



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



RAFAEL HENRIQUE DA ROCHA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MORFOMÉTRICA EM
Astyanax altiparanae (TELEOSTEI, CHARACIFORMES) DA
BACIA DO RIO IGUATEMI (MS, BRASIL)**

Mundo Novo-MS

Novembro- 2012

RAFAEL HENRIQUE DA ROCHA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MORFOMÉTRICA EM
Astyanax altiparanae (TELEOSTEI, CHARACIFORMES) DA
BACIA DO RIO IGUATEMI (MS, BRASIL).**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Carlos Alexandre Fernandes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dayani Bailly

Mundo Novo-MS

Novembro -2012

RAFAEL HENRIQUE DA ROCHA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MORFOMÉTRICA EM
Astyanax altiparanae (TELEOSTEI, CHARACIFORMES) DA
BACIA DO RIO IGUATEMI (MS, BRASIL).**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

APROVADO EM 28 de Novembro de 2012

Prof^o. Dr^o. Carlos Alexandre Fernandes - Orientador – UEMS_____

Prof^a. Dr^a. Zaira da Rosa Guterres – UEMS_____

Prof^a. MSc. Cássia Fernanda Yano– UEMS_____

...dedico este trabalho aos meus Pais José e Iraci pelo apoio nos momentos difíceis pela confiança e pelo amor incondicional...

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio de muitas pessoas que participaram direta e indiretamente. Em especial:

Primeiramente a Deus, pela força, não deixando o cansaço e o desânimo fazer com que eu desistisse dos meus objetivos.

Ao Professor Dr^o Carlos Alexandre Fernandes pela orientação, paciência, amizade e dedicação nos horários de atendimento.

A professora Dr^a. Dayani Bailly pela co-orientação e ajuda na elaboração deste trabalho.

As Professoras Zaira e Cássia por fazerem parte da banca examinadora e pelas sugestões para meu trabalho.

A Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Mundo Novo, pelo espaço físico para desenvolvimento das pesquisas.

A todos os funcionários da unidade e professores pela amizade e colaboração.

A toda minha família pelo apoio e incentivo durante os anos na graduação, principalmente ao meu pai e minha mãe que nunca me deixaram desistir, e que sempre estiveram presentes em cada momento desse percurso.

A todos os meus amigos do Laboratório de Citogenética de peixes que sempre me apoiaram e me ajudaram durante as pesquisas, em especial a Jenifer que me levou para a citogenética de peixes.

Aos meus grandes amigos, Elizângela e Dercival que estiveram presentes em todos os momentos, nas horas alegres, nas horas de angústia, em todos os trabalhos acadêmicos, considero vocês como Irmãos que a vida colocou em meu caminho.

Aos meus amigos de turma, em especial: Ronaldo, Thalita, Simone, Ewhelyne, Poliana, Luana, Jéssica, Geciane, Ivanir, Alessandro, Jociane, Alessandra pela amizade e momentos inesquecíveis, levarei um pouco de cada um de vocês por toda vida.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luiz Fernando Veríssimo

Resumo

Os Characiformes são exclusivamente peixes de água doce, com maior diversidade nas bacias hidrográficas neotropicais. Dentro desta ordem a família Characidae compreende um total de 1352 espécies. Dentre esses, o gênero *Astyanax* é relativamente comum, o qual consiste de pequenos peixes conhecidos no Brasil como lambaris ou piabas. Os *Astyanax* caracterizam-se por apresentarem número diplóide variando de 36 cromossomos em *Astyanax Shubarti*, 50 cromossomos em *Astyanax altiparanae*. Diante disso o presente trabalho teve por objetivo, analisar citogeneticamente e morfológicamente exemplares de duas populações *A. altiparanae* coletados no córrego Água Boa e Santa Maria pertencentes à bacia do rio Iguatemi afluente da margem direita do rio Paraná, de modo que os resultados obtidos possam contribuir para um melhor entendimento do processo evolutivo dos *A. altiparanae*. Foram analisados exemplares de *A. altiparanae* do córrego Água Boa e exemplares do córrego Santa Maria. O cariótipo foi organizado com um número diplóide de 50 cromossomos para as duas populações, distribuídas em 8m+ 26sm+ 6st+ 10a com um número fundamental de 90 para população do córrego Água Boa, e 6m+ 24sm+ 8st+ 12a para população do córrego Santa Maria com um número Fundamental de 88. A Ag-NOR foi evidenciada no braço curto do par 18 e no braço curto de um cromossomo submetacêntrico para população do córrego Água Boa, já para população do córrego Santa Maria apresentou marcações no braço curto do par 16 com heteromorfismo de tamanho. A heterocromatina constitutiva na população do córrego Água Boa foi evidenciada em 4 pares de cromossomos em regiões intersticiais, e a NOR do par 18 foi banda-C positiva, já a população do córrego Santa Maria apresentou 5 pares de cromossomos marcados em regiões intersticiais e a NOR do braço curto do par 16 também foi banda-C positiva com heteromorfismo de tamanho. Também foi avaliado características morfológicas para as duas populações, para a qual os três primeiros eixos foram retidos para interpretação, que juntas explicaram 81% da variação, evidenciando distinção morfométricas entre as populações. Portanto, apesar das duas populações apresentarem o mesmo número diplóide de $2n=50$ cromossomos, elas diferiram na fórmula cariotípica e quanto à localização das NORs e da heterocromatina constitutiva, além de apresentarem diferenças morfológicas.

