cêntricas nos cromossomos (rearranjos Robertsonianos) (PAZZA, 2005). Alterações na morfologia dos cromossomos podem modificar apenas a fórmula cariotípica, quando resultantes de inversões pericêntricas ou paracêntricas (rearranjos não-Robertsonianos) (PAZZA, 2005). Sendo tais eventos responsabilizados pela grande diversidade cariotípica tanto interespecífica, quanto intraespecífica observada (FROESE; PAULY, 2010).

Corroborando a isto, os peixes da região Neotropical apresentam uma alta diversidade cromossômica, com variações em número diploide, presença de cromossomos sexuais, cromossomos supranumerários, e muitos casos de variações estruturais (GALETTI Jr., 1998). A ordem Characiformes possui citogeneticamente dois padrões de diversificação cromossômica, um que exhibe grande variabilidade quanto ao número e estrutura cromossômica e outro no qual há pequena variação numérica e estrutural do cariótipo (VICARI et al., 2006). Dentro da ordem Characiformes, a família Characidae exhibe alta variabilidade cariotípica e pode ser caracterizada por apresentar dois grandes cromossomos metacêntricos, que correspondem ao primeiro par do complemento, em grande parte de suas espécies (SCHELL, 1973).

O gênero *Astyanax* compreende espécies interessantes para estudos citogenéticos, com diferentes modelos evolutivos, que apontam desde a manutenção de uma condição cromossômica conservada, até características cariotípicas derivadas, utilizadas como importantes ferramentas na diferenciação e identificação das espécies (KANTEK et al., 2007; PERES et al., 2009). O número diploide para o gênero é tido entre 36 cromossomos como em *Astyanax shubarti*, até 50 cromossomos como na maioria das espécies (PACHECO et al., 2010).

Dentre as técnicas mais utilizadas em estudos citogenéticos além do número e morfologia dos cromossomos está a detecção das regiões organizadoras de nucléolo, as quais portam genes relacionados à família do RNAr 45S, que consiste no segmento de DNA que codifica a sequência no transcrito primário dos RNAr 18S, 5,8S, 26S e 28S (MARTINS; GALETTI Jr., 2001). Tal unidade transcricional exhibe acentuada variabilidade em relação a localização dos sítios cromossômicos, representando assim, um importante marcador cromossômico, uma vez que o número e localização são característicos de espécies e de populações de peixes, embora variabilidades intra e interindividuais sejam observadas nas populações de diversos organismos (GALETTI Jr.; MARTINS, 2004).

Outra técnica bastante utilizada é o padrão de distribuição da Heterocromatina Constitutiva ou Banda C, que evidencia as regiões heterocromáticas do conjunto cromossômico da espécie em estudo (LACADENA, 1996). Em peixes, o padrão de distribuição da heterocromatina é uma ferramenta empregada para diferenciar as espécies, auxiliando também no entendimento dos mecanismos envolvidos no processo evolutivo dos diversos grupos (SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr., 1996). Estruturalmente, a heterocromatina constitutiva se apresenta condensada em todas as células do organismo durante gerações, localiza-se em blocos em qualquer região do cromossomo, mas em sítios semelhantes em ambos os homólogos e exibe grande quantidade de DNA altamente ou moderadamente repetitivo e sem função codificante (STEPHENS et al., 2005).

### 1.3.3 Marcadores da Citogenética Molecular

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares vêm demonstrando a importância do conhecimento das sequências de DNA e da localização dos genes, como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies de peixes, além da possibilidade da sua localização nos cromossomos ser utilizada como marcador citogenético entre diferentes espécies (KASAHARA, 2009). Dentre as técnicas de citogenética molecular, a manipulação do material genético associada à detecção de sequências específicas de DNA vem sendo muito utilizada (GUERRA, 2004). Métodos como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (GALL; PARDUE, 1969) permitem tais inferências. Pela técnica de FISH, uma sonda de DNA marcada é hibridizada sobre alvos citológicos (cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras de cromatina estendidas, entre outros) (GUERRA, 2004). Sendo possível a utilização simultânea de diversas sondas marcadas com diferentes fluorocromos, o que permite a caracterização com maior precisão de eventos de alteração ou evolução do cariótipo (GUERRA, 2004).

A FISH tem sido utilizada para localizar diversas sequências de nucleotídeos, tais como sequências de DNA de cópia única, de DNA repetitivo em *tandem*, de DNA repetitivo disperso, entre outras, ao longo dos cromossomos (GUERRA, 2004). Dentre essas sequências, destacam-se as de DNA repetitivo que consistem em sequências repetitivas que variam em tamanho, presentes em centenas a milhares de cópias dentro do genoma (SCHMIDT et al., 2004). Encontram-se incluídos nesta classe os DNAs satélites (DNAsat), microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas, que correspondem a sequências repetitivas organizadas em *tandem*; e transposons e retrotransposons os quais representam sequências de DNA

repetitivo disperso com capacidade de movimentação entre distintas regiões do genoma (MAXON; COHN; KEDES, 1983; HADJIOLOV, 1985; CHARLESWORTH; SNIÉGOWSKI; STEPHAN, 1994).

A utilização das sequências repetitivas como marcadores cromossômicos pode revelar informações significativas nos estudos citogenéticos em peixes, auxiliando no entendimento das estruturas envolvidas na evolução de genomas, origem e evolução de cromossomos supranumerários, diferenciação sexual, e rearranjos cromossômicos (VOLTOLIN et al., 2010). Dentre os DNAs satélites, a sequência telomérica geral e conservada dos vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> (PAZZA, 2005) constitui outra fração repetitiva organizada em *tandem* importante no estudo de evolução cromossômica em peixes neotropicais (SLIJEPCEVIC, 1998; ROSA et al., 2011). De forma geral, as sequências teloméricas se localizam na região terminal dos cromossomos, mas em aproximadamente 40% das espécies de peixes já foi relatada a ocorrência de sequências teloméricas intersticiais (OCALEWICZ, 2013). O aparecimento destes sítios teloméricos intersticiais se relaciona com processos de rearranjos cromossômicos envolvendo os telômeros, como duplicações, fusões, inversões e translocações, a partir de uma condição ancestral, ocorridos durante o processo evolutivo das espécies (OCALEWICZ, 2013). A sequência telomérica apresenta funções importantes, como: promover a estabilidade dos cromossomos e permitir a replicação completa do DNA e a integridade do mesmo (NANDA et al., 2002; MULTANI et al., 2006; MONAGHAM, 2010; OCALEWICZ, 2013). Além interagir com sinais endógenos e exógenos, levando à modificação do comprimento ou estrutura da cromatina (YE et al., 2014).

As famílias multigênicas também são importantes ferramentas para estudos citotaxonômicos e evolutivos em peixes, pois estas representam grupos de genes com considerável similaridade estrutural e funcional, quanto ao número e organização dos pares de bases, sendo descendentes de um gene ancestral comum (NEI; ROONEY, 2005; FARAH, 2007). Esses genes podem manifestar diferentes funções, como exemplo temos os genes RNAs ribossomais e os genes RNAsn U (*small nuclear RNAs*) (CABRAL-DE-MELLO, 2011; CABRAL-DE-MELLO et al., 2012).

Inúmeros trabalhos realizados com sondas de DNAr 18S e 5S têm mapeado a localização cromossômica destes sítios através de hibridização *in situ* fluorescente em peixes neotropicais (MARTINS; GALETTI Jr, 1999, 2000; VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; MARTINS et al., 2006; VICARI et al., 2006; FERREIRA; BERTOLLO; MARTINS, 2007; GARCIA; OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010; PANSONATO-ALVES et al., 2011; SCACCHETTI et al., 2012). O estudo com sondas de DNAr 18S contribui para o

entendimento da atividade dos genes ribossomais, relacionados as regiões organizadoras de nucléolo (GROMICHO; COLLARES-PEREIRA, 2004). Já o estudo com sondas de DNAr 5S, demonstram que sua localização ocorre em apenas dois pares cromossômicos, principalmente em regiões intersticiais, na maioria dos peixes (VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; HASHIMOTO et al., 2011).

Recentemente, estudos envolvendo a localização dos genes de DNAs não codificantes vem sendo empregados para inúmeros grupos de organismos, incluindo os peixes (LINDGREN et al., 1985). Estes DNAs não codificantes podem pertencer a dois grupos distintos, classificados de acordo com a sequência de nucleotídeos comum entre eles e aos cofatores proteicos (NILSEN, 2003). O primeiro grupo é formado pelos DNAs U1, U2, U4, U4atac, U5, U7, U11 e U12, já o segundo é composto pelos DNAs U6 e U6atac (NILSEN, 2003). Cada molécula de DNA U é associada com pelo menos sete subunidades proteicas, para formar uma RNAsn (*small nuclear ribonucleoprotein*) – o cerne do spliceossomo (ALBERTS et al., 2017). Essas moléculas estão envolvidas em várias funções incluindo o *splicing* de pré RNAs, a formação da extremidade 3' do RNAm de histonas, o processamento de RNAs, a maturação de RNAs e a síntese de DNA telomérico (SERAPHIN; ROSBASH, 1989; MATTAJ; TOLLERVEY; SERAPHIN, 1993). Os genes dos DNAsns apresentam, usualmente, menos de 300 nucleotídeos (LIU; GALL, 2007) e podem estar dispersos pelo genoma em múltiplas cópias ou, como alguns pesquisadores já constataram, também podem se encontrar distribuídos em repetições em *tandem* (MARZLUFF et al., 1983; MATTAJ; ZELLER, 1983; VAN ARSDELL; WEINER, 1984; WATANABE-NAGASU et al., 1983; WISE; WEINER, 1980).

#### 1.4 ANÁLISES INTEGRATIVAS

A história evolutiva dos organismos está ligada a mudanças climáticas e geográficas ocorridas durante a história do planeta, por isso, entender as relações filogenéticas entre os seres vivos possibilita o entendimento de sua evolução (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006). Em regiões geográficas de complexa história evolutiva, como é o caso dos ambientes dulcícolas da região Neotropical, esta história se torna ainda mais elaborada, pois a diversificação das espécies de peixes foi resultado de eventos geomorfológicos e climáticos que determinaram a conectividade das bacias hidrográficas, associados a pressões ecológicas ligadas ao regime hídrico, composição química da água e tipo de solo, que influenciaram a diversificação de espécies simpátricas (ALBERT; REIS, 2011).

Portanto, para determinar a história evolutiva de um táxon, é necessária a utilização de diversas ferramentas como a morfologia, anatomia interna, fisiologia, biogeografia, genética e análises moleculares (WARD; HANNER; HEBERT, 2009). Historicamente a identificação das espécies é baseada em caracteres morfológicos, método que permite além da caracterização das mesmas, a avaliação de processos evolutivos influentes na diversificação inter e intraespecífica dos organismos, inclusive dos peixes, uma vez que a variação fenotípica é resultado da interação de processos históricos e ecológicos, que podem regular a fixação de caracteres fenotípicos (MULLEN, 2009). Sabendo que os traços fenotípicos são determinados pela seleção natural, o grau de diferenciação morfológica entre populações ou linhagens, será diretamente proporcional ao nível de fluxo gênico entre elas (MULLEN, 2009). No entanto, em se tratando de espécies crípticas e politípicas, estudos empregando somente análises morfológicas podem levar a uma subestimação ou superestimação da variação genética entre populações/espécies (FREELAND, 2005).

Assim, a complexa relação entre genótipo, fenótipo e ambiente foi um dos principais motivos que levaram ao desenvolvimento de outros marcadores para o estudo genético de espécies, associado aos estudos morfológicos (BUENO-SILVA, 2012). Dentre estes marcadores estão as análises citogenéticas. Segundo Nirchio e Oliveira (2006) para os peixes, os estudos citogenéticos revelam informações que contribuem para uma melhor identificação das diferentes espécies, propiciando o conhecimento da estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos, assim como para o mapeamento de genes específicos. De acordo com Kasahara (2009), as análises do cariótipo auxiliam no entendimento da evolução e filogenia cromossômica, permitindo a realização de estudos citotaxonômicos que são importantes no caso de espécies crípticas ou complexos de espécies. Tais análises possibilitam a caracterização de espécies de forma mais completa, propiciando o entendimento da ocorrência de casos de polimorfismos e diferentes citótipos restritos ou não, a uma determinada população ou espécie (KASAHARA, 2009).

No caso dos peixes, a citogenética é de grande importância para estudos evolutivos, e quando associada à taxonomia pode ser uma excelente ferramenta no entendimento de grupos taxonomicamente problemáticos, permitindo o estabelecimento de tendências evolutivas entre grupos (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000). Este auxílio da citogenética à taxonomia se torna mais efetivo ao empregar algumas técnicas, como o bandamento C e a impregnação por nitrato de prata, pois gera informações que podem ser utilizadas como marcadores espécie-específicos em estudos populacionais e interespecíficos (HOWELL; BLACK, 1980; BERTOLLO; MOREIRAFILHO; GALETTI Jr, 1986; ARTONI; VICARI; BERTOLLO,

2000; SUMNER, 2003; GALETTI Jr; MARTINS, 2004; MARTINS, 2007). A utilização do DNA ribossômico (DNAr) em análises também é ampla e possibilita a caracterização de espécies, percepção de variações populacionais, do relacionamento evolutivo ou da expressão gênica, contribuindo para a compreensão da estrutura, organização e evolução dos genomas (MARTINS; WASKO, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1 JUSTIFICATIVA

A região Neotropical apresenta a maior diversidade de peixes dulcícolas do planeta (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003), tal diversificação teve origem no Cretáceo, durante a separação dos continentes americano e africano (ALBERT; REIS, 2011). Para os organismos aquáticos, os processos naturais responsáveis pela formação e dinâmica dos ambientes são diretamente ligados à sua história evolutiva (NELSON; PLATNICK, 1981). A evolução dos peixes de água doce em especial, por ser restrita ao ambiente dulcícola, permite o estabelecimento de uma ligação entre seus padrões de distribuição e os eventos geomorfológicos como conexão de bacias hidrográficas, introgressões marinhas no continente, isolamentos de drenagens e capturas de cabeceiras (NELSON; PLATNICK, 1981).

Corroborando a isto, a complexidade da história geomorfológica das drenagens fluviais das Américas Central e do Sul demonstra que a evolução da fauna dulcícola de bacias hidrográficas isoladas já teve conexão no passado, pois a coincidência de organismos aquáticos não relacionados em diferentes bacias e a presença de espécies endêmicas geralmente possui concordância com a história geomorfológica da região (NELSON; PLATNICK, 1981). Neste sentido, bacias hidrográficas com características geomorfológicas e morfodinâmicas complexas, como é o caso da bacia hidrográfica do rio Iguaçu apresentam grande importância ecológica e evolutiva (BAUMGARTNER et al., 2012). O isolamento da bacia do rio Iguaçu da do rio Paraná, somado ao soerguimento dos planaltos paranaenses influenciou enormemente a distribuição e evolução das espécies de peixes na bacia do rio Iguaçu (BAUMGARTNER et al., 2012), fato que torna os estudos nesta região importantes para o entendimento da história evolutiva de suas espécies, em especial as endêmicas, como *Astyanax bifasciatus*. Tendo em vista, que ao analisar a influência dos eventos biogeográficos sobre a evolução das espécies, são gerados dados que além de caracterizar as mesmas, fornecem evidências que podem auxiliar na compreensão da história evolutiva de táxons semelhantes, gerando assim, resultados que contribuem para um acréscimo do conhecimento sobre a biogeografia da bacia hidrográfica do rio Iguaçu.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivo Geral

Inferir a diversidade e variabilidade de *A. bifasciatus* ao longo da bacia hidrográfica do rio Iguaçu, utilizando análises morfométricas e citogenéticas.

### 2.2.2 Objetivos específicos

- Evidenciar a variação morfológica quantitativa dos espécimes de *A. bifasciatus* das três regiões da bacia hidrográfica do rio Iguaçu.
- Realizar análise comparativa dos cariótipos empregando marcadores clássicos e da citogenética molecular nas populações de *A. bifasciatus* que ocorrem no alto, médio e baixo rio Iguaçu;
- Investigar processos de evolução cariotípica em *A. bifasciatus* na bacia hidrográfica do rio Iguaçu.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDOS

A área de estudos está inserida na bacia hidrográfica do rio Iguaçu, no Paraná, mais precisamente na região do alto Iguaçu, em Piraquara (S 25°2.982' W 049 02.674'), no médio rio Iguaçu em União da Vitória (S 26°15'1.11 W 51°6'10.67) e (S 26° 17'13.98 W 51° 17'54.18) na região do baixo rio Iguaçu, em Realeza (S 25°45'52.5 W 53°34'59.9) e Boa Esperança do Iguaçu (S 25°59'59.09 W 53° 48'63.24) (Figura 02).

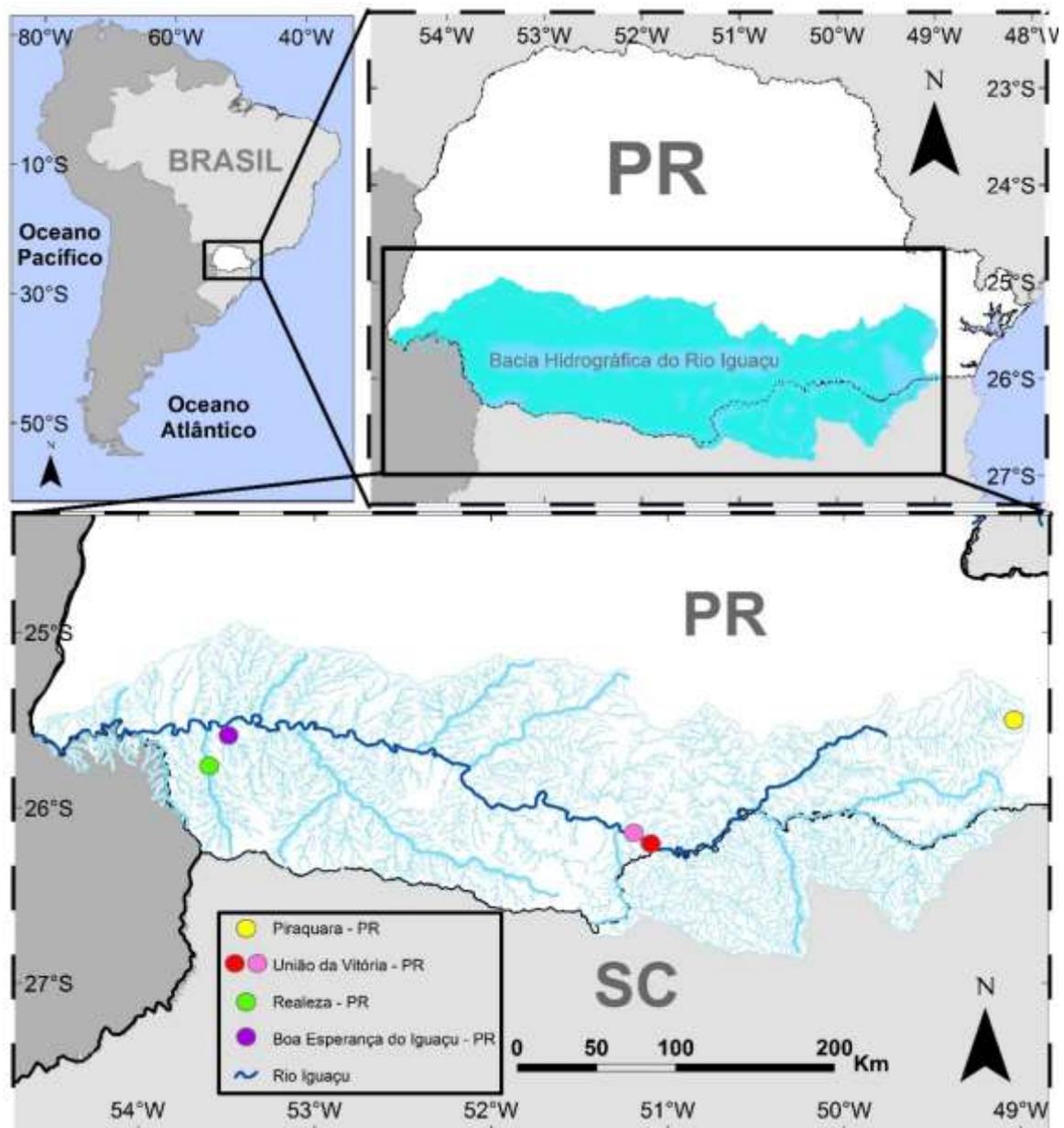


Figura 02. Bacia Hidrográfica do rio Iguaçu. Em destaque os pontos de coleta nas regiões do alto rio Iguaçu (amarelo, onde foram coletados os espécimes utilizados nas análises morfométricas e citogenéticas). Médio Iguaçu (rosa, onde ocorreu a coleta dos espécimes para as análises morfométricas e vermelho, para a citogenética). E baixo Iguaçu (roxo, local de coleta dos espécimes para morfometria e verde, para citogenética).

Os espécimes utilizados para as análises morfométricas pertenciam a Piraquara, no alto Iguaçu (15 indivíduos), União da Vitória, no médio Iguaçu (15 indivíduos) e Boa Esperança do Iguaçu, no baixo Iguaçu (15 indivíduos) e foram selecionados a partir da coleção ictiológica do Museu de História Natural do Capão da Imbuia em Curitiba, Paraná. Os exemplares de *Astyanax bifasciatus* empregados para as análises citogenéticas foram coletados na região do alto rio Iguaçu no município de Piraquara (2 machos), do médio Iguaçu no município de União da Vitória (16 machos e 15 fêmeas, coletados em ponto distinto daquele de onde provém os indivíduos para as análises morfométricas) e no baixo Iguaçu, no município de Realeza (9 machos e 7 fêmeas). Posteriormente, os espécimes do alto rio Iguaçu foram processados em campo e os do médio e alto Iguaçu foram transportados vivos dentro de caixas de isopor contendo água do próprio rio para o laboratório da Universidade Estadual do Paraná, campus União da Vitória e para o laboratório da Universidade Federal Fronteira Sul, campus Realeza, respectivamente, onde permaneceram em aquários aerados. Os espécimes de União da Vitória foram identificados e depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA (NUP 16898), da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Os demais espécimes estão em processo de identificação taxonômica morfológica e depósito no Museu de História Natural do Capão da Imbuia, em Curitiba, Paraná.