Palavras-chave: Lambaris, Cromossomos, Morfologia, Heterocromatina, Ag-NOR.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	8
2-METODOLOGIA	9
3-RESULTADOS.....	11
3.1-Análise cariotípica.....	11
3.2- Análise Morfométrica	13
4-DISCUSSÃO	15
4.1-Comparações Cariotípicas em <i>Astyanax altiparanae</i>	15
4.2- Comparações Morfométricas em <i>Astyanax altiparanae</i>	17
5- CONCLUSÕES	19
REFERÊNCIAS	20

1-INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce Neotropical é a mais rica de todo o planeta (SCHAEFER, 1998). De acordo com Reis et al. (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas, aproximadamente 6.000 encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas validadas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente.

Dentro desse universo de espécies de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi, dentro da qual se encontra a ordem Characiformes, representando 71% da ictiofauna de água doce Neotropical (FINK; FINK, 1981; REIS et al., 2003). Os Characiformes são exclusivamente peixes de água doce, distribuídos na América e na África, com maior diversidade nas principais bacias hidrográficas neotropicais (BUCKUP, 1998). Dentro desta ordem, a família Characidae compreende 952 espécies validadas e 400 espécies ainda não descritas, totalizando 1352 espécies (REIS et al., 2003).

Dentre os Characidae, o gênero *Astyanax* é relativamente comum, compreendendo 137 espécies validadas (FROESE; PAULY, 2012), o qual consiste de pequenos peixes conhecidos no Brasil como lambaris ou piabas. O gênero revela várias formas semelhantes, formando um complexo, do ponto de vista taxonômico (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Os representantes deste gênero são caracterizados por apresentarem linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, nadadeira caudal nua, com escamas apenas na base (BRITSKI, 1972).

Astyanax altiparanae caracteriza-se por apresentar corpo prateado, com região ventral esbranquiçada e dorsal acinzentada, no flanco a faixa lateral prateada raramente é visível, nadadeiras caudal, anal e pélvica amareladas, enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

A espécie é tipicamente oportunista, utilizando táticas diferenciadas para manter a estrutura da população (ORSI; SHIBATA; SILVA-SOUZA, 2002). Portanto a elevada plasticidade alimentar de *A. altiparanae*, bem como sua capacidade de reproduzir em vários ambientes, explicam o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats (DOMINGUES et al., 2007).

Do ponto de vista citogenético muitas espécies do gênero já foram descritas, com número diplóide variando de 36 cromossomos em *A. schubarti* (DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2001), a 50 cromossomos em *A. altiparanae* e *A. scabripinnis* entre outros (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2003). O gênero apresenta uma extensa variabilidade em suas fórmulas cariotípicas as quais acompanham sua diversidade biológica,

sendo portanto um grupo de organismos bastante interessante para estudos de biologia evolutiva.

A morfometria é uma análise da forma corporal em relação ao tamanho por meio de métodos numéricos. É uma análise usual em Biologia evolutiva, além de propiciar a interpretação e comparação precisa dos padrões de variação de caracteres quantitativos (BLACKITH; REYMENT, 1971; CAVALCANTI; LOPES, 1990). Os seres vivos são multidimensionais, onde no mínimo três vetores são necessários para descrever sua forma (DOMINGUES et al., 2007), e como esta é o resultado de diversas respostas alométricas (alterações nas proporções de um organismo ao longo do crescimento) durante o desenvolvimento, os estudos morfológicos devem ser desenvolvidas através de ferramentas multivariadas (CAVALCANTI; LOPES, 1993).

Diante disso, o presente estudo tem por objetivo analisar citogeneticamente e morfológicamente exemplares de *A. altiparanae* de populações distintas da bacia do rio Iguatemi (MS- Brasil), para um melhor entendimento do processo evolutivo deste grupo de peixes.

2-METODOLOGIA

Um total de 32 espécimes de *Astyanax altiparanae* foram capturados em dois córregos afluentes da margem direita do rio Iguatemi, localizados nas proximidades do município de Mundo Novo, MS (Figura 1). No córrego Água Boa (23°50' 16,65''S 54° 20' 55,54'' W) foram coletados 24 indivíduos (10 machos, 11 fêmeas e 3 com sexo indeterminado) e no córrego Santa Maria (23°54' 50,20''S/54° 17' 28,76''W) foram capturados 8 exemplares (2 machos, 4 fêmeas e 2 com sexo indeterminado). Todos os 32 espécimes foram submetidos às análises cariotípicas e 22 espécimes foram submetidos às análises morfométricas, sendo 14 do córrego Água Boa e 8 do córrego Santa Maria.

Os indivíduos após coletados foram colocados em aquários no laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Mundo Novo-MS. Antes de serem eviscerados os peixes eram anestesiados por *overdose* de óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000). Para cada exemplar analisado foi fornecido um número de identificação e determinado o sexo com o auxílio do microscópio. Todos os peixes analisados foram depositados em álcool (100%) para posteriores análises morfométricas.

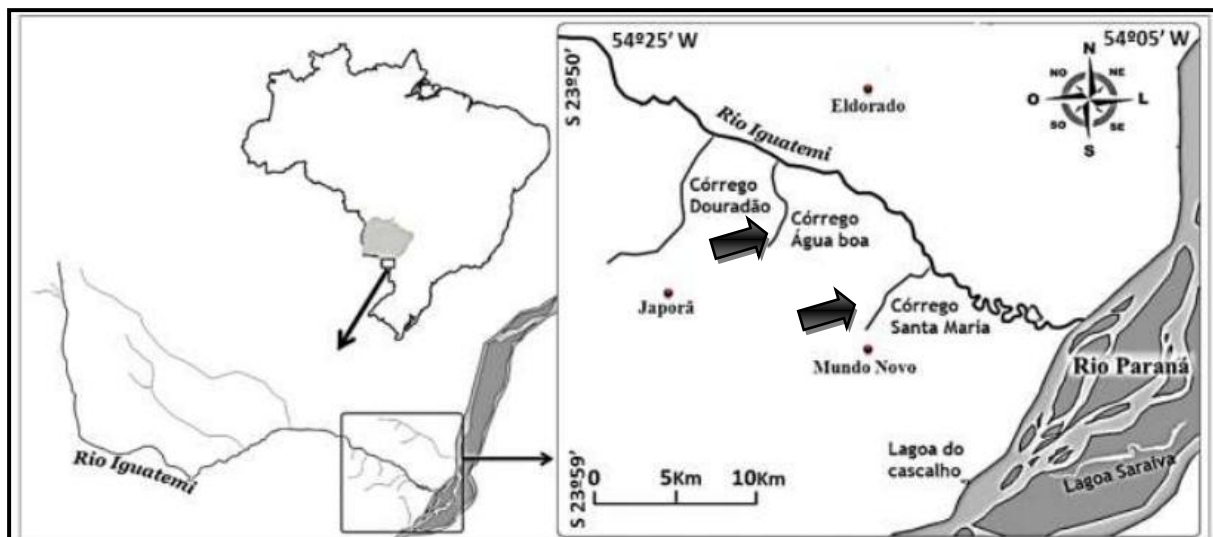


Figura- Área de coleta dos espécimes de *A. altiparanae* pertencentes à Bacia do rio Iguatemi. As setas largas à direita indicam a localização dos dois córregos.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células extraídas do rim seguindo a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978), que consiste na inibição das fibras do fuso mitótico aplicando colchicina (1ml/100g) no animal, seguida de hipotonização das células com cloreto de potássio, fixação da suspensão celular com metanol e ácido acético (3:1) e por último confecção das lâminas coradas com Giemsa a 5%.

A identificação dos cromossomos foi feita de acordo com o critério de relação de braços (RB), sugerido por Levan et al. (1964) e classificados como metacêntrico (m: RB = 1.00 a 1.70), submetacêntrico (sm: RB = 1.71 a 3.00), subtelocêntrico (st: RB = 3.01 a 7.00) e acrocêntrico (a: RB = maior que 7.01). O número fundamental (NF) de braços foi calculado considerando os cromossomos do tipo metacêntrico, submetacêntrico e subtelocêntrico com dois braços e cromossomos acrocêntricos com um braço.

A técnica de banda-C descrita por Sumner (1972) foi empregada para análise da heterocromatina constitutiva e a coloração por nitrato de prata ($Ag-NO_3$) foi utilizada para detectar as Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-NORs), seguindo o método descrito por Howell e Black (1980).

Para a análise da morfometria dos espécimes, foi seguido o protocolo de Etrauss e Bookestein (1982), denominado de rede de treliça, o qual possibilita a realização de medidas a partir da associação de pontos anatômicos. As medidas dos caracteres foram obtidas com o auxílio de paquímetro digital, com precisão de 0,05 mm. Para cada exemplar foram tomadas 17 medidas morfométricas, sendo elas: comprimento padrão (CP), comprimento pré-dorsal (CPD), comprimento pré-ventral (CPV), comprimento pré-peitoral (CPP), comprimento pré-

anal (CPA), altura do corpo (AC), altura do pedúnculo caudal (APC), comprimento do pedúnculo caudal (CPC), comprimento da nadadeira dorsal (CND), comprimento da nadadeira ventral (CNV), comprimento da nadadeira peitoral (CNP), comprimento da nadadeira anal (CNA), comprimento da cabeça (CC), comprimento do focinho (CF), comprimento da maxila (CM), limite interorbital (LI), diâmetro da órbita (DHO) (Figura 2).

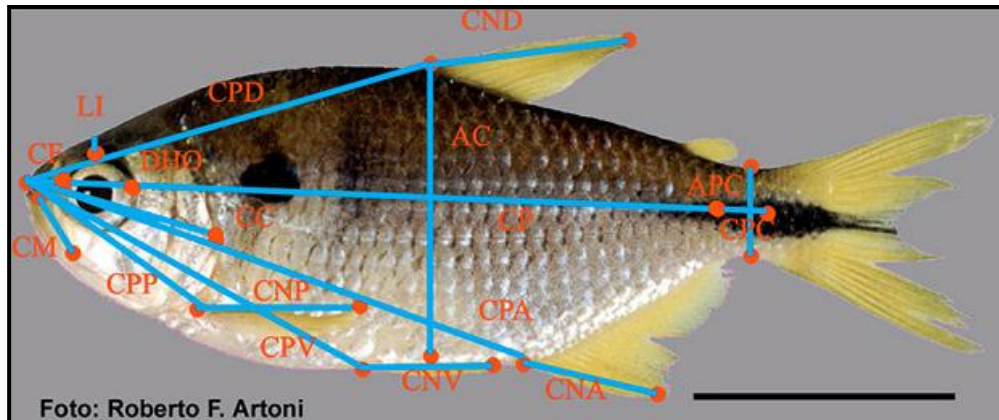


Figura 2- Variáveis Morfológicas utilizadas para análise em *Astyanax altiparanae*.