### 3.2 TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS

#### 3.2.1 Análises morfométricas

As análises de morfometria geométrica realizadas neste trabalho foram baseadas na definição de forma (*shape*) e todas as suas configurações geométricas, exceto tamanho, posição e orientação (KLINGENBERG et al. 2012) utilizando os marcos anatômicos para extração da informação da forma por meio da Superimposição de Procrustes (DRYDEN; MARDIA, 1998). As imagens dos espécimes foram obtidas a partir da região lateral esquerda do corpo dos mesmos a uma distância de 20 cm, utilizando a câmera Nikon Coolpix P530. Além disso, para a obtenção das imagens, todos os espécimes foram colocados sobre papel milimetrado para futura transformação dos pixels em função do tamanho em centímetros.

Para ordenamento das imagens da mesma estrutura corporal no mesmo arquivo TPS foi utilizado o software tpsUtil (ROHLF, 2008). O software tpsDig2 (ROHLF, 2006) foi empregado para registrar os marcos anatômicos em cada imagem digitalizada. Tais marcos anatômicos foram estabelecidos de acordo com Pavanelli e Oliveira (2009) (Figura 03). A fim

de retirar as informações não relacionadas com a variação da forma corporal dos espécimes, foi realizada uma Análise Generalizada de Procrustes (ROHLF; SLICE, 1990).

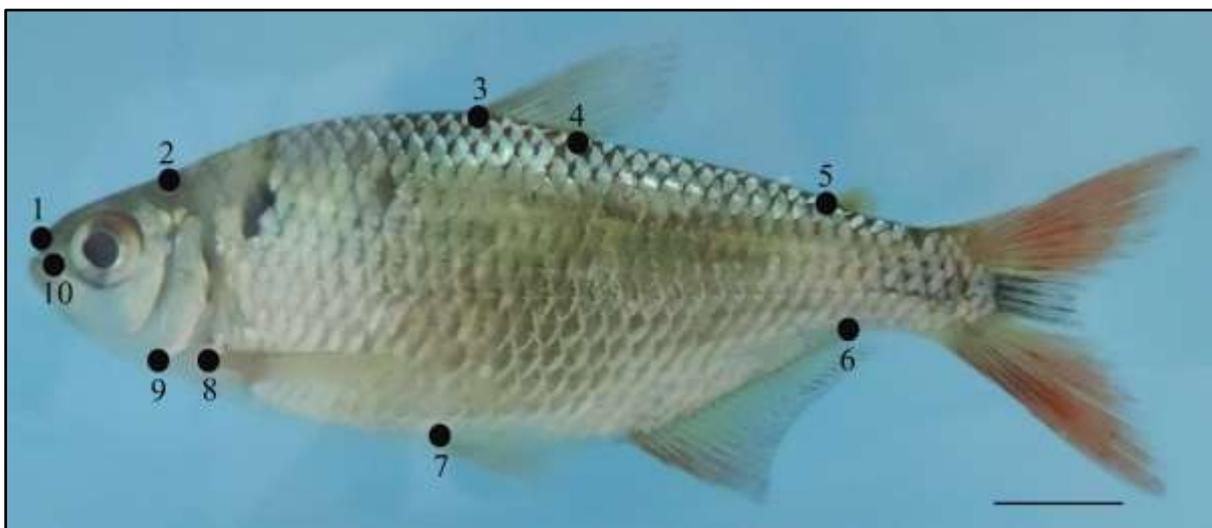


Figura 03: Localização dos marcos anatômicos em *A. bifasciatus*, segundo Pavanelli e Oliveira (2009). 1 Ponta do focinho; 2 Região dorsal da cabeça; 3 Inserção anterior da nadadeira dorsal; 4 Inserção posterior da nadadeira dorsal; 5 Inserção anterior da nadadeira adiposa; 6 Inserção posterior da nadadeira anal; 7 Inserção da nadadeira ventral; 8 Inserção da nadadeira peitoral; 9 Região ventral da cabeça; 10 Região posterior da pré-maxila. A barra corresponde a 1 cm.

As Análises de Componentes Principais (PCA) e Variáveis Canônicas (CVA) foram utilizadas para avaliar a variação de forma e verificar diferenças entre as populações. Uma PCA (JOLLIFFE, 2002) foi realizada para produzir um morfo-espço dos principais padrões de variação dos dados e possíveis relações relevantes. A CVA (ALBRECHT, 1980) foi utilizada para obter uma visualização geral das variações entre as populações, onde foram computados os valores de probabilidade a partir do teste de permutações ( $n = 10000$ ) para a distância de Procrustes, visto que esta distância é a medida de quantidade absoluta de variação da forma (KLINGENBERG; MONTEIRO, 2005). As variações de forma obtidas a partir da PCA e da CVA foram visualizadas por meio de gráficos do tipo *outline drawing*, onde todas as informações necessárias para a elaboração do gráfico *outline drawing* vem das coordenadas de marcos anatômicos. A análise Generalizada de Procrustes, as análises multivariadas de PCA, CVA e, os gráficos *outline drawing* foram realizados no programa MorphoJ 1.02b® (KLINGENBERG, 2011).

### 3.2.2 Análise citogenética convencional

Todos os procedimentos seguiram boas práticas de experimentação animal e foram autorizados por Comitê de Ética. As metáfases mitóticas necessárias para a obtenção dos

cromossomos foram obtidas de acordo com o protocolo proposto por Bertollo; Moreira-Filho e Galetti Jr. (1986), que consistiu em injetar cerca de 48 horas após a aplicação da técnica de suspensão de levedura (CAVALLINI; BERTOLLO, 1988), uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1 mL/100g de peso, intra-abdominalmente no animal para que a divisão celular parasse na metáfase e com isto o estudo cromossômico pudesse ser realizado. Após cerca de 50 a 60 minutos os espécimes foram anestesiados com Benzocaína 1% e uma pequena porção do rim anterior retirada, para a obtenção das metáfases mitóticas. O rim anterior após ser retirado do animal foi transferido para cerca de 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) na qual suas células foram dissociadas com uma seringa desprovida de agulha por meio de sucessivas aspirações até que se obtivesse uma solução celular homogênea.

A solução hipotônica permaneceu incubada em estufa a 37°C durante 25-30 minutos. Decorrido este tempo ela foi retirada da estufa, ressuspensa com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocada em um tubo de ensaio, de modo a descartar os fragmentos de tecidos não desfeitos. Algumas gotas de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, foram acrescentadas ao material ressuspensando-o em seguida. O material então foi centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm e a solução sobrenadante descartada com uma pipeta Pasteur. De 5-7 mL do fixador Carnoy foram acrescentados, e o material ressuspensado e centrifugado por mais 10 minutos, a 900 rpm. O último passo foi então repetido duas vezes, o material sobrenadante foi descartado e quantidade suficiente de fixador Carnoy para que se tivesse uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 mL) foi acrescentado. Em seguida o material foi ressuspensado e acondicionado em tubos do tipo *ependorfs*. Nesta etapa, ele foi armazenado em freezer, para posterior utilização.

Com relação à coloração das lâminas, esta consistiu no seguinte procedimento: As lâminas já limpas e incubadas em um béquer contendo água a uma temperatura de aproximadamente 60°C, foram pingadas com duas a três gotas do material armazenado em tubo tipo *ependorfs* que já fora retirado do freezer e ressuspensado. As lâminas secaram em temperatura ambiente para então serem coradas com Giemsa diluída em tampão fosfato (pH 6,8) a 5%. O corante preparado foi colocado sobre as lâminas cobrindo toda a sua extensão e permanecendo ali por 10 minutos, em seguida, seu excesso foi retirado com água corrente e após secarem as lâminas, estas foram analisadas junto ao microscópio.

Para a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980), que constituiu em: colocar sobre uma lâmina contendo duas gotas do material armazenado no freezer 2-3 gotas de solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina incolor + 50 mL de H<sub>2</sub>O +0,5 mL de ácido fórmico); adicionando sobre cada gota de gelatina

1 gota de H<sub>2</sub>O e 2 gotas de AgNO<sub>3</sub>. A lâmina foi então coberta com lamínula e colocada em estufa a 60°C durante 3-6 minutos, após isto, foi deixada a lamínula escorrer debaixo de água corrente e finalmente secar a lâmina para posterior coloração com Giemsa a 2% durante 10 min e observação no microscópio.

Para a detecção da Heterocromatina Constitutiva foi adotado o protocolo proposto por Sumner (1972), com modificações por Lui et al. (2009) que empregou os seguintes passos: A lâmina já contendo as gotas do material para análise foi tratada com HCl (em temperatura ambiente) em estufa, por 15 minutos, então foi incubada por mais 15 minutos em solução salina de 2xSSC, a 60°C em banho-maria. Em seguida, a lâmina foi mergulhada de 02 a 03 minutos em solução de hidróxido de bário, em banho-maria a 42°C, com o Ba(OH)<sub>2</sub> recém preparado e filtrado. A lâmina foi passada rapidamente em solução de HCl, e incubada em solução salina de 2xSSC a 60°C, por 1 hora. Após cada etapa, esta foi lavada em água destilada e quando o processo foi concluído a lâmina foi deixada secar ao ar, corada com iodeto de propídio e coberta com lamínula.

### 3.2.3 Análise citogenética molecular

Para a citogenética molecular a obtenção do DNA genômico ocorreu pelo método de extração salina (BRUFORD et al., 1992, adaptado por David Vieites) utilizando amostras de fígado e músculo dos espécimes. A amplificação de sondas dos genes ribossomais 5S e 18S e do gene DNAsn U2 para a hibridação *in situ* fluorescente ocorreu por meio de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com marcação por meio de Biotina 16 DUTP no caso dos genes DNAr18S e DNAsn U2 ou Digoxigenina 11 DUTP (*Roche applied science*) no caso do gene DNAr 5S.

Para o gene 5S foi utilizado o DNA ribossômico da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI Jr, 1999), clonado em plasmídeo, juntamente com primer universal para plasmídeos, M13 F e R para amplificação. A reação foi a seguinte: 5 µl de tampão 10x, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50Mm) , 4 µl de primer F (5'-AGC GGA TAA CAA TTTC ACA C-3') a 10ng/ µl, 4 µl de primer R (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') a 10ng/ µl, 1 µl de dCPT (2nM), 1 µl de dGTP (2nM), 1 µl de dATP (2nM), 0,7 µl de dTTP (2nM), 0,6 µl de Digoxigenina 11 dUTP (2nM), 1 µl de DNA (100ng/ µl), 0,4 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 50 µl. Com a programação do ciclador térmico composta por um ciclo de desnaturação à 95°C por 4 min , seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C

por 1 min; anelamento à 51°C por 1 min e extensão à 72°C por 1,30 min, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C.

Para o gene 18S foi utilizado DNA ribossômico 18S obtido a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI Jr., 2004) clonado em plasmídeo, juntamente com primer universal para plasmídeos, M13 F e R para amplificação. A reação foi a seguinte: 5 µl de tampão 10x, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 4 µl de primer F (5'-AGC GGA TAA CAA TTTC ACA C-3') a 10ng/ µl, 4 µl de primer R (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') a 10ng/ µl, 1 µl de dCPT (2nM), 1 µl de dGTP (2nM), 1 µl de dATP (2nM), 0,7 µl de dTTP (2nM), 0,6 µl de Biotina 16 dUTP (2nM), 1 µl de DNA molde (100ng/ µl), 0,4 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 50 µl. Com a seguinte programação: um ciclo de desnaturação à 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min; anelamento à 51°C por 1 min e extensão à 72°C por 1,30 min, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C.

Para a amplificação da sonda do gene DNAsn U2, foram utilizados os primers descritos por Bueno, Palacios-Gimenez e Cabral-de-Mello (2013), juntamente com o DNA genômico de *A. bifasciatus* previamente extraído. A reação de amplificação foi a seguinte: 2,5 µl de tampão 10x, 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µl de primer F (5' –ATC GCT TCT CGG CCT TAT G- 3') à 10ng/ µl, 0,5 µl de primer R (5' –TCC CGG CGG TAC TGC AAT A- 3') à 10ng/ µl, 0,5 µl de dCPT (2nM), 0,5 µl de dGTP (2nM), 0,5 µl de dATP (2nM), 0,4 µl de dTTP (2nM), 0,3 µl de Digoxigenina 11 dUTP (2nM), 0,5 µl de DNA (100ng/ µl), 0,2 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 25 µl. Com a programação do ciclador térmico: um ciclo de desnaturação à 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 s; anelamento à 56,8°C por 45 s e extensão à 72°C por 45 s, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C.

Para a amplificação do DNA telomérico foram utilizados os *primers* degenerados (TTAGGG)<sub>4</sub> e (CCCTAA)<sub>4</sub> (IJDO et al., 1991). A reação de amplificação da sonda foi a seguinte: 2,5 µl de tampão 10x, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1 µl de cada *primer* à 10ng/ µl, 2,5 µl de dNTPs (2nM), 0,2 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 25 µl. Com a programação do ciclador térmico: dez ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, seguido de anelamento à 55°C por 30 s e extensão à 72°C por 1 min. Posteriormente 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, seguido de anelamento à 60°C por 30 s e extensão à 72°C por 1,30 min seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C. A marcação da sonda ocorreu pelo Kit *Nick Translation* com digoxigenina-11-dUTP, segundo as orientações do fabricante (*Roche Applied Science*).

Os segmentos de DNA de todas as sondas foram visualizados em gel de agarose à 1%. O gene DNAsn U2 antes da sua utilização nas sondas, foi amplificado e purificado com kit de purificação *GE Healthcare GCF PCR DNA and Gel Band*, conforme orientações do fabricante. As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento em equipamento ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* pela empresa ACTGene Análises moleculares. As seqüências foram tratadas no *software* Geneious 4.8.5 (KEARSE et al., 2012), e identificadas por similaridade com seqüências depositadas no banco de dados do *Nacional Center for Biotechnology Information - NCBI* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) com o auxílio do *Nucleotide BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi empregada seguindo o protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986) com sondas específicas dos DNAs 18S e 5S, do gene DNAsn U2 e do DNA telomérico, adotando uma condição de alta estringência (2,5 ng/ $\mu$ L sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h). Para a detecção das sondas durante o processo de FISH foram utilizados os anticorpos streptavidina conjugada com alexa fluor 488 (*Invitrogen*) e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (*Roche Applied Science*). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2  $\mu$ g/mL) em meio de montagem *Vectashield* (Vetor).

### 3.2.4 Análise das lâminas e montagem dos cariótipos

As lâminas submetidas às técnicas citogenéticas clássicas foram analisadas em microscópio de campo claro, e a captura das imagens ocorreu utilizando o programa DP-Controller-BSW em Câmara de Captura Olympus DP71 12 mp, acoplada ao microscópio campo claro Olympus Bx41. Já as da citogenética molecular foram analisadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®), em Câmara Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels. As fotografias dos cromossomos foram recortadas e em seguida os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico) com o auxílio do software Adobe Photoshop CC. A classificação cromossômica adotada foi baseada em Levan; Fredga, e Sandberg (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte: RB= 1,00 - 1,70 / metacêntrico (m); RB= 1,71 - 3,00 / submetacêntrico (sm); RB= 3,01 - 7,00 / subtelocêntrico (st) e RB= maior que 7,00 / acrocêntrico (a).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados em duas sessões, que correspondem ao artigo científico e à *short communication*, respectivamente.

### 4.1 DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CARIOTÍPICA DE *Astyanax bifasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE) FRENTE À MORFOFISIONOMIA DO RIO IGUAÇU

#### RESUMO

Os eventos geomorfológicos afetam a biologia evolutiva das espécies, o que no caso dos peixes de água doce pode evidenciar as mudanças na conectividade dos sistemas hidrográficos, que modificam a distribuição e abundância das espécies. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi inferir a diversidade e variabilidade de *A. bifasciatus* ao longo da bacia do rio Iguaçu. Para isto foram empregadas análises morfométricas e citogenéticas. As análises morfométricas incluíram proporções corporais em relação ao comprimento do corpo e da cabeça. As análises citogenéticas contaram com a coloração convencional por Giemsa, localização das regiões organizadoras de nucléolo por nitrato de prata, detecção dos sítios de heterocromatina constitutiva pelo bandamento C, e hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S e DNAsn U2. Os resultados das análises morfométricas indicaram variação morfológica significativa entre as populações do baixo, médio e alto rio Iguaçu, sendo a localização das nadadeiras o caráter mais variável. A citogenética revelou o número diploide de 50 cromossomos para as populações do médio e alto Iguaçu,  $NF=86$  e  $FC=6m+24sm+6st+14a$ . Para a população do baixo Iguaçu o número diploide foi de 48 cromossomos, com  $NF=82$  e  $FC=6m+22sm+6st+14a$ . As Ag-RONs foram múltiplas para a população do médio Iguaçu e simples para as do alto e baixo Iguaçu, em sua maioria coincidindo com as regiões de DNAr 18S. O bandamento C evidenciou marcações centroméricas e pericentroméricas para as três populações e algumas marcações teloméricas distintas entre elas. A hibridização *in situ* fluorescente revelou marcações heterogêneas de DNAr 5S e 18S entre as populações, com as regiões de DNAr 5S coincidentes com a heterocromatina. Já a localização do gene DNAsn U2 ocorreu em apenas um homólogo nas populações do alto e baixo Iguaçu e em um par cromossômico na população do médio Iguaçu. Assim, os diferentes níveis de análise empregados em conjunto permitiram a percepção de existem grandes diferenças entre as populações de *A. bifasciatus* do alto, médio e baixo rio Iguaçu, provavelmente em resposta aos eventos geomorfológicos complexos que ocorreram na região

Palavras chave: Biogeografia, Análises Morfométricas, Citogenética.

#### ABSTRACT

The geomorphological events affect the evolutionary biology of the species, which in the case of freshwater fishes can show the changes in the connectivity of the hydrographic systems, which modify the distribution and abundance of the species. Therefore, the objective of this work was to infer the

diversity and variability of *A. bifasciatus* along the Iguaçú river basin. For this, purpose morphometric and cytogenetic analyzes were used. Morphometric analyzes included body proportions in relation to body length and head length. The cytogenetic analyzes included conventional staining by Giemsa, localization of nucleolar organizer regions by silver nitrate, detection of constitutive heterochromatin sites by C banding method, and fluorescent in situ hybridization with probes ribosomal 5S and 18S and snDNA U2. The results of the morphometric analysis indicated a significant morphological variation among the populations of the lower, middle and upper regions of the Iguaçú river, with the location of the fins being the most variable character. The cytogenetics revealed the diploid number of 50 chromosomes for the populations of the middle and upper regions of the Iguaçú river,  $NF=86$  and  $FC=6m+24sm+6st+14a$ . For the lower population of the Iguaçú river the diploid number was 48 chromosomes, with  $NF=82$  and  $FC=6m+22sm+6st+14a$ . The NORs were multiple for the middle population of the Iguaçú river and simple for those of the upper and lower populations of the Iguaçú river, most of them coinciding with the 18S rDNA regions. The C-banding showed centromeric and pericentromeric markers for the three populations and some distinct telomeric markers between they. The fluorescent in situ hybridization revealed heterogeneous 5S and 18s rDNA markers between the populations of the Iguaçú river, with the 5S rDNA sites coincident with the heterochromatin. Already, the location of the snDNA U2 gene occurred in only one homologue in the upper and lower populations of the Iguaçú river and in one chromosomal pair in the middle population of the Iguaçú river. So, the different levels of analysis employed together allowed the perception of there are great differences between the populations of *A. bifasciatus* of the upper, middle and lower regions of the Iguaçú river, probably in response to the complex geomorphological events that occurred in the region.

Keywords: Biogeography, Morphometric Analyzes, Cytogenetics.

## Introdução

O continente Sul Americano é caracterizado geologicamente pela formação de conjuntos de rochas pré-cambrianas passíveis de deformações devido a eventos tectônicos ressurgentes que revelam estruturas antigas (SAADI, 1993; RICCOMINI; ASSUMPÇÃO, 1999; SUGUIO, 2001; SAADI et al., 2005). No Paraná, o padrão de drenagem das bacias hidrográficas é determinado pelo escudo cristalino brasileiro, que atua direcionando a foz dos rios para dentro do continente (MINEROPAR, 2017). Dentre estas bacias hidrográficas encontra-se a bacia hidrográfica do rio Iguaçú, localizada ao sul do estado do Paraná e norte de Santa Catarina, com uma área que se estende por 72.000 Km<sup>2</sup> na região sudeste da América do Sul, abrangendo áreas do sul do Brasil e nordeste da Argentina (PARANÁ, 2010). Sendo dividida em três unidades hidrológicas: Baixo Iguaçú, Médio Iguaçú e Alto Iguaçú (PARANÁ, 2010).

O rio Iguaçú é geologicamente antigo, rejuvenescido por processos de soerguimento, responsáveis pela existência de corredeiras, saltos, meandros e várzeas (MAACK, 1981). Além

disso, ele é altamente compartimentalizado pela sua formação geológica e as barreiras artificiais (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010). Somado a isto, o desnível de sua foz no rio Paraná que é de aproximadamente 830 m e a formação das cataratas do Iguazu há 22 milhões de anos atrás (SEVERI; CORDEIRO, 1994), contribuíram para a formação de barreiras à sua ictiofauna, para a origem de seu endemismo e a ausência das famílias de peixes migratórios mais comuns da bacia do rio Paraná (SAMPAIO, 1988).

Uma das ordens de peixes presentes na bacia do rio Iguazu é Characiformes, que pode ser encontrada na África do Sul e nas Américas, esta ordem abrange peixes que possuem corpo coberto por nadadeiras cicloides e nadadeiras pélvicas em posição abdominal (BAUMGARTNER et al., 2012). Adicionalmente, o tamanho varia desde poucos centímetros até mais de meio metro de comprimento (MALABARBA, 2013). Citogeneticamente a ordem apresenta uma grande diversificação cromossômica, em especial a família Characidae, que apesar desta diversidade, conserva um número diploide variando entre 48 e 54 cromossomos (OLIVEIRA et al., 1988). Neste cariótipo, o primeiro par de cromossomos é um metacêntrico grande que se destaca dos demais cromossomos do complemento (SCHELL, 1973), na maioria de suas espécies. Characidae é amplamente distribuída na região Neotropical, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Patagônia na Argentina (MIRANDE, 2010). O tamanho corporal de suas espécies varia de pequeno a grande porte, e suas estratégias reprodutivas e alimentares são diversificadas (BAUMGARTNER et al., 2012). O elevado número de espécies presente em Characidae somado à ausência de sinapomorfias para a determinação de subfamílias monofiléticas fez com que 92 de seus 170 gêneros fossem considerados como *Incertae sedis*, como, por exemplo, *Astyanax* (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; MIRANDE, 2009; BAUMGARTNER et al., 2012).

O gênero *Astyanax* é composto por espécies conhecidas popularmente como lambaris ou piabas, amplamente distribuídas na região Neotropical, com destaque nas bacias da América do Sul (MALABARBA, 2013). Morfologicamente apresenta nadadeira adiposa, duas fileiras de dentes no pré-maxilar, com cinco dentes na série interna; linha lateral completa e nadadeira caudal sem escamas (EIGENMANN, 1921; 1927). Citogeneticamente o gênero exibe número diploide variando desde 36 cromossomos em *A. shubarti* (MORELLI, 1983; DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2001) até 50 cromossomos, sendo este o número modal para o gênero (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995), onde não ocorrem cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (MORELLI, 1983).

Dentre as espécies de *Astyanax*, *A. bifasciatus* recentemente descrita por Garavello e Sampaio (2010) e endêmica da bacia hidrográfica do rio Iguazu, apresenta morfologia formada

por corpo claro, nadadeiras avermelhadas e uma marcha umeral seguida de uma mancha pós-umeral difusa e verticalmente alongada (BAUMGARTNER et al., 2012). Neste sentido, sabe-se que as espécies do gênero *Astyanax* apresentam grande similaridade morfológica, o que torna a identificação a nível específico dificultada (VAZZOLLER; MENEZES, 1992). Sendo assim estudos que além de caracteres morfológicos tidos como a ferramenta primordial na taxonomia, utilizem ferramentas como a anatomia interna, fisiologia, biogeografia, genética e análises moleculares (WARD; HANNER; HEBERT, 2009) se tornam importantes para a distinção das espécies e para estudos evolutivos.

Dentre estas ferramentas, a citogenética é amplamente utilizada para gerar informações que possam ser utilizadas como marcadores espécie-específicos, os quais associados a marcadores cromossômicos podem auxiliar na caracterização e diferenciação das espécies (HOWELL; BLACK, 1980; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr., 1986; ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000; SUMNER, 2003; GALETTI Jr; MARTINS, 2004; MARTINS, 2007). Portanto, estudos utilizando diversos marcadores (morfológicos, citogenéticos e moleculares) em grupos como *Astyanax* que é considerado de relativa importância para estudos de padrões biogeográficos e de vicariância (BAIRD; GIRARD, 1854; GARCIA; DOMINGUEZ; DOADRIO, 2008). Em especial nas bacias hidrográficas com uma história geomorfológica complexa como é o caso da bacia do rio Iguaçu (MAACK, 1981), pois são de grande valia para o entendimento da história evolutiva das espécies, com maior atenção às endêmicas como é o caso de *A. bifasciatus*. Justificando assim, o objetivo do presente trabalho que foi inferir a diversidade e variabilidade de *A. bifasciatus* ao longo da bacia hidrográfica do rio Iguaçu, utilizando análises morfométricas e citogenéticas.

## **Material e métodos**

Os espécimes utilizados para o presente trabalho pertenciam a bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Para as análises morfométricas os indivíduos foram provenientes de Piraquara (S 25°2.982' W 049 02.674') no alto Iguaçu (15 indivíduos), União da Vitória (S 26° 17'13.98 W 51° 17'54.18) no médio Iguaçu (15 Indivíduos) e Boa Esperança do Iguaçu (S 25°59'59.9 W 53°48'63.24) no baixo Iguaçu (15 indivíduos). Sendo estes indivíduos selecionados a partir da coleção ictiológica do Museu de História Natural do Capão da Imbuia. Os indivíduos usados para as análises citogenéticas foram coletados na região do alto Iguaçu, em Piraquara (S 25°2.982' W 049 02.674') (2 machos), no médio rio Iguaçu em União da Vitória (S 26°15'1.11 W 51°6'10.67) (16 machos e 15 fêmeas) e na região do baixo rio Iguaçu, em Realeza (S

25°45'52.5 W 53°34'59.9) (6 machos e 11 fêmeas) (figura 02). Foram seguidas boas práticas de experimentação animal, autorizadas por Comitê de Ética. Os espécimes de União da Vitória foram identificados e depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA (NUP 16898), da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Os demais espécimes estão em processo de identificação taxonômica morfológica e depósito no Museu de História natural do Capão da Imbuia, em Curitiba, Paraná.

#### Análises morfométricas

As análises de morfometria geométrica realizadas neste trabalho ocorreram em 45 indivíduos adultos de *A. bifasciatus* (15 de cada uma das regiões do rio Iguaçu). Tais análises foram baseadas na definição de forma (*shape*) e todas as suas configurações geométricas, exceto tamanho, posição e orientação (KLINGENBERG et al. 2012) utilizando os marcos anatômicos para extração da informação da forma através da Superimposição de Procrustes (DRYDEN; MARDIA, 1998). As imagens dos espécimes foram obtidas a partir da região lateral esquerda do corpo dos mesmos a uma distância de 20 cm, utilizando a câmera Nikon Coolpix P530. Além disso, para a obtenção das imagens, todos os espécimes foram posicionados sobre papel milimetrado para futura transformação dos pixels em função do tamanho em centímetros.

Para ordenamento das imagens da mesma estrutura corporal no mesmo arquivo TPS foi utilizado o software tpsUtil (ROHLF, 2008). O software tpsDig2 (ROHLF, 2006) foi empregado para registrar os marcos anatômicos em cada imagem digitalizada. Tais marcos anatômicos foram estabelecidos de acordo com Pavanelli e Oliveira (2009) (figura 03). O programa MorphoJ 1.02b® (KLINGENBERG, 2011) foi utilizado para realizar a Análise Generalizada de Procrustes (ROHLF; SLICE, 1990) a Análise de Componentes Principais (PCA) e Variáveis Canônicas (CVA) a partir do teste de permutação (n=10000) para a distância de Procrustes (KLINGENBERG; MONTEIRO, 2005) e cujos resultados foram visualizados em gráficos do tipo *outline drawing*.

#### Análise citogenética convencional e molecular

As metáfases mitóticas foram obtidas utilizando o protocolo de Bertollo; Moreira-Filho e Galetti Jr. (1986). Para a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980). Já para a detecção da Heterocromatina

Constitutiva foi adotado o protocolo proposto por Sumner (1972) utilizando a coloração com iodeto de propídio (LUI et al., 2009).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ocorreu de acordo com o protocolo proposto por Pinkel; Straume e Gray (1986), com a estringência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, à 37 °C por 16 horas). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos anti-digoxigenina conjugada com rodamina e streptavidina conjugada com FITC (*Roche Applied Science*). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem *Vectashield*. A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S, obtidas respectivamente a partir de clonagem do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI Jr., 2004) e de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI Jr, 1999) por meio de plasmídeo, utilizando os primers universais para plasmídeo M13 F(5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') e R(5'-AGC GGA TAA CAA TTTC ACA C-3') e com sonda do gene DNAsn U2, utilizando os primers F (5' –ATC GCT TCT CGG CCT TAT G- 3') à 10ng/ μl, 0,5 μl de primer R (5' –TCC CGG CGG TAC TGC AAT A- 3') (BUENO, PALACIOS-GIMENEZ e CABRAL-DE-MELLO (2013) e o DNA genômico de *Astyanax bifasciatus* previamente extraído por meio do método de extração salina (BRUFORD et al., 1992, adaptado por David Vieites) utilizando amostras de fígado e músculo dos espécimes.

A amplificação de sondas dos genes ribossomais 5S e 18S e do gene DNAsn U2 ocorreu por meio de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com marcação por meio de Biotina 16 DUTP (*Roche applied science*) no caso dos genes DNAr 18S e DNAsn U2 e Digoxigenina 11 DUTP (*Roche applied science*) no caso do gene DNAr 5S. Com as seguintes reações: Para o gene 5S a reação de amplificação foi a seguinte: 5 μl de tampão 10x, 2,5 μl de MgCl<sub>2</sub> (50Mm) , 4 μl de primer F (5'-AGC GGA TAA CAA TTTC ACA C-3') a 10ng/ μl, 4 μl de primer R (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') a 10ng/ μl, 1 μl de dCPT (2nM), 1 μl de dGTP (2nM), 1 μl de dATP (2nM), 0,7 μl de dTTP (2nM), 0,6 μl de Digoxigenina 11 dUTP (2nM), 1 μl de DNA (100ng/ μl), 0,4 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 50 μl. Com a programação do ciclador térmico composta por um ciclo de desnaturação à 95°C por 4 min , seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min; anelamento à 51°C por 1 min e extensão à 72°C por 1,30 min, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C.

Para o gene 18S a reação de amplificação foi a seguinte: 5 μl de tampão 10x, 2,5 μl de MgCl<sub>2</sub> (50Nm), 4 μl de primer F (5'-AGC GGA TAA CAA TTTC ACA C-3') a 10ng/ μl, 4 μl de primer R (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') a 10ng/ μl, 1 μl de dCPT (2nM), 1 μl de

dGTP (2nM), 1 µl de dATP (2nM), 0,7 µl de dTTP (2nM), 0,6 µl de Biotina 16 dUTP (2nM), 1 µl de DNA molde (100ng/ µl), 0,4 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 50 µl. Com a seguinte programação: um ciclo de desnaturação à 95°C por 4 min , seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min; anelamento à 51°C por 1 min e extensão à 72°C por 1,30 min, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C.

Para a amplificação da sonda do gene DNAsn U2 a reação foi a seguinte: 2,5 µl de tampão 10x, 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50Mm), 0,5 µl de primer F (5' –ATC GCT TCT CGG CCT TAT G- 3') à 10ng/ µl, 0,5 µl de primer R (5' –TCC CGG CGG TAC TGC AAT A- 3') à 10ng/ µl, 0,5 µl de dCPT (2nM), 0,5 µl de dGTP (2nM), 0,5 µl de dATP (2nM), 0,4 µl de dTTP (2nM), 0,3 µl de Digoxigenina 11 dUTP (2nM), 0,5 µl de DNA (100ng/ µl), 0,2 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 25 µl. Com a programação do ciclador térmico: um ciclo de desnaturação à 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 s; anelamento à 56,8°C por 45 s e extensão à 72°C por 45s, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C.

As lâminas submetidas às técnicas citogenéticas clássicas foram analisadas em microscópio de campo claro e a captura das imagens ocorreu por meio do programa DP-Controller-BSW em Câmara de Captura Olympus DP71 12 mp, acoplada ao microscópio campo claro Olympus Bx41. As lâminas da citogenética molecular foram analisadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®), em Câmara Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels. Os cariótipos foram montados com o auxílio do software Adobe Photoshop CC e os cromossomos foram classificados segundo Levan; Fredga, e Sandberg (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a).

## Resultados

### Análise morfológica

Os resultados da morfometria geométrica para *A. bifasciatus* da bacia do rio Iguaçu, baseados na análise de componentes principais (PCA) demonstraram que três componentes principais explicam a maioria da variação dos dados (59,923%). Para explicar 100% da variação morfológica, esse número sobe para 16 (Figura 04), o que indica que os espécimes das três populações de *Astyanax bifasciatus* analisadas apresentam um compartilhamento de variações

corporais, dentro de um morfo-espaco. Dentre as medidas geradas pela distância entre os 10 marcos anatômicos estabelecidos, os caracteres que mais variaram foram o comprimento da inserção da nadadeira ventral à inserção final da nadadeira anal (26,415%), o comprimento da inserção da nadadeira ventral à inserção anterior da nadadeira dorsal (20,656%) e o comprimento da inserção da nadadeira ventral à inserção posterior da nadadeira dorsal (12,852%).

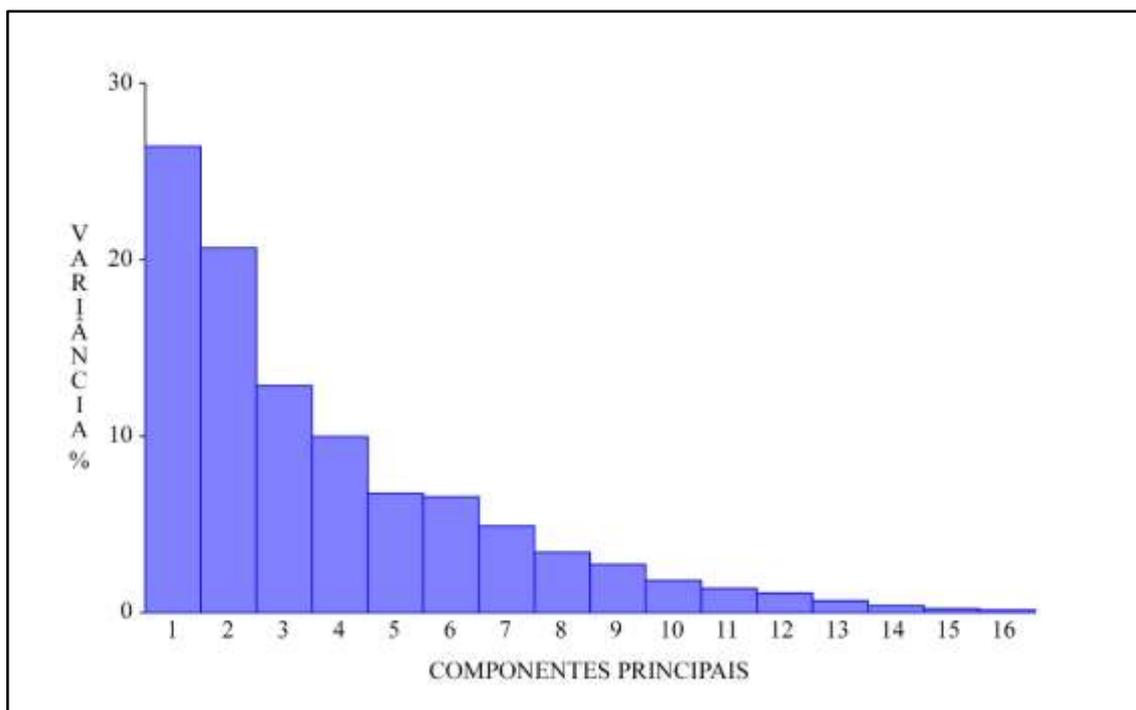


Figura 04: Porcentagem de variação explicada por cada componente principal.

Analisando o gráfico que apresenta os dois componentes que explicam maior variação nos dados (47,072% da variação, CP1 26,415% e CP2 20,656%) (Figura 05), é possível verificar que os espécimes das regiões do alto e baixo rio Iguaçu estão distribuídos em sua maioria na região negativa do componente principal 1, e nas regiões positiva e negativa do componente principal 2. Por outro lado, os indivíduos da população do médio Iguaçu estão localizados de forma geral na região positiva do componente principal 1, e positiva e negativa do componente principal 2. Com relação aos marcos anatômicos, a inserção anterior da nadadeira dorsal e a inserção da nadadeira ventral, foram os marcos que mais influenciaram a distribuição dos indivíduos na região positiva do componente principal 1. Já na região negativa deste mesmo componente, a inserção posterior da nadadeira anal e a inserção da nadadeira ventral, foram os marcos que tiveram maior influência sobre os resultados. Para a região positiva do componente principal 2, os marcos que direcionaram a distribuição dos organismos

foram a inserção da nadadeira ventral e a inserção posterior da nadadeira dorsal, e na parte negativa foram a região dorsal da cabeça e a inserção posterior da nadadeira anal.

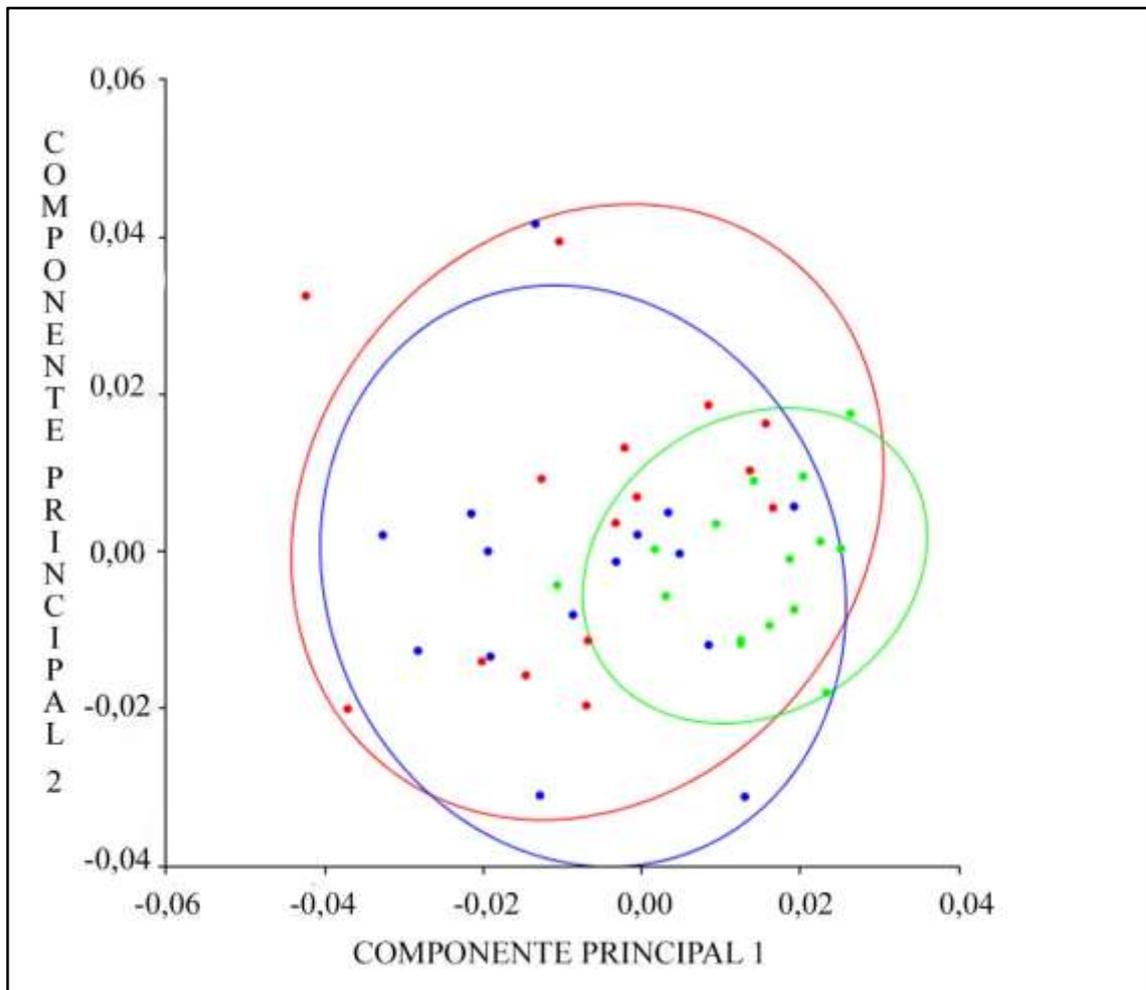


Figura 05: Componentes principais que explicam a maior variação dos dados morfológicos (CP1 26,415% e CP2 20,656%). Em azul a população do alto Iguaçu, em verde a do médio Iguaçu e em vermelho a do baixo Iguaçu.

Com relação às Variáveis Canônicas (CVA) foi possível observar a formação de 3 grupos estatisticamente diferentes (Tabela 01).

Tabela 01: Valores de p gerados a partir da análise de variáveis canônicas para as populações do alto, médio e baixo rio Iguaçu.

Distância de Procrustes entre as populações		
	Alto Iguaçu	Médio Iguaçu
Alto Iguaçu	-	
Médio Iguaçu	p=0,0248	-
Baixo Iguaçu	p=0,0188	p=0,0247

Os dois primeiros eixos da CVA somaram 100% da variação corporal entre as populações (eixo 1: 61,674% e eixo 2: 38,326%) (Figura 06). Sendo a população do alto Iguaçu localizada na região positiva da variável 1 e negativa da variável 2. A população do baixo Iguaçu localizada na região negativa da variável 1 e positiva e negativa da variável 2. E a população do médio Iguaçu localizada em sua maioria na região positiva das variáveis 1 e 2.