Para avaliar se houve distinção morfológica entre os indivíduos analisados do córrego Água Boa e Santa Maria a matriz de variáveis morfológicas foi sumarizada através de uma Análise de Componentes Principais (ACP) usando o programa PC-ORD 4.0 (McCUNE; MEFFORD, 2007). Foi adotado o critério de seleção de eixos de Kaiser-Guttman (JACKSON, 1993) que estabelece que eixos com autovalores maiores que 1 devem ser retidos para interpretação da ordenação. Para verificar se a média dos escores dos eixos diferiu entre as populações analisadas foi realizada uma análise de variância unifatorial (ANOVA unifatorial), sendo os escores a variável dependente e os córregos os fatores. Para verificar o nível de associação entre as variáveis morfológicas e os escores dos eixos foram realizadas correlações de Pearson. O nível de significância adotado foi o de $\alpha = 0,05$.

3-RESULTADOS

3.1-Análise cariotípica

Os exemplares de *A. altiparanae* do córrego Água Boa e do córrego Santa Maria apresentaram um número diplóide de 50 cromossomos, diferindo apenas na fórmula cariotípica e no número fundamental. A população de *A. altiparanae* do córrego Água Boa apresentou um cariótipo composto por $8m+26sm+6st+10a$ e um número fundamental igual a 90, para ambos os sexos (Figura 3A). Já a população do córrego Santa Maria, apresentou um

cariótipo composto por 6m+24sm+8st+12a e número fundamental de 88, para ambos os sexos (Figura3B).

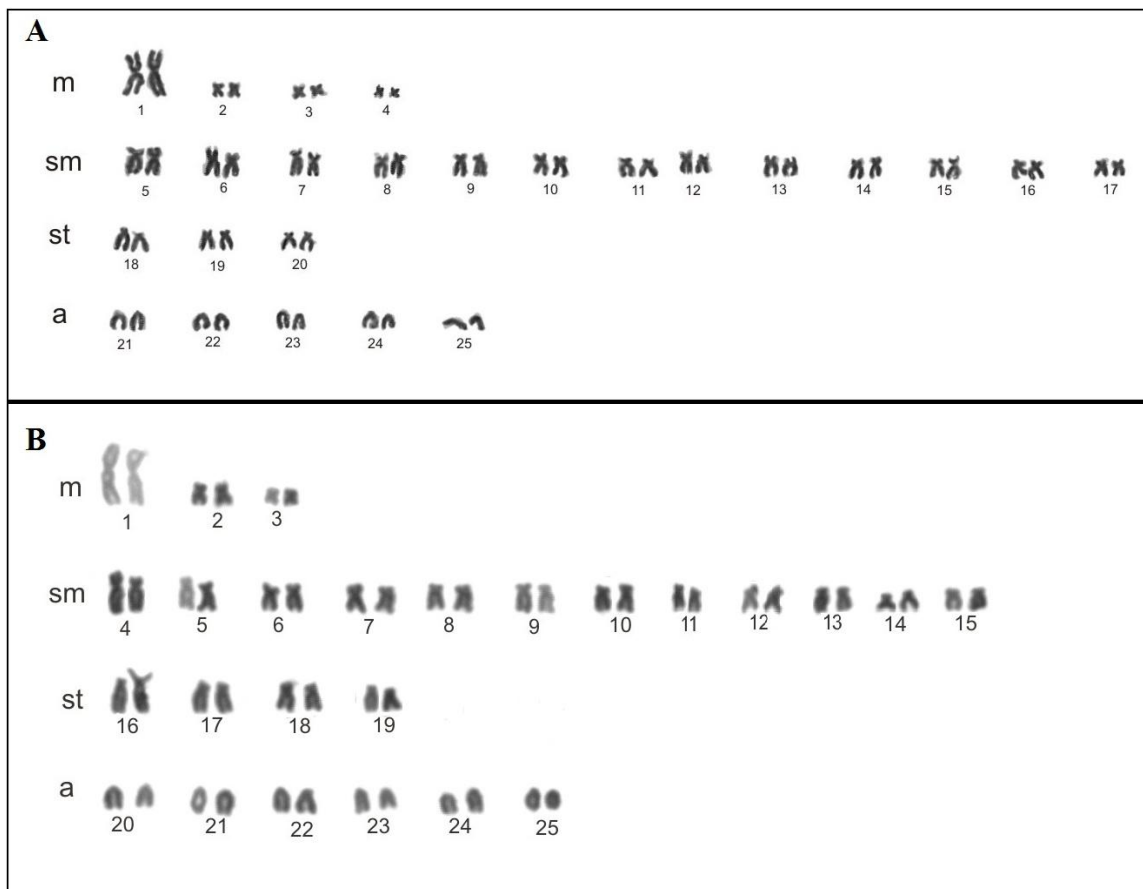


Figura 3 - Cariótipos de *A. altiparanae*. A) população do córrego Água Boa. B) população do córrego Santa Maria.

A impregnação por nitrato de prata para a população de *A. altiparanae* do córrego Água Boa, evidenciou regiões organizadoras do nucléolo no braço curto do par 18, com heteromorfismo de tamanho e coincidente com a constrição secundária visualizada em um dos homólogos e também no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 4A). Na população de *A. altiparanae* do córrego Santa Maria, foi evidenciada marcação no braço curto do par 16, com heteromorfismo de tamanho e coincidente com a constrição secundária visualizada em um dos homólogos (Figura 4B).