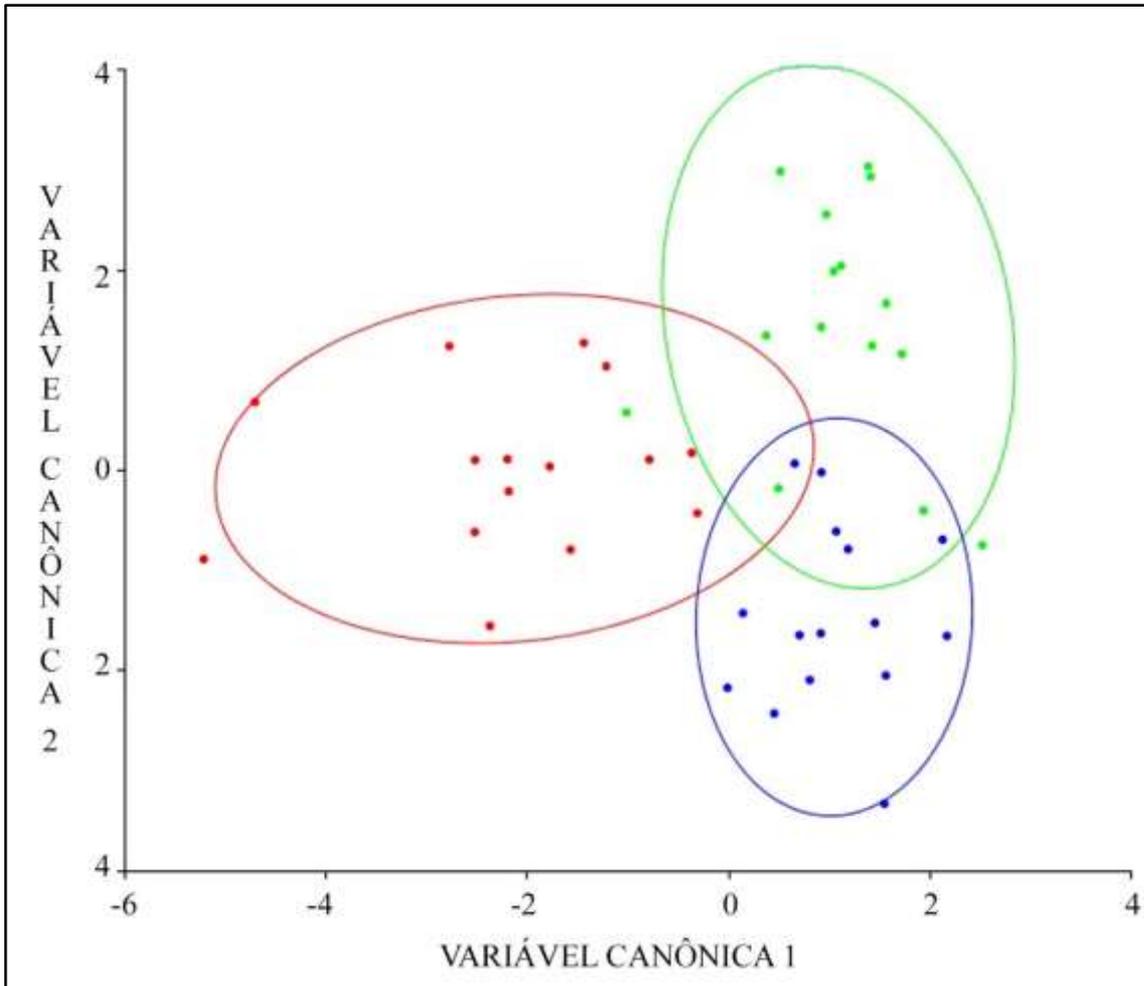


Figura 06: Variáveis Canônicas demonstrando a formação de três grupos distintos correspondentes as populações de *A. bifasciatus*. A variável canônica 1 contém 61,674% da variação dos dados e a variável canônica 2 contém 38,326%. Em azul a população do alto Iguaçu, em verde a do médio Iguaçu e em vermelho a do baixo Iguaçu.

#### Análises citogenéticas clássicas e moleculares

As populações do médio e alto Iguaçu tiveram um número diploide de 50 cromossomos, já a população de *A. bifasciatus* do baixo rio Iguaçu apresentou número diploide de 48 cromossomos. As três populações exibiram o primeiro par de cromossomos metacêntricos de grande porte quando comparado aos outros cromossomos do complemento. A fórmula cariotípica encontrada para as populações do médio e alto Iguaçu foi a mesma, composta por 6 cromossomos metacêntricos, 24 submetacêntricos, 6 subtelocêntricos e 14 acrocêntricos, com

número fundamental de 86. Já a população do baixo Iguaçu teve sua fórmula cariotípica constituída por 6 cromossomos metacêntricos, 22 submetacêntricos, 6 subtelocêntricos e 14 acrocêntricos, com número fundamental de 82 (Figura 07). Não foi constatada a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados.

As regiões organizadoras de nucléolo se apresentaram múltiplas, para a população do médio Iguaçu, presentes nos braços curtos dos cromossomos do par 5 e em apenas um homólogo do par 16. As populações do alto e baixo Iguaçu apresentaram regiões organizadoras de nucléolo simples, localizadas no centrômero de um homólogo do par 21 na população do baixo Iguaçu e no braço curto de um homólogo do par 16 para a população do alto Iguaçu. As Ag-RONs presentes nas populações do alto e médio Iguaçu foram coincidentes com sítios de DNAr 18S.

A localização das regiões de heterocromatina foi heterogênea entre as populações, grande parte dos sítios de heterocromatina ocorreu na região centromérica ou pericentromérica da maioria dos cromossomos. Na população do alto Iguaçu ocorreram sítios heterocromáticos na região telomérica dos braços longos do par 4, e em apenas um homólogo dos pares 19 e 21. Para a população do médio Iguaçu foram visualizados sítios heterocromáticos nos telômeros dos braços longos de um homólogo dos pares 12, 16 e 23 e no par 19. Para a população do baixo Iguaçu, foram observadas marcações de heterocromatina no braço curto do par 15 e na região telomérica do braço longo de um homólogo do par 17 (Figura 08).

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente revelou a presença do DNAr 18S para a população do alto Iguaçu nos braços curtos do par 16. Na população do médio Iguaçu ocorreram marcações de DNAr 18S nos braços curtos do par 5 e em um homólogo do par 16. Enquanto que para a população do baixo Iguaçu foram evidenciados sítios no centrômero de um homólogo dos pares 18 e 21 e na região telomérica do braço longo do outro homólogo 21. A localização do DNAr 5S na população alto Iguaçu foi na região centromérica de um homólogo do par 3 e no par 19. Para a população do médio Iguaçu foram verificados na região centromérica do par 21 e de um homólogo do par 4. Na população do baixo rio Iguaçu foi nos braços curtos dos cromossomos do par 15 (Figura 09). O gene DNAsn U2 apresentou sítios localizados na região centromérica de um homólogo do par 10 para a população do alto Iguaçu. A população do médio Iguaçu apresentou o gene DNAsn U2 localizado nos braços curtos dos cromossomos do par 13. A população do baixo Iguaçu exibiu um sítio do gene DNAsn U2 localizado no braço curto de um homólogo do par 6.

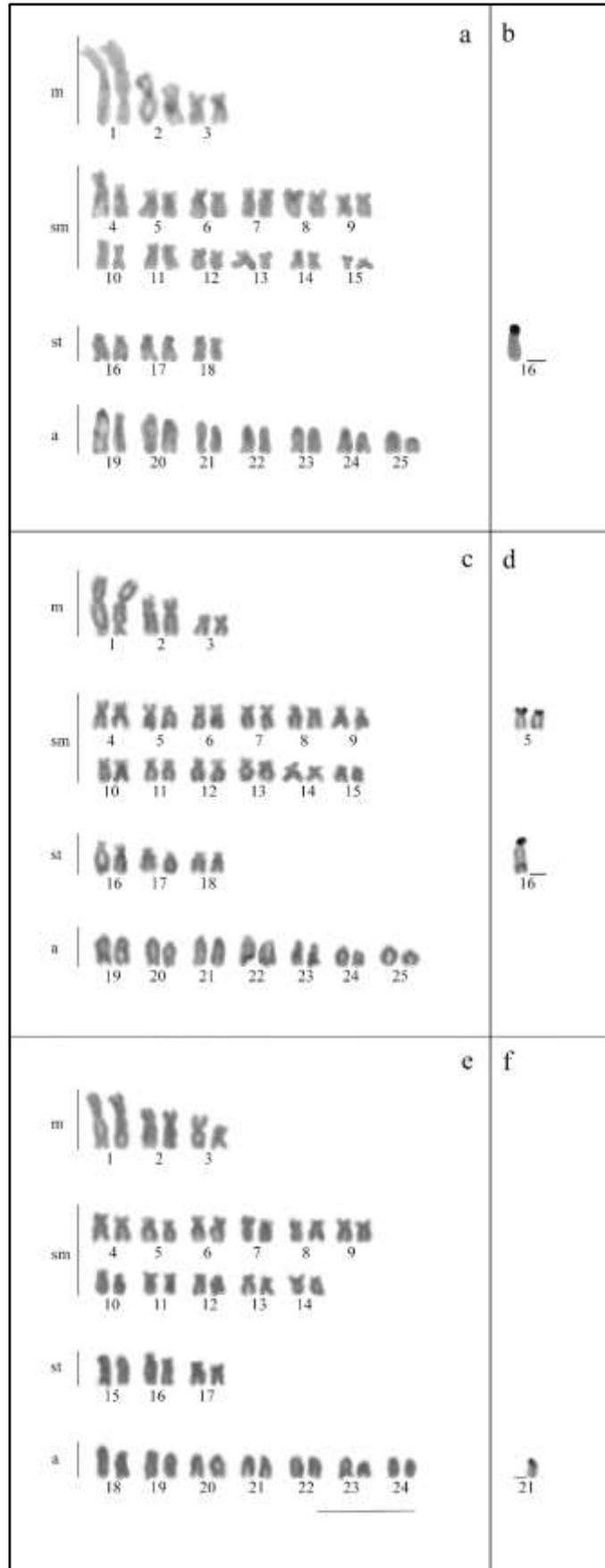


Figura 07: Cariótipos de *A. bifasciatus* elaborados com coloração convencional (Giemsa) com destaque (à direita) para os cromossomos marcados com Ag-RONs. Alto Iguaçu (a e b), médio Iguaçu (c e d), baixo Iguaçu (e e f). Barra = 10 $\mu$ m. Legenda (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.

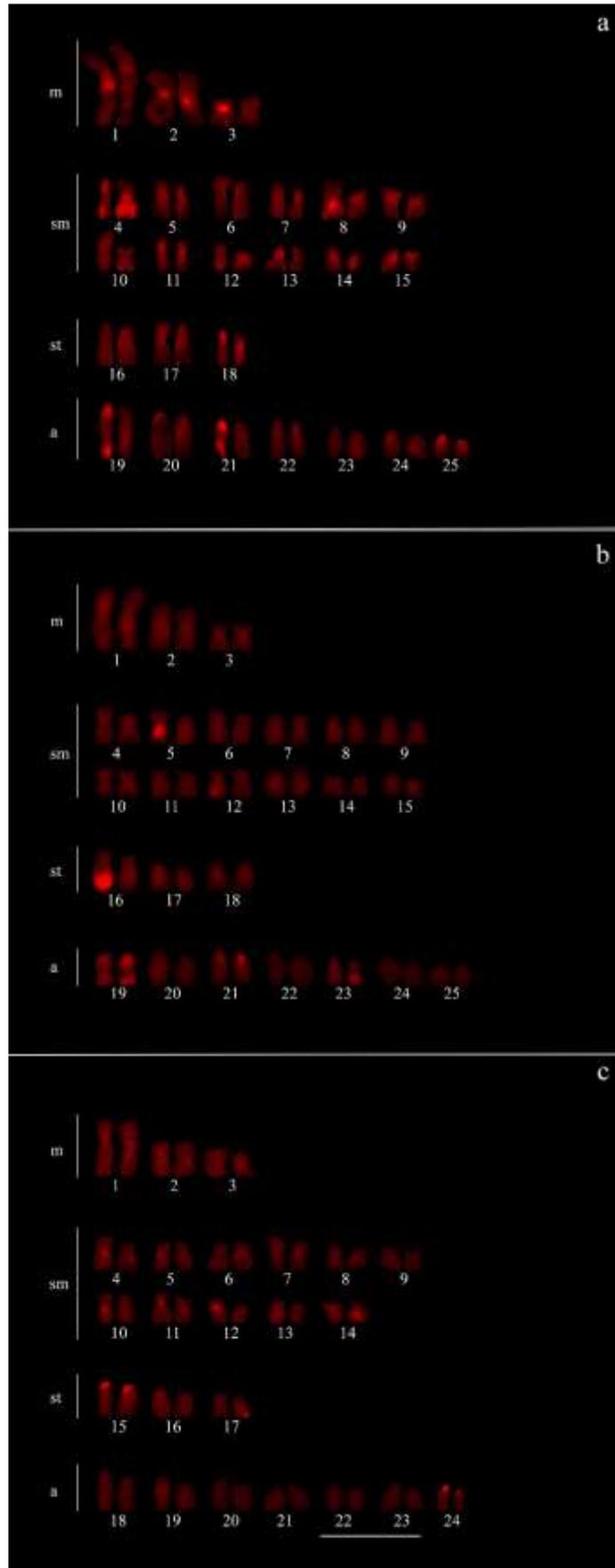


Figura 08: Marcações de heterocromatina constitutiva em *A. bifasciatus* através de bandamento C. Em (a) alto Iguaçu, (b) médio Iguaçu e (c) baixo Iguaçu. Barra=10 $\mu$ m. Legenda: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.

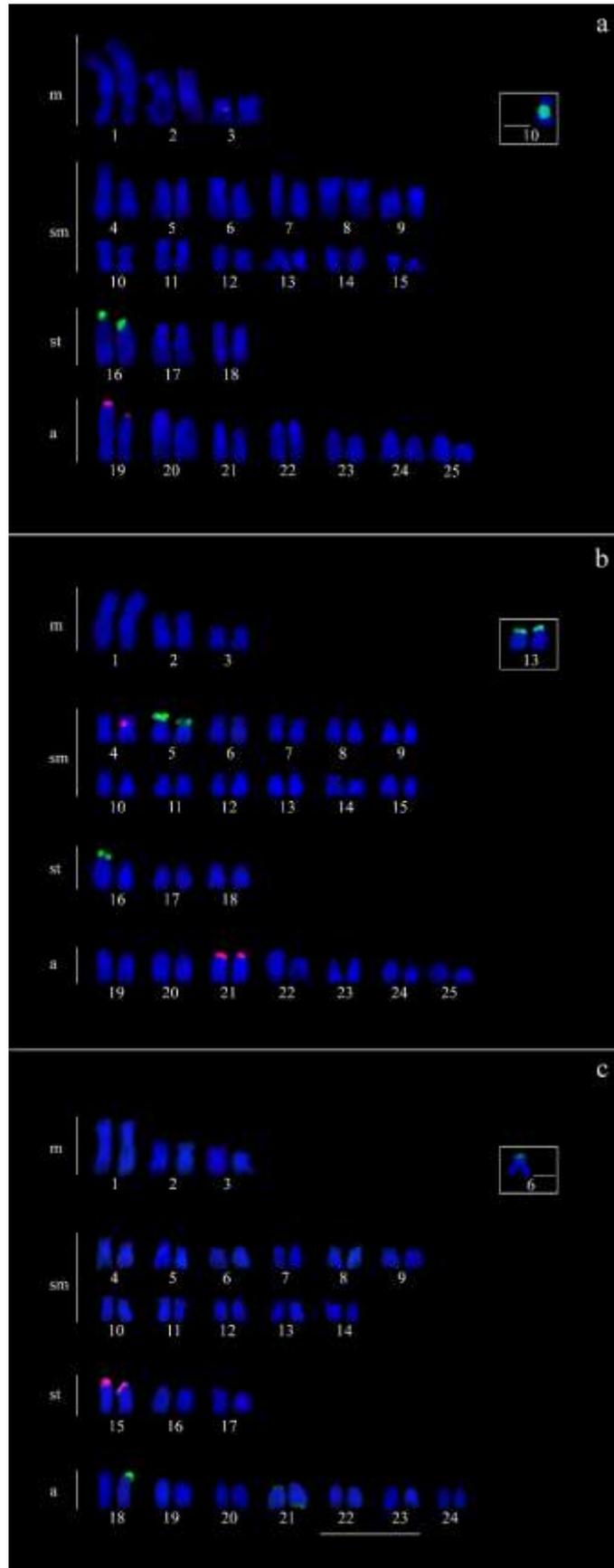


Figura 09: Localização com marcadores cromossômicos de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) em *A. bifasciatus*. Com destaque à direita os cromossomos com marcador de DNAsn U2. Em (a) alto Iguaçu, (b) médio Iguaçu e (c) baixo Iguaçu. Barra = 10μm. Legenda: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.

## Discussão

As análises morfométricas com PCA indicaram que as populações de *A. bifasciatus* apresentam um compartilhamento de variações corporais dentro de um mesmo morfo-espaço, o que é corroborado pelo fato de que os *Astyanax* apresentam uma grande similaridade morfológica, tanto dentro de uma população quanto entre populações ou espécies distintas (VAZZOLLER; MENEZES, 1992). Entretanto, os resultados revelam que além da área de sobreposição da variação morfológica, cada população apresenta uma tendência de diferenciação corporal, visto que variações corporais no sentido positivo do componente principal 1 (PC1+) apresentaram maior tendência de mudança corporal para população do médio Iguaçu, enquanto que no sentido negativo do componente principal 1 (PC1 -) a variação corporal apresentou maior tendência para as populações do alto e baixo Iguaçu. Por outro lado, para o PC2 a maioria dos indivíduos das três populações se localizou próximo à 0. Esta sobreposição dos caracteres entre os indivíduos, bem como a distinção destes entre os mesmos, devem-se provavelmente a eventos antagônicos: por um lado, os regimes seletivos diferentes podem gerar e manter diversidade morfológica entre as populações, como resultado de diferenças genéticas ou plasticidade fenotípica (ROBINSON; WILSON, 1994; TRAVIS, 1994). Por outro lado, o fluxo gênico e a migração de indivíduos restringem e limitam a diversificação adaptativa de populações em ambientes distintos (LANGERHANS et al., 2003). Espécies ou populações que ocupam os mesmos locais, podem apresentar morfologia semelhante em resposta às adaptações ao ambiente físico (GRANT, 1972), ou podem apresentar morfologia divergente como resposta à competição interespecífica ou intraespecífica, com consequente ocorrência de níveis mais altos de especialização e estreitamento de nicho (GATZ, 1979a).

Partindo deste pressuposto, ao analisar as variáveis morfométricas mensuradas no presente estudo, percebe-se que para a população do médio rio Iguaçu, a medida que teve maior variação influenciando fortemente a distribuição dos indivíduos no componente principal 1, foi a distância da inserção anterior da nadadeira dorsal à inserção da nadadeira ventral. Para as populações do alto e baixo Iguaçu, a medida que mais influenciou o resultado foi a inserção posterior da nadadeira anal e a inserção da nadadeira ventral. Com relação à PC2, para as três populações tanto a distância entre a inserção da nadadeira ventral à inserção posterior da nadadeira dorsal, quanto a da região dorsal da cabeça até a inserção posterior da nadadeira anal, foram as medidas que tiveram maior influência sobre o resultado. Uma das possíveis explicações para estas modificações que foram distintas entre as populações é o fato de que nos

peixes, as características morfológicas das espécies podem refletir aspectos ecológicos importantes e dar indicativos de seus hábitos e adaptações aos ambientes onde vivem (GATZ, 1979a; WATSON; BALON, 1984; WINEMILLER, 1991). O que também reflete os limites de seu desempenho e estabelece a amplitude de recursos que são capazes de explorar (WAINWRIGHT, 1994).

No gênero *Astyanax* em especial, a grande capacidade dos peixes em colonizar diferentes ambientes influencia na forma de seu corpo (ESTEVES; GALETTI Jr., 1995, HAHN et al. 1998, VILELLA et al. 2002, ORSI et al. 2004), pois existe uma íntima relação entre a forma do corpo do organismo, sua estrutura corporal, fisiologia e o ambiente no qual ele vive, sua ecologia alimentar e comportamento (LOWE-MCCONNELL, 1999). Características do indivíduo em relação ao seu meio, podem ser interpretadas como indicadores de hábitos de vida, ou de adaptações das espécies à ocupação de diferentes habitats, ou seja, a forma das nadadeiras, do corpo e da boca, influenciam a performance do peixe (GATZ, 1998; MAHON, 1984; PERES-NETO, 1999; WATSON; BALON, 1984; WINEMILLER, 1991). Demonstrando a relação direta entre o formato do corpo e a maneira como o habitat é utilizado (WINEMILLER, 1991), ou sua preferência na coluna d'água e o tipo de alimentação (WINEMILLER, 1992).

A variação observada entre a distância da inserção da nadadeira ventral à inserção posterior da nadadeira dorsal, pode modificar a altura relativa do corpo dos indivíduos, refletindo possíveis adaptações a habitats distintos, visto que uma maior altura relativa do corpo indica peixes que habitam regiões com alta velocidade de correnteza (GATZ, 1979b). Enquanto que corpos mais baixos e deprimidos habitam preferencialmente regiões próximas ao sedimento, pois esta morfologia favorece o desempenho na locomoção sobre o substrato (GATZ, 1979b). Além disso, os ajustes finos à locomoção dos peixes são feitos pelas nadadeiras, especialmente as pélvicas (BREDA; OLIVEIRA; GOULART, 2005), o que é importante para peixes ocupando habitat lênticos, onde frequentemente realizam manobras (NEVES; MONTEIRO, 2003). A manutenção da estabilidade do movimento e a realização de guinadas rápidas também dependem diretamente das nadadeiras dorsais e ventrais (BOND, 1979). Porque o arranjo destas nadadeiras ajusta a posição do corpo durante a propulsão, abaixando-a para minimizar a resistência e para alcançar maior velocidade e elevação nas guinadas e frenagens, assim como, permitindo a realização de movimentos para a direita e para a esquerda (deflexões) (BREDA; OLIVEIRA; GOULART, 2005). Deve-se destacar ainda, que apesar de não exibir tanta variação quanto a sua localização em *A. bifasciatus*, a nadadeira adiposa apresenta função equivalente à nadadeira dorsal (GOSLINE, 1971).

Estas modificações nas nadadeiras influenciam diretamente a capacidade natatória dos peixes, o que é um fator crucial para a sobrevivência nos ambientes aquáticos (TUDORACHE et al. 2008). As interações predador-presa, os hábitos alimentares, a reprodução, a migração e a dispersão são exemplos de processos de importância ecológica, que dependem da capacidade locomotora dos animais (KOLOK, 1999; REIDY; KERR; NELSON, 2000). Portanto, a capacidade natatória é considerada um fator determinante para o *fitness* dos peixes (PLAUT, 2001), visto que ela afeta a sobrevivência em termos individuais, estando por isso sujeita a várias pressões seletivas, que tendem a levar a um aumento do *fitness* evolutivo (PRIEDE, 1985). Atuando assim, de forma a provocar diferentes repostas a nível fenotípico (FRANSSEN et al. 2013).

Morfologicamente dentro do gênero *Astyanax*, a espécie *A. scabripinnis* possui um formato de corpo diferencial, fusiforme, robusto e mais baixo, para redução do gasto energético na natação prolongada, que condiz com a morfologia dos peixes de rios com correnteza moderada (ABILHOA; DUBOC, 2007) e em riachos localizados nas cabeceiras locais com forte correnteza (VIEIRA et al. 2005), onde é encontrada tal espécie. De acordo com Moreira-Filho e Bertollo (1991), as espécies do complexo *A. scabripinnis* apresentam sutil diferenciação morfológica quando coletadas em diferentes bacias e comparadas entre si. Ou até mesmo podem apresentar plasticidade fenotípica e diferenciação morfológica quando verificadas na mesma bacia hidrográfica (CARAMASCHI, 1986). Enquanto que, para *A. fasciatus*, que normalmente é encontrada em ambientes lênticos, o formato do corpo é generalizado. Segundo Medrado et al. (2008) em populações de *A. fasciatus*, mesmo que habitando uma única bacia hidrográfica, podem existir populações sofrendo pressões ambientais distintas, influenciando diretamente nos aspectos fenotípicos (ARTONI et al., 2006), como ocorreu para *A. bifasciatus* do presente estudo, segundo a análise de variáveis canônicas.

Este fenômeno também ocorre em outras espécies de *Astyanax*, como demonstrado por Santos e Araújo (2014), que ao utilizarem marcadores anatômicos e análises morfométricas, perceberam que espécimes de *A. bimaculatus*, pertencentes a ambientes lóticos e lênticos apresentaram diferenciação morfológica. Castro et al. (2014) em um estudo envolvendo novamente a espécie *A. scabripinnis* evidenciaram que existem diferenças morfológicas na espécie em duas regiões do mesmo rio, isoladas por uma queda d'água.

O resultado obtido pela análise de variáveis Canônicas determina três grupos estatisticamente diferentes, que correspondem às três populações de *A. bifasciatus* estudadas. Tal diferenciação significativa entre as populações de *A. bifasciatus* pode ser devida a inúmeros fatores, dentre eles ao fato de que os Characiformes passaram por uma grande divergência

evolutiva (GREENWOOD, 1966) sendo o gênero *Astyanax* considerado polifilético com base em sua morfologia (MIRANDE, 2010). Caracteres morfológicos são raramente constantes dentro das espécies, as quais podem apresentar desde pequena variação fenotípica até variações em maior escala em populações diferentes (TRAVIS, 1994). Segundo Langerhans (2009) tanto as trocas funcionais como a heterogeneidade do ambiente são amplamente responsáveis pela diversidade fenotípica dos organismos. A seleção natural divergente que atua em diferentes ambientes, surge geralmente de uma combinação de dois fatores: (i) uma troca funcional onde os organismos não podem otimizar simultaneamente vários tipos de desempenhos; e (ii) uma mudança no equilíbrio da seleção sobre estas variáveis de desempenho em função do ambiente, onde a seleção num dos ambientes favorece determinado tipo de desempenho, enquanto esta mesma seleção num outro ambiente favorece outro tipo de desempenho (LANGERHANS 2008, 2009).

Sidlauskas, Mol e Vari (2011) discorrem que as mudanças no corpo dos indivíduos também podem ser devidas à variação alométrica. Em seu estudo com espécies do gênero *Leporinus* utilizando morfometria linear e geométrica os autores demonstraram que para a morfometria linear as diferentes fases de vida dos indivíduos influenciavam nos resultados, dando uma ideia não representativa da variação real entre as espécies, o que não ocorreu com a utilização da morfometria geométrica que corrige os efeitos alométricos. Sendo assim, no presente estudo, as variações alométricas não tiveram influência sobre os resultados, uma vez que além da utilização da morfometria geométrica, foram empregados somente indivíduos adultos na análise.

Adicionalmente, os resultados morfométricos do presente trabalho corroboram ao afirmado por Gould e Johnston (1972) e Brett (1979), os quais asseguram que organismos da mesma espécie, quando localizados em diferentes ambientes ou expostos à diferentes fatores ambientais, podem apresentar fenótipos distintos. Em ambientes aquáticos, os fatores ambientais mais conhecidos são a variação de temperatura (HUBBS, 1922; BARLOW, 1961; BEACHAM, 1990), velocidade da água (CLAYTOR; MACGRIMMON; GOTS, 1991; MCLAUGHLIN; GRANT, 1994; IMRE; MCLAUGHLIN; NOAKES, 2002) e a existência de micro habitats (LUNDBERG; STAGER, 1985; LAYZER; CLADY, 1987; O'REILLY; HORN, 2004) induzindo a variação intraespecífica entre os peixes. Em rios e riachos, desde a nascente até a foz, existe um gradiente de condições físicas que pode impulsionar uma série de respostas adaptativas em suas populações constituintes, resultando em um *continuum*, de ajustes bióticos (UIEDA, et al., 1980). Em tais ambientes, os organismos tendem a adquirir caracteres

comportamentais e ecológicos, que de maneira geral, refletem a interação entre genótipo, fenótipo e o ambiente (PERES-NETO, 1999).

Vannote et al. (1980) afirmam que a heterogeneidade ambiental é um fator presente nos ecossistemas aquáticos que determina a estrutura das comunidades de peixes. Uma vez que cabeceiras possuem poucos habitats, como poças, pequenos remansos e corredeiras, onde os nutrientes resultantes da decomposição da matéria orgânica, mais a entrada de alimentos alóctones, são mais importantes que os processos autotróficos (VANNOTE et al., 1980). O substrato é pedregoso, a água é corrente, favorecendo a ocorrência de peixes com morfologia adaptada a natação efetiva (VANNOTE et al., 1980). Nos trechos inferiores, têm-se a planície de inundação predominantemente autóctone, com suas lagoas marginais, igapós, várzeas e mangues, com uma tendência ao aumento da biodiversidade de habitats, devido ao aumento da profundidade do rio (JUNK; BAULEY; SPARKS, 1989; JOHNSON; RICHARDSON; NAIMO, 1995). Nesta região a correnteza é baixa, as águas são mais turvas o substrato de fundo é lodoso, existindo uma maior riqueza de organismos, cuja morfologia é distinta daquela encontrada nos trechos mais altos do rio (JUNK; BAULEY; SPARKS, 1989; JOHNSON; RICHARDSON; NAIMO, 1995). Esta diferenciação morfológica ocorrente, de acordo com Castro et al. (2014), pode ser ainda mais pronunciada caso o fluxo gênico entre os indivíduos de diferentes regiões seja reduzido, pois com o passar do tempo evolutivo, as populações podem apresentar divergências morfológicas como consequência (ou não) da mudança da frequência gênica.

Sabe-se que as variações morfológicas correspondem a respostas a pressões seletivas e resultam do fenômeno de convergência (morfologia similar de espécies distantes filogeneticamente) ou divergência (espécies próximas filogeneticamente, porém com morfologias distintas) (WINEMILLER, 1991). Sendo esta divergência possivelmente devida à exclusão competitiva (GAUSE, 1934), pois, quando espécies filogeneticamente aparentadas (ou populações diferentes) e com necessidades ecológicas semelhantes coexistem em um ambiente, elas podem competir entre si e resultar na exclusão da espécie menos adaptada ou diferenciação de nicho (MARGALEF, 1986; PIANKA, 1994). Assim, para evitar competição direta por recursos, seria esperado que a população de *A. bifasciatus* do médio rio Iguazu tivesse uma maior especialização de nicho e conseqüentemente uma maior diferenciação morfológica em relação as demais. O que não ocorreu, visto que a morfologia de todas as populações foi significativamente diferente. Fato que pode ser explicado pela coexistência entre espécies aparentadas ou populações não necessariamente acompanhada de competição pelos recursos

ambientais (KNÖPPEL, 1970). Além disso, pequenas variações na dieta podem existir, o que facilitaria a coexistência (HYNES, 1970; GATZ, 1979a).

A complexidade do ambiente também tem efeitos sobre a morfologia dos organismos, pois a disponibilidade diferencial de nichos devido aos vários níveis de aumento na complexidade do ambiente, ocasiona efeitos distintos sobre a morfologia das espécies, levando a seleção de morfotipos mais adaptados a estes ambientes (WINEMILLER 1991, ROBINSON; WILSON 1994, JONSSON; JONSSON 2001). Uma vez que com o aumento da complexidade estrutural, há um aumento do número de obstáculos físicos para a exploração desses habitats, bem como a maior possibilidade de exploração de nichos (THOMAZ; CUNHA, 2010; CARNIATTO et al. 2013). Porém, mesmo desconsiderando as possibilidades propiciadas pela complexidade ambiental, Pakkasmaa e Piironen (2001) afirmam que é simplesmente improvável que um único fenótipo promova o melhor desempenho para uma espécie em todas as condições ambientais as quais ela está sujeita, visto que a diversificação morfológica intraespecífica é um fator importante para a sobrevivência de uma espécie em determinado ecossistema. Tais fatos possibilitam maior capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais, ao passo que um único morfotipo não deve oferecer o melhor desempenho para uma espécie em todas as situações (PAKKASMAA; PIIRONEN, 2001). Sendo os casos de diferenciação morfológica entre populações de peixes bem conhecidos, e podendo ser comprovados estatisticamente para *A. bifasciatus* que acumulou um certo grau de diferenciação morfológica.

Tal diferenciação morfológica não deve ser considerada como única fonte de evidência em estudos taxonômicos, mas sim em conjunto com dados genéticos (WILL; MISHLER; WHEELER, 2005), visto que ambas as técnicas são complementares e representam formas distintas de evidência (BUENO-SILVA, 2012). Sendo assim, se pode destacar que o número diploide obtido para as populações de *A. bifasciatus* do médio e alto rio Iguaçu esteve de acordo com o observado para outras populações da espécie, já a população do baixo rio Iguaçu apresentou número diploide não verificado em outros estudos, como evidencia a tabela 02. Porém, tendo em vista que a família Characidae apresenta uma grande amplitude numérica cromossômica, com acentuada predominância de números diploides entre 48 e 54 cromossomos (83,7%), seguidos dos números entre 54 e 64 (10,2%) e depois entre 28 e 46 (5,9%) (CESTARI, 2006), as populações de *A. bifasciatus* do presente estudo, apesar das diferenças, exibem números diploides entre os mais comuns para a família.

Com relação ao gênero *Astyanax*, as populações de *A. bifasciatus* do médio e alto Iguaçu obtiveram um número diploide tido como conservado e a população do baixo Iguaçu,

número diploide derivado. Embora o número diploide para o gênero seja entre 36 cromossomos como em *A. shubarti* e 50 cromossomos, a maioria das espécies exibe 50 cromossomos (PACHECO et al., 2010). Diferenças no número diploide entre populações da mesma espécie são comuns em *Astyanax*, como ocorre no complexo *A. scabripinnis* com cariótipos compostos por 46, 48 e 50 cromossomos (VICARI et al., 2008b) e no complexo *A. fasciatus* com números diploides de 45 cromossomos (PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006), 46 (JIM; TOLEDO, 1975; MORELLI, 1983; PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006), 47 (PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006), 48 (MORELLI, 1983; ARTONI et al., 2006; PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006; MEDRADO et al., 2008) e 50 cromossomos (ARTONI et al., 2006).

A diminuição no número diploide entre populações, a exemplo do que ocorre em *A. bifasciatus* pode ser originada a partir de fusões cromossômicas, com aumento de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, e conseqüentemente redução dos subteloicêntricos e acrocêntricos (VICARI et al., 2008a). Ocorridas distintamente entre populações e bacias, provavelmente devido a restrições no fluxo gênico, ocasionadas pela presença de obstáculos naturais ou eventos históricos (MEDRADO et al., 2008). Adicionalmente para as três populações de *A. bifasciatus* do presente estudo, foi observado o primeiro par cromossômico grande característico de Characidae (SCHELL, 1973), característica tida como simplesiomórfica no gênero *Astyanax* (SCHELL, 1973).

Além de diferenças no número diploide, as populações de *A. bifasciatus* analisadas tiveram diferentes fórmulas cariotípicas e números fundamentais. Sendo para as populações do médio Iguaçu e alto Iguaçu encontrado o número fundamental de 86 e a fórmula cariotípica de  $6m+24sm+6st+14a$ . Enquanto que para a população do baixo Iguaçu o número fundamental foi de 82 e fórmula cariotípica de  $6m+22sm+6st+14a$ . Como pode ser observado na tabela 02 o número fundamental (NF) encontrado para a espécie varia entre 82 e 88, sendo o número 86 o mais frequente. A fórmula cariotípica de *A. bifasciatus* neste trabalho apresentou todos os tipos cromossômicos, com prevalência de cromossomos de dois braços principalmente do tipo metacêntrico como ocorre em outros *Astyanax* (PAZZA; KAVALCO, 2007). Ao comparar outras populações da espécie percebe-se tanto fórmulas cariotípicas iguais, quanto bastantes distintas, inclusive com a ausência de cromossomos subteloicêntricos (tabela 02). Tal plasticidade entre as fórmulas cariotípicas e números fundamentais evidenciada neste estudo, corrobora ao que propõem Moreira-Filho e Bertollo (1991), uma vez que os membros da ordem Characiformes apresentam uma ampla variação na fórmula cariotípica tanto em espécies de um mesmo gênero, quanto em populações da mesma espécie. Assim, esta diferenciação também ocorre com populações de outras espécies, como analisado no complexo *A. scabripinnis*, onde

ocorrem diferentes fórmulas cariotípicas e o número fundamental varia de 76 a 100, fato observado tanto para populações dentro (PORTO; MARTINS-SANTOS, 2002; DOMINGUES, 2007; FERREIRA-NETO, 2009) quanto fora da bacia do rio Iguaçu (TENÓRIO, 2013; FERNANDES., 2014; YANO; MOREIRA-FILHO; MARGARIDO, 2014).

De acordo com Hoffman e Hieseberg (2008) as variações no número fundamental e na fórmula cariotípica observadas em diferentes populações ocorrem devido a eventos de diversificação cariotípica como inversões, uma vez que o número diploide muitas vezes permanece constante, alterando somente o número de braços cromossômicos. Além disso, a presença e acúmulo de elementos transponíveis pode ser responsável por variações genéticas e por provocar rearranjos cromossômicos que resultem em tais modificações no número fundamental e na fórmula cariotípica (MILLER; MCDONALD; PINSKER, 1997).

Tabela 02: Tabela comparativa dos dados citogenéticos de populações de *Astyanax bifasciatus* da bacia do rio Iguaçu.

Espécie	Local de Coleta	2n	NF	FC	RONs	B	Ref.
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Iguaçu, Nova Prata do Iguaçu, baixo rio Iguaçu	50	86	12m+12sm+12st+14a.	M	A	01
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Iguaçu, São Mateus do Sul, médio rio Iguaçu	50	86	6m+24sm+6st+14a.	S	A	02
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Reservatório de Salto Segredo, Reserva do Iguaçu, baixo rio Iguaçu	50	84	6m+16sm+12st+16a.	S	A	03
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Guarani, Cruzeiro do Iguaçu, baixo rio Iguaçu	50	84	6m+28sm+16a.	M	A	02
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Iguaçu, Piraquara, alto rio Iguaçu	50	88	4m+22sm+12st+12a.	M	A	04

Continuação da tabela 02

<i>Astyanax bifasciatus</i>	Reservatório de Salto Caxias, Nova Prata do Iguaçu/Capitão Leônidas Marques, baixo rio Iguaçu	50	86	6m+24sm+6st+14a.	-	P	05
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Piraquara, Piraquara, alto rio Iguaçu	50	86	6m+24sm+6st+14a.	M	A	06
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Iguaçu, União da Vitória, médio rio Iguaçu	50	86	6m+24sm+6st+14a.	M	A	06
<i>Astyanax bifasciatus</i>	Rio Capanema, Realeza, baixo rio Iguaçu	48	84	6m+22sm+6st+14a.	M	A	06

Fonte: 01-Barros e Margarido (1999), 02-Robaina e Cestari (1998), 03-Dias e Júlio Jr. (1996), 04-Ribeiro (2004), 05-Fazoli et al. (2003), 06-Presente estudo.

Nota: 2n (número diploide), FC (fórmula cariotípica), NF (número fundamental), B (cromossomo B), Ref. (referência), m (metacêntrico), sm (submetacêntrico), st (subtelocêntrico), a (acrocêntrico), M (múltipla), S (simples), P (presente), A (ausente).

A localização das Ag-RONs na região telomérica do braço curto de um par de cromossomos subtelocêntricos é comum no gênero *Astyanax* (TENÓRIO, 2013) e foi evidenciado no presente estudo para as populações do alto e médio rio Iguaçu. Além disso, foram observadas Ag-RONs múltiplas para a população do médio Iguaçu, o que é relativamente comum entre as espécies/populações de *Astyanax* (PAINTNER-MARQUES; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2002). Incluindo outras populações de *A. bifasciatus* (tabela 02) e espécies como *A. minor*, *A. ribeirae* e *A. serratus* (KANTEK et al., 2007; KAVALCO; PAZZA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010). Ag-RONs simples também foram encontradas nas populações do alto e baixo rio Iguaçu, as quais são menos comuns e mais basais que Ag-RONs múltiplas (SCHMID, 1980), mas também são visualizadas em outros estudos envolvendo *A. bifasciatus* (tabela 02) e em *A. altiparanae* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; FERREIRA-NETO, 2009; PACHECO et al., 2010; TENÓRIO, 2013; FERNANDES 2014; YANO; MOREIRA-FILHO; MARGARIDO, 2014).

As variações na localização e número de Ag-RONs acontecem não somente entre espécies e populações distintas, mas também entre indivíduos de uma mesma população (LOURENÇO; RECCO-PIMENTEL; CARDOSO, 1998). Sendo que tal diferenciação, pode ser devida aos sítios de DNAr 45S apresentarem acentuada variabilidade (GALETTI Jr.; MARTINS, 2004). Por outro lado, os agrupamentos de DNAr 45S negativos às Ag-RONs sugerem que estes não apresentam atividade de transcrição perceptível pela coloração com prata, ou podem representar resquícios não funcionais de segmentos de DNAr 45S (GALETTI Jr.; MARTINS, 2004).

O padrão de distribuição da heterocromatina Constitutiva, evidenciado pelo bandamento C, pode ocorrer em qualquer região do cromossomo, mas há uma prevalência de que se localize nas regiões pericentroméricas como afirma Stephens et. al. (2005). As populações de *A. bifasciatus* do presente estudo apresentaram predominância de heterocromatina pericentromérica, resultado semelhante ao encontrado por Fazoli et. al. (2003) para *A. bifasciatus* da região do baixo rio Iguaçu. As populações de *A. bifasciatus* deste estudo também exibiram marcações teloméricas dos braços longos do par 4, e em apenas um homólogo dos pares 19 e 21 na população do alto Iguaçu. Na população do médio Iguaçu ocorreram sítios de heterocromatina na região telomérica dos braços longos de um homólogo dos pares 12, 16 e 23 e no par 19. Para a população do baixo Iguaçu, foram observadas marcações de heterocromatina no braço curto do par 15 e na região telomérica de um homólogo do par 17 (Figura 08). Esse padrão diferiu do observado por Fazoli et al. (2003) que evidenciou marcações teloméricas nos pares 20, 21 e 22.

Estes polimorfismos de blocos heterocromáticos podem ser explicados por trocas desiguais, amplificação, acumulação e eliminação de sequências repetitivas nos cromossomos (JOHN, 1988). Como o *Crossing-over* desigual na meiose, que envolve a troca de unidades repetitivas entre cromossomos homólogos que se pareiam erroneamente, podendo causar a duplicação da sequência envolvida em uma cromátide e a deleção na outra (FAN; CHU, 2007). Jurka et al. (2007) complementam estes dados, afirmando que as grandes quantidades de sequências de DNA repetitivo nos eucariotos, como ocorre na heterocromatina, também podem ser devidos ao acúmulo por elementos transponíveis ou a ocorrência de rearranjos cromossômicos, dentre os quais as inversões e translocações. Além disso, o modelo de eventos de dispersão de Schweizer e Loidl (1987) prediz que as regiões teloméricas são mais propícias à transferência de material genético devido a sua proximidade dentro do núcleo interfásico, acumulando assim maior quantidade de heterocromatina (SCHWEIZER; LOIDL, 1987), o que

foi corroborado por *A. bifasciatus* do presente estudo, que exibiu blocos de heterocromatina telomérica.

O mapeamento de sequências de DNAr 5S e 18S realizado revelou marcações heterogêneas de DNAr 5S e 18S, em sua maioria em regiões intersticiais, o que corresponde a um padrão ancestral entre os peixes (PENDÁS et al., 1994; MARTINS; GALETTI Jr, 1999; 2001). As regiões de DNAr 5S tendem a ser mais conservadas nos peixes, geralmente com localização em um par de cromossomos acrocêntrico e um par metacêntrico (FERRO; MOREIRA-FILHO; 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a), como ocorreu nas populações de *A. bifasciatus* do alto e médio rio Iguaçu, a qual apresentou a localização de sítios de DNAr 5S em um par acrocêntrico e em um homólogo submetacêntrico, demonstrando que mais pares cromossômicos podem portar este gene, como vem sendo documentado (FERRO; MOREIRA-FILHO; 2001; VICARI et al., 2008a, presente estudo). A presença de sítios de DNAr múltiplos ocorreu na população de *A. bifasciatus* do alto e médio rio Iguaçu, como também ocorre em outras espécies, como *A. dissimilis* e *A. ribeirae* (KAVALCO; PAZZA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010). Para a população do baixo rio Iguaçu foi observado apenas um par de DNAr 5S, a exemplo do que ocorre em espécies como *A. altiparanae* e *A. minor* (DOMINGUES, 2007; FERREIRA-NETO, 2009; KANTEK et al., 2008).