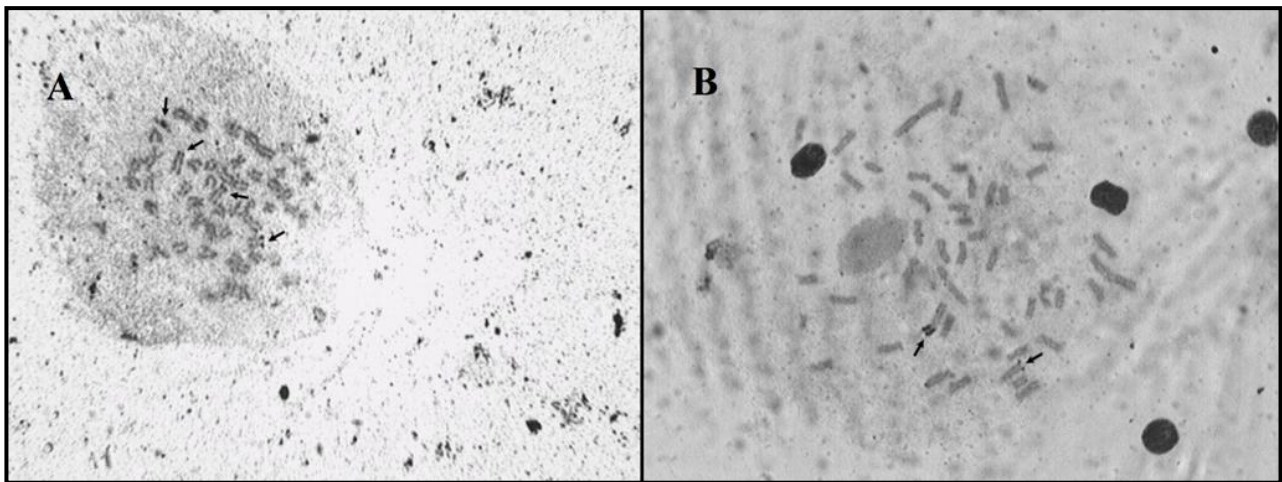


Figura 4- Cromossomos metafásicos de *A. altiparanae* corados pelo nitrato de prata: A) população do córrego Água Boa, B) população do córrego Santa Maria. As setas indicam as Ag-NORs.

Na população de *A. altiparanae* do córrego Água Boa a heterocromatina constitutiva foi evidenciada em 4 pares de cromossomos com blocos heterocromáticos em regiões intersticiais, a NOR no braço curto do par 18 foi Banda-C positiva, com heteromorfismo de tamanho (Figura 5A). Diferentemente, na população de *A. altiparanae* do córrego Santa Maria 5 pares de cromossomos foram marcados em regiões intersticiais, a NOR no braço curto do par 16 foi Banda-C positiva, também com heteromorfismo de tamanho (Figura 5B).

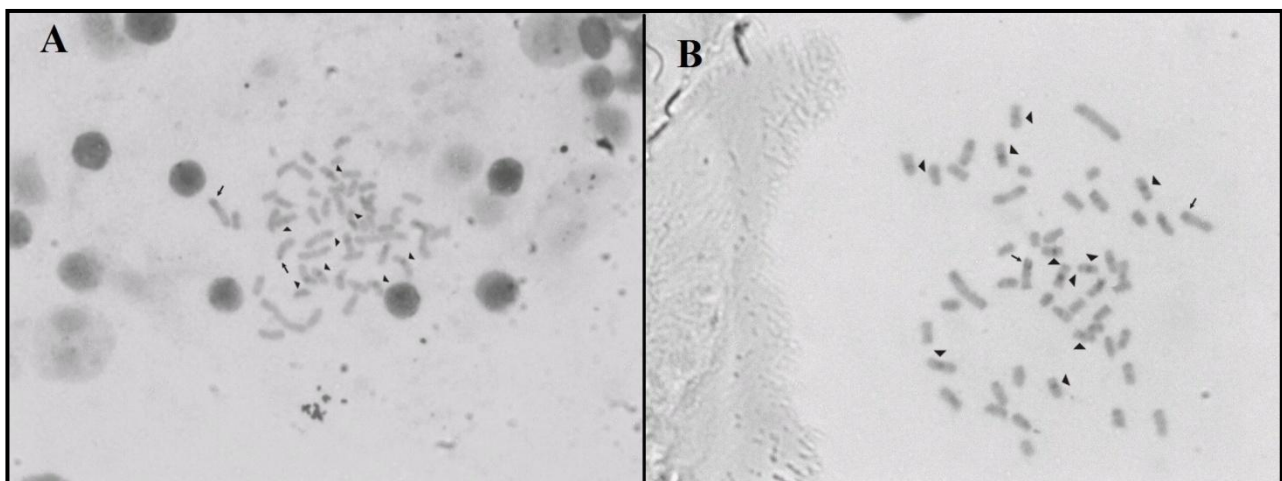


Figura 5-Cromossomos metafásicos de *A. altiparanae* após a Banda-C. A) População do Córrego Água Boa. B) População do Córrego Santa Maria. As setas indicam as NORs banda-C positivas e as cabeças de setas indicam os cromossomos com marcações intersticiais.

3.2- Análise Morfométrica

Os primeiros três eixos da APC apresentaram autovalores maiores que 1,0 e foram retidos para interpretação. Juntos estes explicaram 81% da variação da ordenação. Entretanto, os resultados da ANOVA revelaram que apenas as médias dos escores do eixo 2 apresentaram

diferenças significativas entre os córregos ($F = 16,17$; $p = 0,0007$), evidenciando distinção morfométrica entre as populações (Figura 6).