O gene DNAr 18S por outro lado, possui número e localização variável e múltiplo em *Astyanax*, (NÉO; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 2000; FERRO; MOREIRA-FILHO, 2001; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a) corroborando ao observado para as populações do presente estudo, nas quais a localização deste gene foi distinta. Sendo os mecanismos de transposição responsáveis por esta variação (FERNANDES; MARTINS SANTOS, 2006, VICARI et al., 2008b).

Não foi evidenciada coincidência entre os sítios de DNAr 18S e 5S, o que é considerado um padrão comum para os vertebrados (SUZUKI; SAKURAI; MATSUDA, 1996) e pode ser justificado pelo fato de tal condição diminuir a ocorrência de rearranjos da sequência de 5S dentro do sítio portador do gene para DNAr 45S (MARTINS; GALETTI Jr., 1999). Por outro lado, ocorreu a localização coincidente do DNAr 5S com blocos de heterocromatina nas três populações, que é pouco comum, visto que é o DNAr 18S que muitas vezes está associado à heterocromatina telomérica, podendo ser transferido para sítios intersticiais de cromossomos não homólogos que estejam próximos (SCHWEIZER, LOIDL, 1987) e sendo afetado pelo modelo de dispersão Schweizer e Loidl (1987) assim como a heterocromatina, o que facilita sua co-localização.

O DNAsn U2 resultou em apenas um sítio em um homólogo nas populações do alto e baixo Iguazu, enquanto a população do médio Iguazu exibiu marcações de DNAsn U2 em um par cromossômico. O DNAsn U2 apresenta sequência conservada nos eucariotos, mas o número de sítios por genoma e a organização, mesmo em relação aos demais genes da família DNAsn pode variar bastante entre as espécies (BUSCH et al., 1982; DAHLBERG; LUND, 1988). Portanto, o mapeamento cromossômico dos genes de DNAsn U2 revela variações, com sequências acumuladas em um ou mais pares cromossômicos e também de maneira dispersa (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; MERLO et al. 2012; MERLO et al. 2013; UTSUNOMIA et al. 2014). Em sua maior parte, os DNAsns U2 estão localizados em cromossomos distintos daqueles portadores de sítios de DNAr 5S e 18S, como ocorreu no presente estudo, mas já foram relatados casos de co-localização destes genes (MANCHADO et al. 2006; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010), como ocorre em crustáceos (PELLICCIA et al., 2001). Além disso, o DNAsn U2 também foi observado em cromossomos sexuais de *Gymnotus pantanal*, no cromossomo X1 (UTSUNOMIA et al., 2014).

Ou seja, estudos com DNAsn U2 demonstram resultados variados, como a presença de sítios alocados em cromossomos sexuais e cromossomos supranumerários, além da identificação destes sítios co-localizados nos cromossomos com outras sequências e famílias de DNA repetitivo (MERLO et al., 2012; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; SUPIWONG et al. 2013; UTSUNOMIA et al., 2014).

O número de sítios para DNAsn U2 é reduzido na maioria das espécies de peixes (UTSUNOMIA et al., 2014; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010). O mapeamento de DNAsn U2 em *Astyanax* revelou uma forte conservação do número destes sítios por genoma (PISCOR; CENTOFANTE; PARISE-MALTEMPI, 2016), com distintas localizações no genoma de diferentes espécies (SILVA, et al., 2015). No entanto, para *A. bifasciatus* ocorreram diferenças intraespecíficas com relação ao número de localização deste gene. Piscor, Centofante e Parise-Maltempi (2016) observaram a presença de dois pares cromossômicos distintos portadores de sítios de DNAsn U2, nas espécies *A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. eigenmanniorum*. De forma complementar Silva et al. (2015) também verificaram a presença de dois pares de cromossomos portadores de DNAsn U2 em *A. paranae*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni* e *A. altiparanae*. Em contrapartida, os mesmos autores observaram a presença de apenas um par de cromossomos contendo DNAsn U2 em *A. jordani*, o que também ocorreu para *A. mexicanus* (SILVA et al. 2015) e foi verificado para *A. bifasciatus* do médio rio Iguazu. Com relação a localização deste DNAsn U2 nos cromossomos, a maioria das espécies de *Astyanax* exhibe marcações centroméricas ou pericentroméricas (PISCOR; CENTOFANTE;

PARISE-MALTEMPI, 2016), como ocorreu em *A. bifasciatus* do alto Iguaçu, mas sítios intersticiais também já foram relatados (PISCOR; CENTOFANTE; PARISE-MALTEMPI, 2016), corroborando ao verificado em *A. bifasciatus* do médio e baixo Iguaçu.

Ao considerar as análises morfométricas e citogenéticas em conjunto, é possível obter um cenário da diferenciação total de *A. bifasciatus* ao longo da bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Onde a diferença significativa na morfologia entre as populações, está em concordância com as modificações citogenéticas encontradas, em relação aos distintos números diploides, fórmula cariotípica e número fundamental, associados às divergências no tamanho de sítios e posição ocupada pela heterocromatina constitutiva, Ag-RONs, DNArS 5S e 18S e DNAsn U2. Ou seja, as diferenças morfológicas relacionadas à adaptação dos indivíduos a cada região do rio Iguaçu, são refletidas nos caracteres cariotípicos distintos. Outro dado importante, é o fato de que as variações morfológicas são significativas entre as três populações de *A. bifasciatus*, porém, ao observar a figura 06 se pode inferir que as populações do alto e médio Iguaçu são orientadas no mesmo sentido do eixo X das variáveis canônicas, o qual explica a maior variação nos dados, sendo, portanto, mais semelhantes. O que é corroborado pela diferença no número diploide exibida pela população do baixo Iguaçu.

Neste sentido, a diversidade morfológica presente associada com a variabilidade cariotípica, sugerem uma dinâmica na evolução cariotípica compatível com os grupos de peixes dulcícolas (CIPRIANO, et al., 2008). Com populações sujeitas a intensas fragmentações populacionais, aliadas a diversificações morfológicas adequadas a exploração de habitats peculiares (POUILLY, et al., 2003; FREITAS; PETRERE; BARRELLA, 2005; READY; FERREIRA; KULLANDER, 2006; CONCEIRO-PÉRES, et al., 2007). Pois os movimentos tectônicos ocorridos na bacia hidrográfica do rio Iguaçu foram capazes de modificar profundamente as pressões seletivas que os indivíduos das diferentes regiões estavam sujeitos, propiciando a modificação peculiar de habitat e de nicho em cada região, com consequente adaptação diferencial dos organismos ao longo da bacia do rio Iguaçu, o que por sua vez, é refletido em seu fenótipo e genótipo. Associado a isto, a compartimentalização geológica da bacia favoreceu a diminuição do fluxo gênico entre os indivíduos das diferentes regiões, contribuindo para a fixação de caracteres distintos nas populações do alto, médio e baixo Iguaçu, resultando assim, na significativa variação morfológica e citogenética observada entre as populações de *A. bifasciatus* da bacia do rio Iguaçu.

## Referências

As referências deste capítulo se encontram no final da dissertação no item “REFERÊNCIAS”.

### 4.2 INFERINDO A DIVERSIFICAÇÃO CARIOTÍPICA POR FUSÃO CÊNTRICA EM *Astyanax bifasciatus* DO BAIXO RIO IGUAÇU

#### RESUMO

O número diploide é um caráter amplamente variável entre os peixes e possui ligação com o padrão evolutivo das espécies e as modificações ocorridas na história biogeográfica das regiões. Partindo deste pressuposto, o objetivo do presente trabalho foi compreender a diversificação cariotípica por fusão cêntrica em *A. bifasciatus* do baixo rio Iguaçu. Para isto, foi realizada uma análise citogenética baseada na hibridização *in situ* fluorescente com sonda de DNA telomérico, em uma população de *A. bifasciatus* pertencente a região do baixo rio Iguaçu. O número diploide de cromossomos encontrado foi de 48, com fórmula cariotípica  $FC=6m+22sm+6st+14a$  e número fundamental de 82. Sítios de DNA telomérico foram evidenciados na região terminal da maioria dos cromossomos e centromérica de apenas um par cromossômico. Os resultados obtidos indicam a ocorrência de fusão cêntrica de cromossomos, que seria o evento responsável pela diminuição no número diploide da população do baixo rio Iguaçu, quando comparada às demais populações da espécie. Tal diferenciação cariotípica ocorrida provavelmente se relaciona com a história geomorfológica da bacia do rio Iguaçu.

Palavras-Chave: Número Diploide, DNA Telomérico, Diferenciação Populacional.

#### ABSTRACT

The number diploid is a character very variable between the fishes and has connection with the evolutionary pattern of the species and how the changes that occurred in the biogeographic history of the regions. Based on this assumption the objective of the present work was to understand the karyotype diversification by centric fusion in *A. bifasciatus* from the lower Iguaçu river region. For this, a cytogenetic analysis was performed based on fluorescence *in situ* hybridization with telomeric DNA probe in a population of *A. bifasciatus* that belonged to the of the lower Iguaçu river region. The diploid number of chromosomes found was 48, with karyotype formula  $FC=6m+22sm+6st+14a$  and a fundamental number of 82. Telomeric DNA sites were evidenced in the terminal region of the most of chromosomes and centromeric of just only one chromosomal pair. What is indicative of centric fusion of chromosomes, that was being the event responsible for the decrease in the diploid number of the lower population of the Iguaçu river, when compared to the other populations of the species. Like karyotypic differentiation that happened, probably relates to the geomorphological history of the Iguaçu river basin.

Keywords: Diploid Number, Telomeric DNA, Population Differentiation.

## Introdução

A região Neotropical possui uma das ictiofaunas dulcícolas mais diversa do mundo (VARI; MALABARBA, 1998). A configuração de seus sistemas hidrográficos de grande porte possibilita o isolamento de algumas populações ou espécies de peixes, através de barreiras físicas, químicas ou bióticas, permitindo que evoluam dentro do próprio sistema (LOWE; MCCONNEL, 1969). Neste sentido, estudos cariotípicos podem auxiliar na compreensão da diversidade genética, no entendimento da influência que a interconexão de drenagens exerce sobre a distribuição das espécies de peixes, no conhecimento da estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos e no mapeamento de genes específicos, além de que, o número cromossômico é associado a possíveis divergências ocorridas durante a história biogeográfica da região onde a espécie habita (PAMPONET et al., 2008; PERES et al., 2012; NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

O número diploide entre os peixes é amplamente variável, Oliveira et al. (2007) observaram em peixes Neotropicais números diploides desde 12 cromossomos, como ocorre na família Rivulidae, até 134 cromossomos, como é verificado na família Callichthyidae. Para a família Characidae o número de cromossomos varia de 48 a 54 na maioria das espécies (CESTARI, 2006). No gênero *Astyanax*, o número diploide vai de 36 cromossomos como em *A. shubarti* até 50 cromossomos, número este considerado modal para o gênero (PACHECO et al., 2010). Mesmo dentro das espécies são verificados casos de variação no número diploide, como por exemplo no complexo *A. scabripinnis*, onde ocorrem números diploides que variam de 46 a 50 cromossomos (MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr.; BERTOLO, 1978; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr., 1996; VICARI et al., 2008b entre outros) e no complexo *A. fasciatus* com número de cromossomos variando de 45 a 50 (JIM. TOLEDO, 1975; MORELLI, 1983; PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006; ARTONI et al., 2006; MEDRADO et al., 2008).

Desta forma, sabendo que diferentes números diploides ocorrem amplamente em *Astyanax*, inclusive dentro da mesma espécie, e que tais eventos representam uma notável diferenciação no padrão evolutivo das mesmas (CUVIER, 1819), o objetivo do presente trabalho foi compreender a diversificação cariotípica por fusão cêntrica em *A. bifasciatus* do baixo rio Iguaçu.

## Material e Métodos

Os espécimes utilizados para o presente trabalho pertenciam a bacia hidrográfica do rio Iguazu e foram coletados na região do baixo rio Iguazu, no município de Realeza (S 25°45'52.5 W 53°34'59.9) (6 machos e 11 fêmeas) (Figura 10). Foram seguidas boas práticas de experimentação animal, autorizadas por Comitê de Ética. Os espécimes estão em processo de identificação taxonômica morfológica e depósito na coleção ictiológica do Museu de História Natural do Capão da Imbuia, em Curitiba, Paraná.

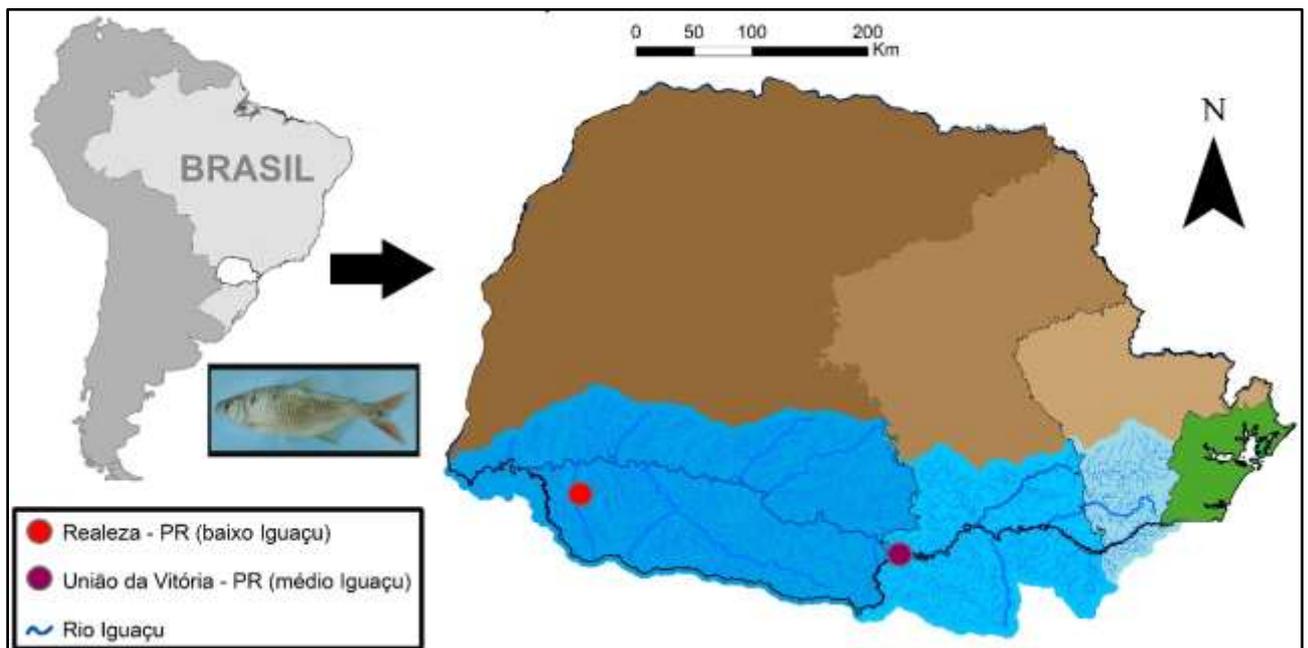


Figura 10: Mapa do ponto de coleta na região do baixo Iguazu (vermelho), com destaque à esquerda para o espécime de *A. bifasciatus* coletado na região.

As metáfases mitóticas foram obtidas utilizando o protocolo de Bertollo; Moreira-Filho e Galetti Jr (1986). A hidridização *in situ* fluorescente (FISH) ocorreu de acordo com o protocolo proposto por Pinkel; Straume e Gray (1986), com a estringência de 77% (2,5 ng/μL sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, à 37 °C por 16 horas). Para a detecção da sonda foi utilizado o anticorpo anti-digoxigenina conjugada com rodamina (*Roche Applied Science*). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem *Vectashield*. A sonda de DNA telomérico foi obtida por meio de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos *primers* degenerados (TTAGGG)<sub>4</sub> e (CCCTAA)<sub>4</sub> (IJDO et al., 1991) e posterior marcação da sonda pelo Kit *Nick Translation* com digoxigenina-11-dUTP, segundo as orientações do fabricante (*Roche Applied Science*). A reação de amplificação da sonda foi a seguinte: 2,5 μl de tampão 10x, 1,5 μl de MgCl<sub>2</sub> (50Mm), 1 μl de cada *primer* à 10ng/ μl, , 2,5 de dNTPs (2nM), 0,2 U de Taq DNA Polimerase e água

ultrapura até completar o volume de 25 µl. Com a programação do ciclador térmico: dez ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, seguido de anelamento à 55°C por 30 s e extensão à 72°C por 1 min. Posteriormente 30 ciclos desnaturação à 94°C por 1 min, seguido de anelamento à 60°C por 30 s e extensão à 72°C por 1,30 min seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de 4°C. A integridade da sonda então, foi verificada em gel de agarose a 1%.

As lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels. Os cariótipos foram montados com o auxílio do software Adobe Photoshop CC e os cromossomos foram classificados segundo Levan; Fredga, e Sandberg (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a).

## **Resultados**

A espécie *A. bifasciatus* do presente estudo, pertencente a região do baixo rio Iguaçu, apresentou um número diploide de 48 cromossomos. Fórmula cariotípica composta por 6 cromossomos metacêntricos, 22 submetacêntricos, 6 subtelocêntricos e 14 acrocêntricos, com número fundamental de 82. Não foi constatada a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. A hibridização *in situ* fluorescente realizada com a sonda de DNA telomérico revelou sítios na região terminal da maioria dos cromossomos, além de um ITS (*Interstitial telomeric sequences*) no par cromossômico 9 (Figura 11).

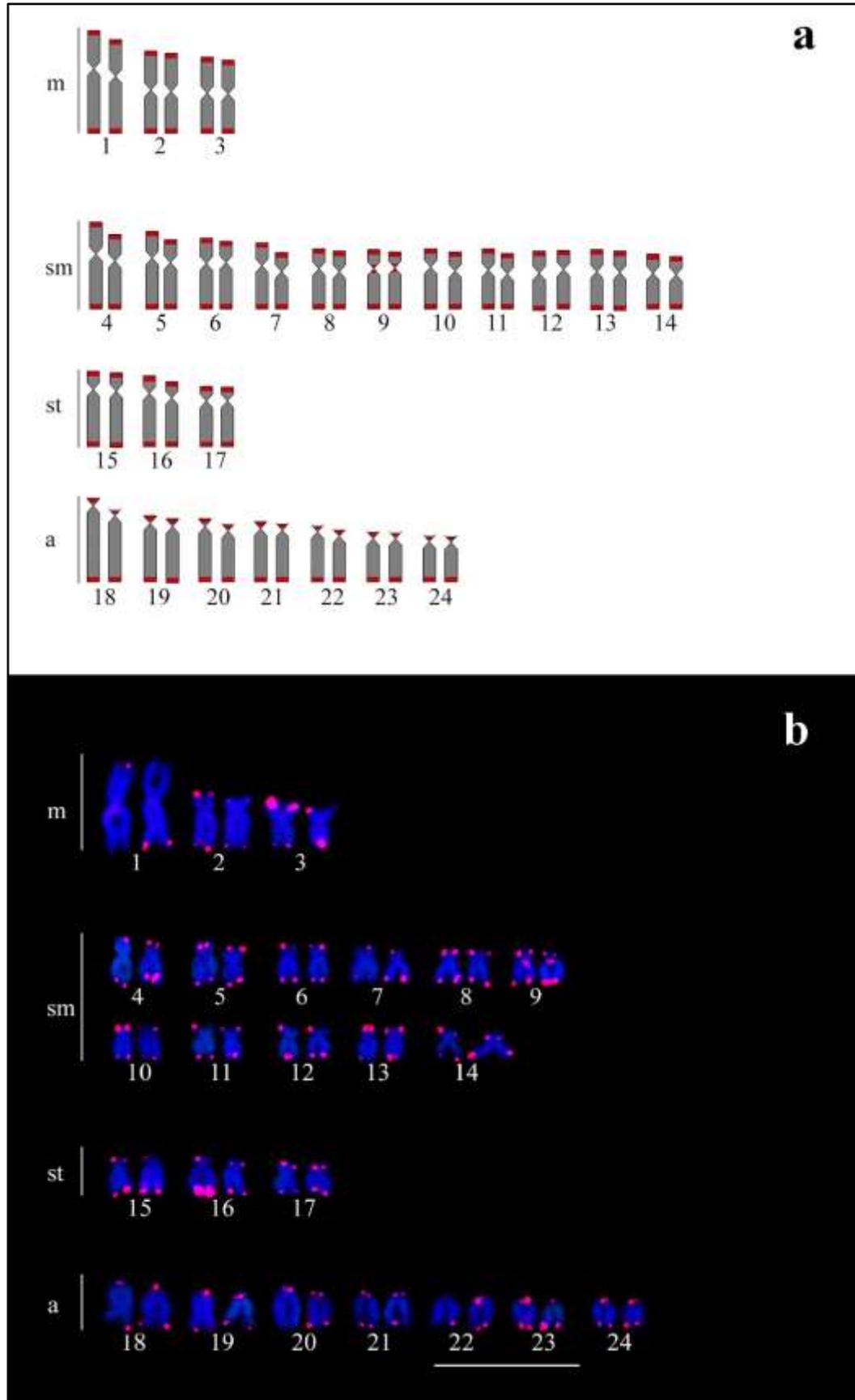


Figura 11: Resultados da análise citogenética em *A. bifasciatus* do baixo rio Iguaçu. Em (a) ideograma mostrando a localização das marcações teloméricas intersticiais no par cromossômico 9. Em (b) o cariótipo com as marcações de DNA telomérico. Barra=10μm. Legenda: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico, (a) acrocêntrico.

## Discussão

O número diploide de 48 cromossomos encontrado para *A. bifasciatus* do baixo Iguaçu no presente estudo é inédito para a espécie, que até o presente momento havia apresentado 50 cromossomos como número diploide para todas as populações analisadas na bacia hidrográfica do rio Iguaçu, (DIAS; JÚLIO Jr., 1996; ROBAINA; CESTARI, 1998; BARROS; MARGARIDO, 1999; FAZOLI et al., 2003; RIBEIRO, 2004; BARTH et al. em preparação) da qual é endêmica (BAUMGARTNER et al., 2012). Com a diferenciação do número diploide, ocorreu a consequente modificação da fórmula cariotípica e do número fundamental de *A. bifasciatus* deste estudo em comparação com outras populações da espécie (DIAS; JÚLIO JR., 1996; ROBAINA; CESTARI, 1998; BARROS; MARGARIDO, 1999; FAZOLI et al., 2003; RIBEIRO, 2004; BARTH et al. em preparação). Ainda, a população de *A. bifasciatus* do presente estudo apresentou o primeiro par cromossômico grande característico de Characidae (SCHELL, 1973), cuja característica é tida como simplesiomórfica no gênero *Astyanax* (SCHELL, 1973). Desta forma, como a maioria das espécies de *Astyanax* exibe número diploide de 50 cromossomos (PACHECO et al., 2010), assim como as demais populações de *A. bifasciatus* (DIAS; JÚLIO JR., 1996; ROBAINA; CESTARI, 1998; BARROS; MARGARIDO, 1999; FAZOLI et al., 2003; RIBEIRO, 2004; BARTH et al. em preparação), provavelmente a condição de 48 cromossomos observada, é derivada da condição de 50 cromossomos.

Partindo deste pressuposto, os eventos de fusão cêntrica, podem diminuir o número diplóide das espécies (VICARI et al., 2008a), sendo este o provável fenômeno que ocorreu em *A. bifasciatus*. Tal afirmação é sustentada pela observação de um ITS no par cromossômico 9. Uma vez que tais sequências originalmente se localizam na região terminal dos cromossomos e, portanto, sua localização em sítios intersticiais é associada a eventos de rearranjos cromossômicos que envolvam os telômeros, como fusões, inversões ou translocações, ocorridas a partir de uma condição ancestral, durante a evolução das espécies (OCALEWICZ, 2013).

Em *Astyanax* já foi relatada a presença de diferentes números diploides em populações distintas pertencentes à mesma bacia hidrográfica, a exemplo do que ocorreu com *A. bifasciatus*. Justi (1993) ao estudar duas populações de *A. fasciatus* pertencentes a diferentes regiões da bacia do rio São Francisco, verificaram um cariótipo composto por 48 cromossomos e outro por 46 cromossomos. Padrão também verificado por Heras (1998), para a mesma espécie e bacia hidrográfica. Daniel-Silva (1996) também observou diferentes números diploides em populações de *A. fasciatus* de diferentes regiões do rio Mogi-Guaçu, com

indivíduos apresentando 45, 46 e 47 cromossomos. Assim como *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* também exibe diferentes números diploides, Mizoguchi e Martins-Santos (1998) por exemplo, ao analisar duas populações pertencentes a bacia hidrográfica do rio Ivaí, constataram a presença de um cariótipo composto por 48 cromossomos para uma das populações e outro formado por 50 cromossomos. Adicionalmente, muitos outros estudos vêm relatando a presença de diferentes números diploides para estas espécies (JIM. TOLEDO, 1975; MORELLI, 1983; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr., 1996; PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006; ARTONI et al., 2006; VICARI et al., 2008b, MEDRADO et al., 2008, entre outros).

Além destas diferenças relacionadas ao número diploide, *A. bifasciatus* exibe diferenças interpopulacionais com relação a localização das regiões organizadoras de nucléolo, o padrão de banda C, e os sítios de DNAr 5S, 18S e DNAsn U2 como evidenciado por Barth et al. (em preparação). Diferenciação esta, que fica ainda mais pronunciada ao considerar um estudo realizado por Fazoli et al. (2003) no baixo rio Iguaçu, onde foi verificada a presença de cromossomos supranumerários em *A. bifasciatus*, fato que reforça ainda mais a ideia de que existe uma variabilidade cariotípica pronunciada para *A. bifasciatus* do baixo Iguaçu.

Tal variabilidade cariotípica presente em *A. bifasciatus* pode estar relacionada a biogeografia da bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Uma vez que a formação da serra do mar, o isolamento da bacia do rio Iguaçu da do rio Paraná, e a compartimentalização geológica da bacia do rio Iguaçu, provocada pelo soerguimento dos três planaltos paranaenses (HAUCK, 2009) ocorridos há cerca de 22 milhões de anos (MINEROPAR, 2001), modificaram as características da região, o que pôde restringir a distribuição das espécies e populações (BAUMGARTNER et al., 2012).

Em complemento, Garutti (1995) assegura que os peixes do gênero *Astyanax* exibem distribuição estruturada, o que sugere um grande nível de endemismo, uma vez que dentro de uma mesma bacia hidrográfica são encontradas muitas formas com distribuição geográfica parcialmente restrita, como ocorre na bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Portanto, se supõe que *Astyanax* não forma um grupo uniforme, ocorrendo variações de população para população, em parte pelo grupo habitar uma grande variedade de microambientes (GARUTTI; BRITSKI, 2000). O que pode explicar a variabilidade cariotípica presente em *A. bifasciatus*.

## **Referências**

As referências deste capítulo se encontram no final da dissertação no item **“REFERÊNCIAS”**.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo houve a integração de técnicas de análise morfológica e citogenética, a fim de caracterizar a espécie *A. bifasciatus* e fazer inferências sobre a influência que a geomorfologia da bacia hidrográfica do rio Iguaçu exerceu sobre a diversificação e variabilidade da espécie.

A análise morfológica demonstrou pequena sobreposição de caracteres entre as populações de *A. bifasciatus* do alto, médio e baixo Iguaçu. No entanto, estas populações foram significativamente diferentes quanto à totalidade de suas variações morfológicas, tendo a localização da inserção das nadadeiras como caracteres que tiveram maiores alterações.

A citogenética revelou diferente número diploide para a população do baixo rio Iguaçu em comparação com as demais, o que conseqüentemente levou a uma variação no número fundamental e fórmula cariotípica desta população. Enquanto que as populações do médio e alto rio Iguaçu tiveram tanto o número diploide quanto a fórmula cariotípica e número fundamental iguais.

A localização das Regiões organizadoras de nucléolo se mostrou simples para as populações do alto e baixo Iguaçu e múltipla para a população do médio Iguaçu. A técnica de bandamento C evidenciou diferenças interpopulacionais na localização dos sítios de heterocromatina, os quais se localizaram em sua maioria na região centromérica e pericentromérica dos cromossomos, com marcações variáveis nas regiões teloméricas, as quais também estiveram coincidência com regiões de DNAr 5S.

Os sítios de DNAr 5S e 18S e DNAsn U2 foram variáveis entre as populações, tanto no número, tamanho e localização das marcações. Sendo a localização do DNAr 18S, em sua maioria, coincidente com as regiões organizadoras de nucléolo.

A localização de sequências de DNA telomérico na população do baixo rio Iguaçu, revelou marcações intersticiais em um par cromossômico, fornecendo evidências que podem explicar a diminuição no número diploide desta população.

A integração dos resultados morfológicos e citogenéticos indica uma grande diferenciação entre as populações de *A. bifasciatus*, fato que pode ser devido aos eventos geomorfológicos que ocorreram na bacia do rio Iguaçu e modificaram profundamente a ecologia entre as diferentes regiões.

## REFERÊNCIAS

- ABILHOA, V.; BRAGA, R. R.; BORNATOWSKI, H.; VITULE, J. R. S. Fish of the Atlantic Rain Forest streams: ecological patterns and conservation. In: GRILLO, O.; VENORA, G. Changing Diversity in Changing Environmen. **Rijeka: Intech**, p. 392, 2011.
- ABILHOA, V.; DUBOC, L. F. A new species of the freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v.1587, p.43-52, 2007.
- ABILHOA, V.; DUBOC, L. F. Peixes. In: MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2004. p. 581-678.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. 1. ed. Berkely: University of California Press, 2011. p. 406.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, K.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 4. ed. Artmed, 2017, 839 p.
- ALBRECHT, G. H. Multivariate analysis and the study of form, with special reference to canonical variate analysis. **American Zoologist**, v.20, p.679-693, 1980.
- 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). **Cytogenetic and Genome Research**, v.97, p.229-233, 2002.
- ALVES, M. J.; COELHO, M. M.; COLLARES-PEREIRA, M. J: Evolution in action through hybridization and polyploidy in a Iberian freshwater fish: a genetic review. **Genetica**, v.111, p.375-385, 2001.
- ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. 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. 1997–2002, 2006.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. **Biological and Health Science**, v.6, p.43-60, 2000.
- BAIRD, S. F.; GIRARD, C. F. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, Philadelphia, v.7, p.26-27, 1854.
- BARBOSA, P. **Elementos Genômicos Repetitivos no Complexo *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae)**. 2013, 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva), Departamento de Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, Ponta Grossa, Paraná, 2013.

BARLOW, G. W: Causes and significance of morphological variation in fishes. **Systematic Zoology**, v. 10, p.105-117, 1961.

BARROS, N. M. T.; MARGARIDO, V. P. Estudos cariotípicos em *Astyanax* sp. B (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae) coletado no rio Vorá - bacia do Iguaçu. In: **Anais do 45º Congresso Nacional de Genética**, Gramado, Brasil, 1999.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. **Characiformes**. Maringá: Eduem, 2012, p. 57-100.

BEACHAM, T. D. A genetic analysis of meristic and morphometric variation in chum salmon (*Onchorhynchus keta*) at three different temperatures. **Canadian Journal of Zoology**, v.68, p.225–229, 1990.

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

BOND, C. E. **Biology of Fishes**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1979, 514p.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**. New York: Cambridge University Press, 1991, 433 p.

BOUSSOU, C. K.; KONAN, F. K.; EDIA, E. O.; OUATTARA, M.; YVES, K. B.; OUATTARA, A.; GOURÈNE, G. Morphometric analysis of populations of *Chromidotilapia guntheri* (Sauvage, 1882) (Cichlidae, perciformes) in four coastal rivers of Côte d'Ivoire (West Africa). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n.3, p.387-400, 2010.

BREDA, L.; OLIVEIRA, E. F.; GOULART, E. Ecomorfologia de locomoção de peixes com enfoque para espécies neotropicais. **Acta Scientiarum**, v.27, n.4, p.371-381, 2005.

BRETT, J. R. Environmental factors and growth. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology**, v.8. New York: Academic Press, 1979. p. 599–675.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3. ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1988, 115p.

BROWN, A. V.; MATTHEWS, W. J. Streams Ecosystems of the Central United States. In: CUSHING, C. E., CUMMINS, K. W.; MINSHALL, G. W. **Ecosystems of the World**. River and Stream Ecosystems. Amsterdam: Elsevier, 1995, p. 89-116.

BRUFORD, M. W. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A. R. **Molecular genetic analyses of populations: A Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1992.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abraxis flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. **Plos One**, v.8, n.6, 2013.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudo da Biologia**, v. 34, n.83, p.157-163, 2012.

BUSCH, H.; REDDY, R.; ROTHBLUM, L.; CHOI, Y. C. SnRNAs, SnRNPs, and RNA Processing. **Annual Review of Biochemist**, v.51, p.617–654, 1982.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. **Organização cromossômica de elementos repetitivos de DNA em representantes da subfamília Scarabaeninae (Coleoptera: Scarabaeidae)**. 2011, 202f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

CABRAL-DE-MELLO; D. C.; VALENTE; G. T.; NAKAJIMA, R. T.; MARTINS, C. Genomic organizations and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research**, v. 20, p. 279-292, 2012.

CAMPELLO, F. D.; BEMBENUTI, M. A. Diferenciação morfométrica e osteológica entre *Ramnogaster arcuata* (Jenyns) e *Platanichthys platana* (Regan) (Teleostei, Clupeidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, n.19, v.3, p.757-766, 2002.

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

CARNIATTO, N.; THOMAZ, S. M.; CUNHA, E. R.; FUGI, R.; OTA, R. R. Effects of an invasive alien Poaceae on aquatic macrophytes and fish communities in a Neotropical reservoir. **Biotropica**, v.45, p.747–754, 2013.

CASTRO, J. P.; MOURA, M. O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.12, n.2, p.429-438, 2014.

CAVALCANTI, M. J.; LOPES, P. R. D. Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de *Serranidae* (Teleostei: Perciformes). **Acta Biologia Leopoldensia**, v.15, n.1, p.53-64, 1993.

CAVALCANTI, M. J.; LOPES, P. R. D. Morfometria comparada de *Ctenosciaena gracilicirrhus*, *Paralonchurus brasiliensis* e *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) pela análise multivariada de redes de treliças. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.7, n.4, p.627-635, 1991.

CAVALLINI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C. Indução de Metáfases em *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). In: Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada de peixes neotropicais, 1988, Maringá. **Resumos**. Maringá: Núcleo de Pesquisa em Limnologia Ictiologia e Aquicultura-NUPÉLIA, 1988. 23p.

CESTARI, M. M. Estudos citogenéticos preliminares de peixes pertencentes a bacia do rio Iguaçu. In: **Anais do Encontro Paranaense de Genética**. Curitiba, Brasil, 2006.

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

CIPRIANO, R. R.; FENOCCHIO, A. S.; ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F.; NOLETO, R. B.; KANTEK, D. L. Z.; CESTARI, M. Chromosomal Studies of Five Species of the Marine Fishes From the Paranaguá Bay and the Karyotypic Diversity in the Marine Teleostei of the Brazilian Coast. **Brazil archive biology technology**, v. 51, n.2, p.303-314, 2008.

CLAYTOR, R. R.; MACGRIMMON, H. R.; GOTS, B. L. Continental and ecological variance components of European and North American Atlantic salmon (*Salmo salar*) phenotypes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.44, p.203–229, 1991.

COELHO, M. M.; BRITO, R. M.; PACHECO, T. R.; PIRES, A. M. Genetic variation and divergence of *Leuciscus pyrenaicus* and *L. carolitertii* (Pisces, Cyprinidae). **Journal of Fish Biology**, v.47, p.243-258, 1995.

COLLARES-PEREIRA, M. J: **Estudo sistemático e citogenético dos pequenos ciprinídeos ibéricos pertencentes aos géneros *Chondrostoma* Agassiz, 1835, *Rutilus* Rafinesque, 1820 e *Anaocypris* Collares-Pereira, 1983**. Tese (Doutorado)-Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa; Lisboa, 1983.

CONCHEIRO-PÉREZ, G. A. C.; LÍBAN, O.; ORTÍ, G.; BERMINGHAM, E.; DOADRIO, I.; ZARDOYA, R. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.43, p.91-110, 2007.

CUVIER, G. Sur les poissons du sous-genre *Hydrocyon*, sur deux nouvelles espèces de *Chalceus*, sur trois nouvelles espèces du *Serrasalmes*, et sur l'*Argentina glossodontade* Forskahl, qui est l'*Albula gonorhynchus* de Bloch. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. **Zoologie**, v.5, p.351-379, 1819.

DAHLBERG, J. E.; LUND, E. **The Genes and Transcription of the Major Small Nuclear RNAs**. Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles, Birnstiel PDML, Springer, Berlin Heidelberg, 1988, p. 38–70.

DANIEL-SILVA, M. F. Z. Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). São Paulo-SP, 1996. (Dissertação de Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1996.

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

DIAS, M. B.; JÚLIO Jr., H. F. Dados preliminares sobre o cariótipo e NORs de duas espécies de Tetragonopterinae: *Markiana nigripinnis* e *Astyanax* sp. B. In - **Anais do VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**, São Carlos, Brasil, 1996.

DOMINGUES, M. S. **Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do alto rio Tibagi e alto rio Iguazu**. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

DRYDEN, I. L.; MARDIA, K. V. **Statistical shape analysis**. New York: Wiley, 1998.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, v.43, p.209-310, 1917.

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

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

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of Fishes**. Institute for Biodiversity Science and Sustainability. Disponível em <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 15/07/2016.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of Fishes**. Institute for Biodiversity Science and Sustainability. Disponível em <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 15/10/2017.

ESTEVES, K. E.; GALETTI Jr., P. M. Food partitioning among characids of a small brazilian floodplain lake from the Paraná river basin. **Environmental Biology of Fishes**, v.42, p.375-389, 1995.

FAN, H.; CHU, J. Y. A brief review of short tandem repeat mutation. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v.5, p.7-14, 2007.

FARAH, S. B. Decifrando o genoma humano. **DNA Segredos e Mistérios**, 2007.

FAZOLI, L. C.; SILVA, V. A. B.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO Jr., H. F. Chromosome characterization of *Astyanax* sp B (Characidae, Tetragonopterinae), an endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brasil. **Cytologia**, v.68, p.389-394, 2003.

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

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. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski,2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraá river basin. **Revista Brasileira de Biologia Molecular**, v.29, p.464-468, 2006.

FERREIRA, I. A., BERTOLLO, L. A. C.; MARTINS, C. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenetic and Genome Research**, v.118, p.78-83, 2007.

FERREIRA-NETO, M. 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.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v.110, p.55-62, 2001.

FRANSSSEN, N. R., HARRIS, J., CLARK, S. R., SCHAEFER, J. F.; STEWART, L. K. Shared and unique morphological responses of stream fishes to anthropogenic habitat alteration. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.280, n.1752, p.2012-2015, 2013.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley e Sons, 2005.

FREITAS, C. E. C.; PETRERE, M.; BARRELLA, W. Natural and artificially-induced habitat complexity and freshwater fish species composition. **Fisheries Management and Ecology**, v.12, p.63-67, 2005.

FROESE, R.; PAULY, D. Fish base. Disponível em: <www. Fish base. Org>. Acessado em: 07/2016. In: SANTOS, N. M. **Mapeamento gênico de sítios repetitivos de DNAr 5S e 18s em *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

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

GALETTI Jr., P. M.; MARTINS, C. Contribuição da Hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes, p.61-88, 2004. In: GUERRA, M. **FISH-Conceitos e aplicações na citogenética**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004, 176p.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.63, p.373-383, 1969.

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

GARCIA, C.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.364-385, 2010.

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

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. São José do Rio Preto-SP, 1995, 289f. (Tese de Livre-docência), Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto, SP, 1995.

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

GATZ Jr., A. J. Community organization in fishes as indicated by morphological features. **Ecology**, v.60, p.711-718, 1979a.

GATZ Jr., A. J. Ecological morphology of freshwater stream fishes. **Tulane Studies in Zoology and Botany**, v.21, p.91-124, 1979b.

GATZ Jr. A. J. Morphologically inferred niche differentiation in stream fishes. **The American Midland Naturalist Journal**, Notre Dame, v.106, n.1. p. 10-21, 1998.

GAUSE, G. F. **The struggle for existence**. Reimpressão de 1971, New York, Dover Publications, 1934.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1977, 672 p.

GONÇALVES, G. L. **Análise ambiental das áreas ribeirinhas do Rio Iguaçu: municípios de São Mateus do Sul a União da Vitória – PR e Canoinhas a Porto Vitória – SC**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GOSLINE, W. A. **Functional morphology and classification of teleostean fishes**. Honolulu, University Press of Hawaii, 1971, 208p.

GOULD, S. J.; JOHNSTON, R. F. Geographic variation. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v.3, p.457–498, 1972.

GRANT, P. Convergent and divergent character displacement. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.4, p.39 – 68, 1972.

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, p.339-456, 1966.

GROMICHO, M.; COLLARES-PEREIRA, M. J. Polymorphism of major ribosomal gene chromosomal sites (NOR-phenotypes) in the hybrid genetic fish *Squalius alburnoides* complex (Cyprinidae) assessed through crossing experiments. **Genetica.**, v.122, p.291–302, 2004.

GUERRA, M. **FISH**. Conceitos e aplicações na Citogenética. SBG, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2004, 184p.

GÜRKAN, S. The Biometric Analysis of pipefish species from Çamaltı Lagoon (İzmir Bay, Aegean Sea). **Journal of fisheries e Aquatic science**, v.25, n.1, p.53-56, 2008.

HADJIOLOV, A. A. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. **Cell Biology Monographs**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1985.

HAHN, N. S.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; BINI, L. M. Estrutura trófica da ictiofauna do reservatório de Itaipu (Paraná-Brasil) nos primeiros anos de formação. **Interciência**, v.23, n.5, p.299-305, 1998.

HASHIMOTO, D. T.; FERGUSON-SMITH, M. A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S RNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, p.64-71, 2011.

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

HAUCK, P. **Origens e evolução da Serra do Mar**. Disponível em: <<http://altamontanha.com/colunas.asp?newsID=1448>>. Publicado em: 2 de jun. 2009. Acesso em: 07 de mar. 2012.

HERAS, M. P. **Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de rios do Brasil**. São Carlos-SP, 1998. (Dissertação de mestrado), Universidade Federal de São Carlos, 1998.

HOFFMANN, A. A.; RIESEBERG, L. H. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.39, p.21-42, 2008.

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.

HUBBS, C. L. Variations in the number of vertebrae and other meristic characters of fishes correlated with the temperature of water during development. **The American Naturalist**, v.56, p.360-372, 1922.

HYNES, H. B. N. **The ecology of running waters**. University of Toronto Press, Toronto, 1970, 555p.

IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4780, 1991.

IMRE I.; MCLAUGHLIN R. L.; NOAKES D. L. G. Phenotypic plasticity in brook char: changes in caudal fin induced by water flow. **Journal of Fish Biology**, v.61, p.1171–1181, 2002.

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

JIM, S. M.; TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetraodonopterae). **Ciência e Cultura**, v.27, p.733-738, 1975.

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

JOHNSON, B. L.; RICHARDSON, W. B.; NAIMO, T. J. Past, present and future concepts in the large River ecology. **BioScience**, v. 45, n. 3, p. 134-41, 1995.

JOLLIFFE, I. T. **Principal Component Analysis**. New York: Springer Verlag, 2002.