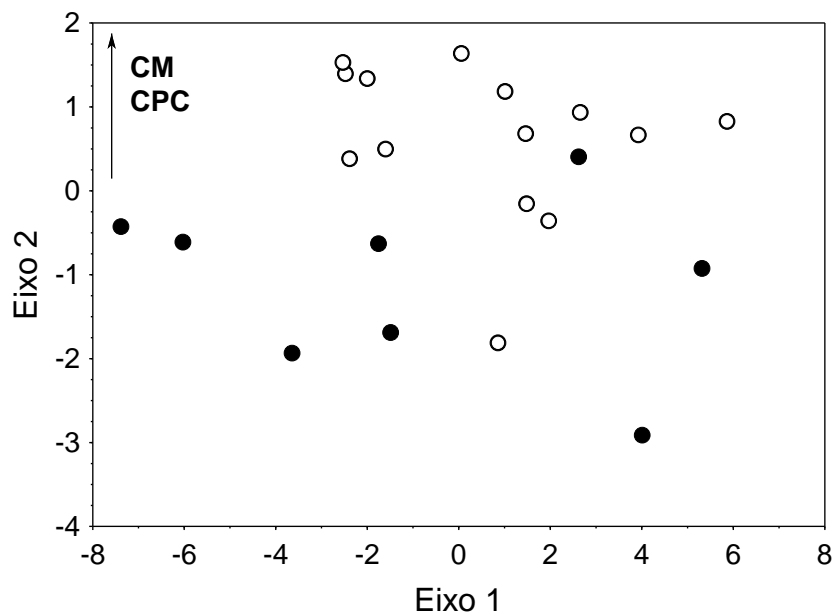


Figura 6– Dispersão dos escores dos dois primeiros eixos da ACP. Círculos vazios representam indivíduos da população do córrego Água Boa e círculos sólidos representam indivíduos da população do córrego Santa Maria. CM = Comprimento da Maxila e CPC = Comprimento do Pedúnculo Caudal.

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram atendidos. As variáveis CM ($r = 0,61$) e CPC ($r = 0,64$) correlacionaram-se positivamente com os escores do eixo 2, indicando que maiores valores dessas variáveis estão presentes na população do córrego Água Boa (Tabela 1). Os resultados da ANOVA indicaram que as populações dos dois córregos são diferentes quanto às características morfométricas ditadas pelas variáveis CM e CPC.

Tabela 1- Valores das correlações de Pearson entre as variáveis morfométricas e os eixos da APC para as populações de *A. altiparanae*.

Medidas	APC 1	APC 2*	APC 3
CP	-0.287	-0.0872	0.0777
CPD	-0.2882	-0.0694	0.106
CPV	-0.2448	-0.1173	0.0888
CPP	-0.2586	0.0187	0.0103
CPA	-0.2401	0.0203	-0.2077
AC	-0.2841	-0.0753	0.0981
APC	-0.2376	-0.1003	0.372
CPC	-0.1186	0.6354	-0.3039
CND	-0.25	-0.1257	-0.2004
CNV	-0.2265	-0.0281	-0.1968
CNP	-0.2644	-0.0066	-0.1981
CNA	-0.2438	-0.1935	-0.3312
CC	-0.257	-0.1441	0.2739
CF	-0.1335	0.3211	0.6151
CM	-0.173	0.6081	0.0213
LI	-0.2803	0.0673	-0.0555
DHO	-0.2519	-0.0369	-0.081

*Eixo que apresentou médias dos escores estatisticamente diferentes entre os córregos.

4-DISCUSSÃO

4.1-Comparações Cariotípicas em *Astyanax altiparanae*

As duas populações de *Astyanax altiparanae* estudadas no presente trabalho apresentaram o mesmo número diplóide de 50 cromossomos, porém com diferentes fórmulas cariotípicas. Este resultado é concordante com outros já descritos na literatura (Tabela 2), demonstrando assim que existe um conservadorismo no número diplóide para a espécie.

Uma característica notável para as populações de *A. altiparanae* analisadas é a presença do primeiro par metacêntrico maior em comparação aos demais cromossomos. Outra característica visível é a grande quantidade de cromossomos submetacêntricos, também observados em outras populações, com exceção da população do córrego Três Bocas (Tabela 2). De acordo com Martinez et al. (2012) a morfologia dos cromossomos dos espécimes de *A. altiparanae* do rio Mogi- Guaçu e do rio Tietê não apresentaram variações populacionais, ou seja, os cariótipos compartilham a mesma fórmula cariotípica e um número fundamental, diferindo assim dos resultados obtidos no presente estudo que houve variação tanto na fórmula cariotípica quanto no número fundamental.

As variações na fórmula cariotípica aqui descritas, assim como em estudos anteriores pode ser explicado devido à ampla distribuição geográfica da espécie formando populações isoladas, ou devido a rearranjos cromossômicos como inversões, duplicações, deleções, transposições ou translocações fazendo com que a fórmula do cariótipo e o número fundamental sejam diferentes, sem alterar o número diplóide (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; PISCOR, 2012;).

Tabela 2- Dados Citogenéticos em *Astyanax altiparanae*.

Rio/Córrego	Bacia	2n	m	sm	st	a	NF	Ref
Rio Mogi Guaçu	Rio Mogi Guaçu	50	10	24	4	12	88	1
Rio Mogi Guaçu	Rio Mogi Guaçu	50	6	24	12	8	92	2
Lagoa Tarumã	Rio Tibagi	50	6	28	8	8	92	3
Córrego Monjolinho	Rio Paraná	50	8	20	12	10	90	4
Rio Paranapanema	Rio Paranapanema	50	10	22	6	12	88	5
Rio Claro	Rio Paranapanema	50	10	24	4	12	88	6
Córrego Três Bocas	Rio Paranapanema	50	40	0	10	0	100	7
Córrego Jataí	Rio Grande	50	16	22	6	6	94	8
Córrego Maringá	Rio Pirapó	50	10	22	6	12	88	9
Rio Mogi Guaçu	Rio Mogi Guaçu	50	6	12	20	12	88	10
Rio Tietê	Rio Tietê	50	6	12	20	12	88	10
Rio Claro	Rio Tibagi	50	10	22	4	14	86	6
Córrego Guaçu	Rio Iguatemi	50	10	24	6	10	90	11
Rio dos Índios	Bacia do Ivaí	50	6	30	4	10	90	12
Rio Paraná	Bacia do Paraná	50	6	26	6	12	88	12
Córrego Água Boa	Rio Iguatemi	50	8	26	6	10	90	13
Córrego Santa Maria	Rio Iguatemi	50	6	24	8	12	88	13