JONSSON, B.; JONSSON, N. Polymorphism and speciation in Arctic char. **Journal of Fish Biology**, v.58, p.605–638, 2001.

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

JUNK, W. J.; BAULEY, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: DODGE, D. P. **Proceedings of International Larger River Symposium(LARS)**. Ottawa, Canada, 1989. p. 110-127.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, California, v.8, p.241-259, 2007.

JUSTI, A. J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (CUVIER, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas**. São Carlos-SP, 1993. (Dissertação de mestrado), Universidade Federal de São Carlos, 1993.

JUSTUS, J. O.; Hidrografia. **Geografia do Brasil: região Sul**. v.2. Rio de Janeiro: IBGE, 1990. p. 189-218.

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

KANTEK, D. L. Z.; NOLETO, R. B.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M Cytotaxonomy, heterochromatin polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.67-74, 2007.

KASAHARA, S. **Introdução a Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. São Paulo: SBG, 2009.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic reinfrest. **Nucleus**, v.53, n.1-2, p.44-51, 2010.

KEENLYNE, K. D.; HENRY, C. J.; TEWS, A.; CLANCEY, P. Morphometric comparisons of upper Missouri River sturgeons. **Transactions American Fishery Society**, v.123, p.779–785, 1994.

KENDALL, D. G. A Survey of the Statistical Theory of Shape. **Statistical Science**, v.4, n.2, p.87-120, 1989.

KLINGENBERG, C., DUTTKE, S., WHELAN, S., KIM, M. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. **Journal of Evolutionary Biology**, v.25, p.115–129, 2012.

KLINGENBERG, C. P.; MONTEIRO, L. R. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. **Systematic Biology**, v.54, p.678-688, 2005.

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

KNÖPPEL, H. A. Food of Central Amazonian Fishes: Contribution to the nutrient ecology of amazonian rain-forest-streams. **Amazoniana**, v.2, n.3, p.257–352, 1970.

KOLOK, A. S. Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and a brief review of the recent fish literature. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 56, p.700–710, 1999.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.28, p.1647-1649, 2012.

LACADENA, J. R. **Citogenética**. Madri: Complutense, 1996, 928p.

LANGERHANS, R. B. Predictability of phenotypic differentiation across flow regimes in fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v.48, p.750–768, 2008.

LANGERHANS, R. B. Trade-off between steady and unsteady swimming underlies predator-driven divergence in *Gambusia affinis*. **Journal of Evolutionary Biology**, v.22, p.1057–1075, 2009.

LANGERHANS, R. B.; LAYMAN, C. A.; LANGERHANS, A.; DEWITT, T. J. Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.80, p.689-698, 2003.

LAYZER J. B.; CLADY M. D. Phenotypic variation of young-of-year bluegills (*Lepomis macrochirus*) among microhabitats. **Copeia**, v.1987, p.702-707, 1987.

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

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYKAWA, O.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA P. H. F. Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** (CLOFFSCA), Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, 729 p.

LINDGREN, V.; ARES, M.; WEINER, A. M.; FRANCKE, U. Human genes for U2 small nuclear RNA map to a major adenovirus 12 modification site on chromosome 17. **Nature**, v.314, p.115-116, 1985.

LIU, J. L.; GALL, J. G. U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. **PNAS**, v.104, p.11655-11659, 2007.

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. Speciation in tropical freshwater fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.1, 1969.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Edusp, São Paulo, 1999, 366p.

LUCENA, C. A. S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysii, Characiformes)**. 1993, 125f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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

LUNDBERG, J. G.; STAGER, J. C. Microgeographic diversity in the neotropical knife-fish *Eigenmannia macrops* (Gymnotiformes, Sternopygidae). **Environmental Biology of Fishes**, v.13, p.173-181, 1985.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2 ed. Curitiba: Secretaria da Cultura e Esporte do Governo do Estado do Paraná, 1981, 442p.

MAHON, R. Divergent structure in fish taxocenes of North temperate streams. **Canadian Journal of Fish Aquatic Science**, v.21, p.330-350, 1984.

MALABARBA, L. R.; CARVALHO-NETO, P.; BERTACO, V. A.; CARVALHO, T. P.; SANTOS, J. F.; ARTIOLI, L. G.S. **Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí**. Ed. Via Sapiens, Porto Alegre, 2013.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, v.49, p.79-86, 2006.

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

MARGALEF, R. **Ecologia**. Barcelona. Omega Ediciones, 1986, 951p.

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

MARTINS, C.; FERREIRA, I. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI Jr. P. M. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v.127, p.133-141, 2006.

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

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**, v.8, p.353-355, 2000.

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

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

MARZLUFF, W. F.; BROWN, D. T.; LOBO, S.; WANG, S. Isolation and characterization of two mouse U1b small nuclear RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v.11, p.6255-6270, 1983.

MATTAJ, I. W.; TOLLERVEY, D.; SERAPHIN, B. Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. **FASEB Journal**, v.7, p.47-53, 1993.

MATTAJ, I. W.; ZELLER, R. *Xenopus laevis* U2 snRNA genes: tandemly repeated transcription units sharing 5' and 3' flanking homology with other RNA polymerase II transcribed genes. **EMBO Journal**, v.2, p.1883-1891, 1983.

MAXON, R.; COHN, R.; KEDES, L. Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**, v.17, p.239-277, 1983.

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

MCLAUGHLIN, R. L.; GRANT, J. W. A. Morphological and behavioral differences among recently-emerged brook char, *Salvelinus fontinalis*, foraging in slow-vs. fast-running water. **Environmental Biology of Fishes**, v.39, p.289–300, 1994.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.208-214, 2008.

MERLO, M. A.; CROSS, I.; RODRÍGUEZ-RÚA, A.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. First approach to studying the genetics of the meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) using three multigene families. **Aquatic Research**, v.44, p.974–984, 2013.

MERLO, M. A.; PACCHIARINI, T.; PORTELA-BENS, S.; CROSS, I.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. Genetic characterization of *Plectorhynchus mediterraneus* yields important clues about genome organization and evolution of multigene families. **BMC Genetics**, v.13, p.33, 2012.

MILLER, W. L.; MCDONALD, J. F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, The Hague, v.100, p.261-270, 1997.

MINEROPAR. **Atlas comentado da geologia e dos minerais do estado do Paraná**. Curitiba, 2001.

MINEROPAR. Parque Nacional do Iguaçu. Disponível em <<http://www.mineropar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=12>>. Acesso em 09/10/2017.

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

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

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTNS-SANTOS, I. C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá, region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p 55-61, 1998.

MONAGHAM, P. Telomeres and life histories: the long and the short of it. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1206, p.130-142, 2010.

MORAES, D. A. A Morfometria Geométrica e a sua "Revolução na Morfometria": localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim**, ano III, n.3, 2003.

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

MOREIRA-FILHO, O.; GALLETI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. A. B Chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v.106, p.230-234, 2004.

MOREIRA, C. R. **Relações filogenéticas na Ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. 2007, 485f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MORELLI, S. **Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1988. Dissertação (Mestrado em Genética), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, 1988.

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

MULLEN, L. M. Adaptive basis of geographic variation: genetic, phenotypic and environmental differences among beach mouse populations. **Proceeding of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.276, n.1674, p.3809-3818, 2009.

MULTANI, A. S.; OZEN, M.; FURLONG, C. L.; ZHAO, Y. J.; HSU, T. C., PATHAK, S. Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. **Chromosoma**, v.110, p.214-220, 2006.

NANDA, I.; SCHRAMA, D.; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Distribution of telomeric (TTAGGG) sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, v.111, p.215-227, 2002.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v.39, p.121-152, 2005.

NELSON, G.; PLATNICK, N. I. **Systematics and biogeography: cladistics and vicariance**. Columbia University Press, New York, EUA, 1981.

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.

NEVES, F. M.; MONTEIRO, L. R. Body shape and size divergence among populations of *Poecilia vivipara* in coastal lagoons of south-eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.928-941, 2003.

NILSEN, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? **Bioessays**, v.25, p.1147-1149, 2003.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. **Citogenética de Peces**. Universidad do Oriente, Venezuela, 2006, p.212.

OCALEWICZ, K. Telomeres in fishes. **Cytogenetics and Genome Research**, v.141, p.114-125, 2013.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. In: PISANO, E.; COSTAZ-OZOUF, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. Fish cytogenetics. **Science Publishers**, New Hampshire, USA, p. 111-164, 2007.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of Neotropical Freshwater Fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, n.3, p.577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABEL, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTI, G.; VARI, R. P.; CORRÊA-CASTRO R. M. Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v.11, 275p. 2011.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *A. altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, p.207-218, 2004.

O'REILLY, K. M.; HORN, M. H. Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.1117-1135, 2004.

PACHECO, R. B.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; JÚLIO Jr., H. F.; DIAS, A. L.; Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology**. v.8, p.667-671, 2010.

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

PAIZ, L. M. **Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de “lambaris” (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do rio Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, Brasil**. 2013, 76f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. Paraná, 2013.

PAKKASMAA, S.; PIIRONEN, J. Water velocity shapes juvenile salmonids. **Evolutionary Ecology**, v.14, p.721-730, 2001.

PAMPONET, V. C. C.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; MIRANDA, V. S.; JÚNIOR, J. C. S.; OLIVEIRA, C. G.; GAIOTTO, F. A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.4, 2008.

PANSONATO-ALVES, J. C.; VICARI, M. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **Journal of Fish Biology**, v.78, p.183-194, 2011.

PARANÁ, Instituto Ambiental do. **Plano de Conservação para Espécies da Ictiofauna ameaçada no Paraná**. IAP/ Projeto Paraná Biodiversidade, 2009.

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

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

PAZZA, R. **Contribuição Citogenética à Análise da Biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae)**. 2005, 124f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução), Departamento de Genética e Evolução da Universidade de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2005.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). Karyotype analysis Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forma. **Cytogenetic and Genome Reseach**, v.112, p.313-319, 2006.

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

PELLICCIA, F.; BARZOTTI, R.; BUCCIARELLI, E.; ROCCHI, A. 5S ribosomal and U1 small nuclear RNA genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. **Genome**, v.44, p.331-335, 2001.

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

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; BUCKUP, P. A.; BLANCO, D. R.; KANTEK, D. L. Z.; MOREIRAFILHO, O. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). **Reviews in Fish Biology**, Fisheries, v.22, p.519-526, 2012.

PERES, W. A. M.; BUCKUP, P. A.; KANTEK, D. L. Z.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRAFILHO, O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, v.7, p.305-311, 2009.

PERES-NETO, P. R. Métodos em ecomorfologia. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v.6, PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

PERES-NETO, P. R.; VALENTIN, J. L.; FERNANDEZ, F. **Tópicos em tratamentos de dados biológicos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

PIANKA, E. R. **Evolutionary ecology**. New York, Harper Collins Colleg, 1994, 416p.

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

PISCOR, D.; CENTOFANTE, L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Highly Similar Morphologies Between Chromosomes Bearing U2 snRNA Gene Clusters in the Group *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae): An Evolutionary Approach in Species with  $2n+36$ , 46, 48 and 50. **Zebrafish**, 2016

PLAUT, I. Critical swimming speed: its ecological relevance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.131, p.41-50, 2001.

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

POUILLY, M.; LINO, F.; BRETENOUX, J. G.; ROSALES, C. Dietary-morphological relationships in a fish assemblage of the Bolivian Amazonian floodplain. **Journal of Fish Biology**, v.62, n.5, p.1137-1158, 2003.

PRIEDE, I. G. Metabolic scope in fishes. **Fish Energetics**, Springer Netherlands, p.33-64, 1985.

READY, J. S.; FERREIRA, E. J. G.; KULLANDER, S. O. Discus fishes: mitochondrial DNA evidence for a phylogeographic barrier in the Amazonian genus *Symphysodon* (Teleostei: Cichlidae). **Journal of Fish Biology**, v.69, p.200-211, 2006.

REIDY, S. P., KERR, S. R.; NELSON, J. A. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. **The Journal of Experimental Biology**, v.203, p.347-357, 2000.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** (CLOFFSCA), Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, 729 p.

RIBEIRO, A. A. Estudo citogenético em *Astyanax* sp. B da fazenda Canguiri (UFPR). **Unpublished monograph**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2004.

RICCOMINI, C.; ASSUMPÇÃO, M. Quaternary tectonics in Brazil. **Episodes**, v. 22, n.3, p.221-225, 1999.

ROBAINA, T. F.; CESTARI, M. M. Estudo citogenético das espécies *Hyphessobrycon reticulatus* e *Astyanax* sp. (Characidae, Characiformes), pertencentes a um lago da Petrocix - São Mateus do Sul (PR). **Anais do 6º Evento de Iniciação Científica da UFPR**, Curitiba, Brasil, 1998.

ROBINSON, B. W.; WILSON, D. S. Character release and displacement in fishes: a neglected literature. **American Naturalist**, v.144, p.596-627, 1994.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.8, n.4, p.129-132, 1993.

ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. "Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of marcos anatômicos". **Systematic Zoology**, v.39, p.40-59, 1990.

ROHLF, F. J. TPSDIG2 for Windows version 2.10. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>>. Acesso em 20 jul. 2006.

ROHLF, F. J. **tpsUtil, file utility program. version 1.40**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2008.

ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, n.3, p.739-749, 2011.

SAADI, A. Map and database of Quaternary, faults and lineaments in Brazil. In: SOUZA, C. R. G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, A. M. S.; OLIVEIRA, P.E. **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2005, 378p.

SAADI, A. Neotectônica da plataforma brasileira: esboço e interpretações preliminares. **Geonomos**, v.1, n.1, p.1-15, 1993.

SALAMUNI, E. **Tectônica da Bacia Sedimentar de Curitiba (PR)**. Rio Claro, 1998. 210f. Tese (Doutorado em Geologia Regional), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

SAMPAIO, F. A. A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da bacia do rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo dessa fauna**. 1988. 175f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.

SANTOS, A. B. I.; ARAÚJO, F. G. Evidence of morphological differences between *Astyanax bimaculatus* (Actinopterygii: Characidae) from reaches above and below dams on a tropical river. **Environmental Biology of Fishes**, 2014.

SCACCHETTI, P. C.; ALVES, J. C. P.; UTSUNOMIA, R.; CLARO, F. L.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the Genomes of the *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.136, p.131-137, 2002.

SCHELL, J. J. Fish chromosome and their evolution. Interval Report. **Danmarks Akvarium**, p.22, 1973.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT rich chromosome region in Anura. **Chromosoma**, v.77, p.83-103, 1980.

SCHMIDT, T.; DESEL, C.; DECHYEVA, D.; FLEISHER, B.; GINDULLIS, F.; SCHMIDT, A.; HESLOP-HARRISON, J. S.; DOUDRICK, R. L. FISHing repeated DNA sequences in *Beta* genomes. **Chromosomes Today**, v.14, p.249-265, 2004.

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

SERAPHIN, B.; ROSBASH, M. Mutational analysis of the interactions between U1 small nuclear RNA and pre-mRNA of yeast. **Gene**, v.82, p.145-151, 1989.

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

SIDLAUSKAS, B. L.; MOL, J. H.; VARI, R. P. Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.162, p.103–130, 2011.

SILVA, F. M.; LERMEN, V. K.; NERY, J. T. Variabilidade interanual da precipitação na bacia do rio Iguaçu. **Acta Scientiarum**, v.23, n.6, p.1439-1444, 2001.

SILVA, D. M. Z. A.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v.146, p.144–152, 2015.

SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, v.107, p.136-140, 1998.

SOUZA, A. A. **Caracterização da Bacia do rio Iguaçu, a jusante do município de Reserva do Iguaçu, como área de descarga do aquífero Guarani**. 2004. Dissertação (Mestrado em Geologia Ambiental), Departamento de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, v. 60, p.1-11, 1995.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.405-410, 1996.

STEPHENS, G. G.; STAWSON, S. S.; CRAIG, C. A.; ELGIN, S. C. R. Interaction of heterochromatin protein 2 with HP1 defines a novel HP1-binding domain. **Biochemistry**, v.44, p.13394-13403, 2005.

STRAUSS, R. E. Evolutionary allometry and variation in body form in south American catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae). **Systematic Zoology**, v.34, p.381-396, 1985.

STRAUSS, R. E.; BOND, C. E. Taxonomic methods: morphology. In SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B.; MARYAND, U. S. A. *Methods for Fish Biology*. **American Fisheries Society**, p.109-139, 1990.

SUGUIO, K.; BIGARELLA, J. J. **Ambiente fluvial**. Curitiba: UFPR, 1979. 183 p

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

SUMNER, A. T. A. **Chromosomes**: organization and function. Blackwell Science, 2003. 287 p.

SUMNER, A. T. A. Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v.75. p.304-306, 1972.

SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B.; et al. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Molecular Cytogenetics**, v.6, n. 51, 2013.

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

TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.25, n.5-6, p.1267-1284, 2009.

TENÓRIO, R. C. C. O.; VITORINO, C. A. SOUZA, I. L.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.3, p.553-564, 2013.

THOMAZ, S. M.; CUNHA, E. R. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.22, p.218–236, 2010.

TRAVIS, J. Evaluating the adaptative role of morphological plasticity. *In*: Wainwright, C. P. & Reilly, S. M. **Ecological Morphology**: integrative organismal in biology. Chicago, University of Chicago Press, 1994. p.99-122.

TUDORACHE, C., VIAENE, P., BLUST, R., VEREECKEN, H.; DE BOECK, G. A comparison of swimming capacity and energy use in seven European freshwater fish species. **Ecology of Freshwater Fish**, v.17, p.284–29, 2008.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZÓN, J. L.; CROSS, I.; SERASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v.138, p.787–794, 2010.

UIEDA, V. S.; VANNOTE, R. L.; MINSHALL, G. W.; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J. R.; CUSHING, C. E. The river continuum concept. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**, Ottawa, v.37, p. 130–137, 1980.

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetic and Genome Research**, v.142, p.286–292, 2014.

VAN ARSDELL, S. W.; WEINER, A. M. Human genes for U2 small nuclear RNA are tandemly repeated. **Molecular Cell Biology**, v.4, n.3, p.492-499, 1984.

VANNOTE, R. L.; MINSHAL, G. W.; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J.; CUSHING, C. E. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences**, v.37, p.130–137, 1980.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology an overview. In: MALABARBA, R. E.; REIS, R. P.; VARI Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.1-11, 1998.

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

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). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, 2006.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic and Genetic Research**., v.122, p.67-72, 2008a.

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, 2008b.

VICENTE, V. E.; JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v.54, p.365-369, 2001.

VIEIRA, F.; GOMES, J. P. C.; MAIA, B. P.; SILVA, L. G. M. **Peixes do Quadrilátero Ferrífero**. Guia de Identificação, 2005. p.206.

VILELLA, F. S.; BECKER, F. G.; HARTZ, S. M. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic forest river in Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, n.2, p.223-232, 2002.

VIRTULE, J. R. S.; ABILHOA, V. Plano de Conservação para Peixes do Rio Iguaçu. PARANÁ, Instituto Ambiental do. **Plano de Conservação para Espécies da Ictiofauna ameaçada no Paraná**. IAP/ Projeto Paraná Biodiversidade, 2009, p.26-37.

VOLTOLIN, T. A.; SENHORINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 2010.

WAINWRIGHT, P. C. Functional morphology as a tool in ecological research. In: Wainwright, C. P.; Reilly, S. M. **Ecological Morphology: Integrative Organismal Biology**. Chicago, University of Chicago Press, 1994, p.42-59.

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

WATANABE-NAGASU, N. Y.; ITORH, T.; TANI, T.; OKANO, K.; KOGA, N.; OKADA, N.; OHSHIMA, Y. Structural analysis of gene *loci* for rat U1 small nuclear RNA. **Nucleic Acids Research**, v.11, p.1791-1801, 1983.

WATSON, D. J.; BALON, E. Ecomorphological analysis of taxocenes in rainforest streams of northern Borneo. **Journal of Fish Biology**, v.25, p.371-384, 1984.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, v.54, n.5, p.844-851, 2005.

WILLIG, M. R.; OWEN, R. D.; COLBERT, R. L. Assessment of morphometric variation in natural populations: The inadequacy of the univariate approach. **Systematic Zoology**, v.35, n.2, p.195-203, 1986.

WINEMILLER, K. O. Ecomorphological diversification in lowland freshwater fish assemblages from five biotic regions. **Ecological Monographs**, v.61, p.343-365, 1991.

WINEMILLER, K. O. Ecomorphology of freshwater fishes. Ecological divergence and convergence in freshwater fishes. **National Geographic Research & Exploration**, v.8, n.3, p.308 – 327, 1992.

WISE, J. A.; WEINER, A. M. *Dictyostelium* small nuclear RNA D2 is homologous to rat nucleolar RNA U3 and is encoded by a dispersed multigene family. **Cell**, v.22, p. 109-118, 1980.

YANO, C. F.; MOREIRA FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *Incertae Sedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. **Biologia**, v.69, n. 6, p.790-798, 2014.

YE, J.; RENAULT, V. M.; JAMET, K.; GILSON, E. Transcriptional outcome of telomere signalling. **Genetics**, v.15, p.491-503, 2014.

**ANEXOS**

## ANEXO A: LICENÇA PERMANENTE PARA A COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO MMA/IBAMA/SISBIO:1511-1.



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

### Licença permanente para coleta de material zoológico

<b>Número: 15115-1</b>		<b>Data da Emissão: 02/04/2008 10:47</b>
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 550248	Nome: <b>Roberto Ferreira Antoni</b>	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 exige 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 NAO exige 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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Táxons autorizados

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

#### Destino do material biológico coletado

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

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

**Código de autenticação: 85979796**



## ANEXO B: COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE PONTA GROSSA

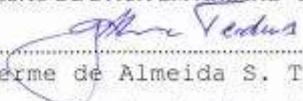


PARECER Nº 02/2008  
Protocolo: 04509/08

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

Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.

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

  
Prof.º Guilherme de Almeida S. Tedrus  
Coordenador substituto da SCEEA