Ref: 1= Morelli et al., 1983; 2= Paganelli, 1990; 3=Domingues et al.,2007; 4= Moreira-Peres, 2005; 5= Daniel-Silva; Almeida-Toledo, 2001; 6= Pacheco et al., 2001; 7= Takahashi et al., 1995; 8= Barbosa et al., 2002; 9= Porto; Martins-Santos, 2002; 10= Martinez et al., 2012; 11= Piscor, 2012,12= Fernandes; Martins-Santos, 2004; 13= Presente estudo. 2n= número diplóide, m= metacêntrico, sm= submetacêntrico, st= subtlocêntrico, a= acrocêntrico, NF= número fundamental.

A impregnação por nitrato de prata revelou que a população de *A. altiparanae* do córrego Água Boa apresenta sistema de NOR múltipla com marcações em região terminal, o que é frequentemente observado para esta espécie em diferentes bacias (DANIEL-SILVA, 1996; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; PACHECO, 2011). Diferentemente a população do córrego Santa Maria, foi detectada um sistema de NORs simples. Marcação em apenas um par de cromossomos em região terminal também já foi descrita para outras populações de *A. altiparanae* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES et al., 2007). Este resultado também foi observado por Abelini (2007) estudando a população de *Astyanax fasciatus* do ribeirão Maringá, na qual mostrou apenas 1 par ativo, indicando um

sistema de NOR simples com a presença de uma marcação terminal no braço longo de um par de cromossomos do tipo submetacêntrico.

As populações de *A. altiparanae* aqui analisadas apresentaram variações no tamanho da constricção secundária e da NOR entre os cromossomos homólogos do primeiro par de subteloentrícos, esta característica é relativamente comum entre alguns grupos de peixes, inclusive em *A. altiparanae* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; PACHECO, 2011) e pode ser atribuída há uma maior atividade gênica, resultando em uma grande quantidade de proteínas coradas em um dos cromossomos, visto que apenas as proteínas são coradas pelo nitrato de prata. Por outro lado, pode-se sugerir que eventos de transposição, duplicação e/ou deleção ou por crossing-over desigual na região (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004) podem ter aumentado a quantidade de genes DNAr em apenas um dos homólogos, responsável por este heteromorfismo de tamanho da NOR e da constricção secundária. Portanto, novas análises deverão ser feitas através da hibridação *in situ* por fluorescência com sondas ribossomais para confirmação da maior quantidade de genes DNAr em um dos cromossomos homólogos portadores da NOR nas duas populações de *A. altiparanae*.

Com relação à heterocromatina constitutiva, nas duas populações aqui analisadas foi detectado um maior número de cromossomos com blocos heterocromáticos em região intersticial do que em regiões centroméricas e teloméricas. O padrão de localização intersticial da heterocromatina parece ser uma característica desta espécie, já que entre diferentes populações de *A. altiparanae* este padrão tem sido observado (PAGANELLI, 1990; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004, NETO et al. 2009). Além disso, no presente estudo as duas populações apresentaram NOR que foi banda-C positiva, diferindo apenas no par cromossômico marcado, resultado também encontrado por Fernandes e Martins-Santos (2004) em diferentes populações.

4.2- Comparações Morfométricas em *Astyanax altiparanae*

Com os resultados morfométricos em *Astyanax altiparanae* foi constatado que não houve sobreposição das populações do córrego Água Boa e Santa Maria quanto às variáveis comprimento do pedúnculo caudal (CPC) e comprimento da maxila (CM). Estudos com a mesma abordagem revelaram resultados variados em diferentes populações de espécies do gênero *Astyanax*. Artoni et al. (2006), avaliando populações distintas de *A. fasciatus* do Parque Estadual de Vila Velha notou diferenças entre as populações da Furna 2 com relação as Furnas 1, 3, 4, rio Tibagi e Lagoa Dourada e atribuiu este resultado à provável falta de

fluxo gênico. Do mesmo modo, Pazzo et al. (2008) sugeriram que duas populações de *A. fasciatus* da bacia do Rio Paraná diferem cariotipicamente e morfologicamente, separando-as em dois grupos claramente distintos. Já Shibata e Artoni (2005) avaliaram quatro populações de *A. fasciatus* do Parque Estadual de Vila Velha e observaram que apesar de pequenas diferenças morfométricas, as populações analisadas pertencem à mesma espécie.

Considerando os estudos com *A. altiparanae*, Domingues et al. (2007), ao analisarem populações das bacias do alto rio Tibaji e alto rio Iguaçu, verificaram sobreposição dos escores individuais das medidas morfométricas, indicando que as duas populações não apresentam diferenças morfológicas marcantes. No entanto, Moreira-filho e Bertollo (1991) em estudos com espécies do complexo *A. scabripinnis*, bem como outras espécies com características semelhantes, alertaram para o fato de que é importante interpretar os resultados obtidos não somente como um papel do isolamento causado por divisores dos maiores sistemas hidrográficos, mas principalmente como um papel dos diferentes ambientes.

5- CONCLUSÕES

-Os dados citogenéticos para *Astyanax altiparanae* analisadas no presente trabalho corroboram com aspectos básicos que são característicos dentro deste grupo, o que indica a existência de complexo de espécies.

-Alterações cariotípicas foram observadas nas duas populações, o que é refletido no número fundamental.

-As técnicas de NORs e Banda-C também permitiram a constatação de pequenas diferenças entre as populações analisadas.

-As análises dos dados morfométricos possibilitaram verificar que as populações de *A. altiparanae* pertencentes à mesma bacia hidrográfica possuem diferenças morfológicas marcantes, evidenciadas principalmente pelas medidas do comprimento da Maxila (CM) e comprimento do Pedúnculo Caudal (CPC).

-Os resultados da análise combinada dos dados citogenéticos e morfológicos foram coincidentes na caracterização das duas populações de *A. altiparanae* aqui estudadas, indicando que existem diferenças cariotípicas e morfológicas marcantes entre as duas populações.

REFERÊNCIAS

- ABELINI, E. Análise citogenética em três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces; Characiformes). Maringá-PR: Universidade Estadual de Maringá. 2007. 48p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), 2007.
- ARTONI, R. F.; SHIBATA, O. A.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax aff fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibaji basin (Parana, Brazil). *Neotropical Ichthyologic*, v.4, n. 2, p. 197-202, 2006.
- BARBOSA, W. S.; TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. Caracterização da heterocromatina em *Astyanax altiparanae* de duas populações de Uberlândia (MG). IX Simpósio de Citogenética e Genética de peixes. Maringá, PR. P.2, 2002.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. v. 1, p. 103-120, 1978.
- BLACKITH, R. E.; REYMENT, R. A. Multivariate morphometrics. **Academic Press, London**, p. 410, 1971.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da CPRN. da Secretaria de Agricultura, p. 79-108, 1972.
- BUCKUP, P. A. **Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophis)**. In: Malabarba, L.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M.; Lucena C.A. (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, p. 123–144, 1998.
- CAVALCANTI, M. J.; LOPES, P. R. D. Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de *Serranidae* (Teleostei: Perciformes). **Acta Biologica 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, 1990.
- DANIEL-SILVA, M. F. Z. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1996. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). p. 176, 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, Tetraodonidae). **Caryologia**. v. 54, p. 209- 215, 2001.
- DOMINGUES, M. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WANSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000

- (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**. v. 5, p. 37-44, 2007.
- FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**. v. 141, p. 328-332, 2004.
- FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin, PR, Brazil. **Cytologia**. v. 68, p. 289-293. 2003.
- FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the *Ostariophysan fishes* (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 724, p. 297-353, 1981.
- FROESE, R.; PAULY, D. Fishbase World Wide web electronic publication. Em <<http://www.fishbase.org/search.php>>. Acesso em: 18 de abril de 2012.
- GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS- Série Zoologia**, n.13, p.65-88, 2000.
- GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**. v.57, p. 1453–1464, 2000.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- JACKSON, D. A. Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology*, vol. 74, p. 2204-2214, 1993.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric positions on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p.201-220, 1964.
- MARTINEZ, E. R. M.; ALVES, A. L.; SILVEIRA, S. M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis in the incertae sedis species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetics**. v. 6, n. 1, p. 41-51, 2012.
- MCCUNE, B. e MEFFORD, M. J. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA. 2007.
- MOREIRA-PERES, W. A. **Análise da diversidade cariotípica de Characidae da bacia do São Francisco**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2005. Dissertação (Mestrado em Genética). p. 102, 2005.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a “species complex”. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 14, p. 331-357, 1991.
- MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, A. S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae): Karyotypic variability. **Caryologia**. v. 36, p. 235-244, 1983.
- NETO, M. F.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, n. 4, p. 792-796, 2009.

ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: MEDRI, M. E. ; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

PACHECO, A. B.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; JUNIOR-JULIO, H. F.; DIAS, A. L. Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. **Comparative Cytogenetics**. v. 5, n. 3, p. 237-246, 2011.

PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytotypes and Multiple NORs in the *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**. v. 5, p. 109-114, 2001.

PAGANELLI, H. H. **Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus*. (Linnaeus, 1958). Considerações citotaxonômicas e evolutivas**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1990. Dissertação (Mestrado em Genética). p. 108, 1990.

PAZZA, R. ; KAVALCO, S. A. F.; PENTEADO, P. R.; KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. The species complex *Astyanax altiparanae* cuvier (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. **Journal of Biology**, 2008.

PISCOR, D. **Estudos dos cromossomos de Espécies alocadas em *incertae sedis* (Characiformes, Characidae) com uso de diferentes marcadores citogenéticos**. 2012. Dissertação (Mestrado)- Programa de pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular. Rio Claro-SP: Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”. p. 124, 2012.

PORTO, F. E.; MARTINS-SANTOS, I. C. Diversidade Cariotípica em populações de *Astyanax* (Pisces, Characidae) das bacias do rio Paraná e Iguaçu. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002. **Resumos**. CIT 3, 2002.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 729 p, 2003.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae), p. 375-400. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Eds). **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs. p. 603, 1998.

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

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, n. 1, p. 11, 1995.

STRAUSS, R. E.; BOOKSTEIN, F. L. The truss: body form reconstructions in morphometrics. **Systematic Zoologic**, v.31, p.113-135, 1982.

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

TAKAHASHI, E. K.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Estudos citogenéticos em *Astyanax Bimaculatus*. Análise meiótica. **Revista Brasileira de Genética**, 1995. (Suplemento n 18- sem paginação).