

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Dissertação de Mestrado

**Biologia reprodutiva e caracterização molecular de duas espécies  
simpátricas de lambaris e híbridos interespecíficos  
na cabeceira do Rio Grande, MG.**

Ana Paula Barbosa Pinheiro

Belo Horizonte

2017

Ana Paula Barbosa Pinheiro

**Biologia reprodutiva e caracterização molecular de duas espécies  
simpátricas de lambaris e híbridos interespecíficos  
na cabeceira do Rio Grande, MG.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção de título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Rizzo.

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Magno Costa Melo;

Colaborador: Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho (PUC Minas).

Belo Horizonte

Fevereiro de 2017

Este trabalho foi realizado no laboratório de Ictiohistologia (Labictio) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O trabalho foi desenvolvido com o apoio do Laboratório de Genética da Conservação (LGC) da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas).

Suporte financeiro:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Aos meus pais, que são a minha  
maior fonte de inspiração e a  
razão pela qual foi possível  
chegar até aqui.*

*“Por vezes sentimos que aquilo  
que fazemos não é senão uma  
gota de água no mar. Mas o  
mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

## **AGRADECIMENTOS**

Ninguém consegue fazer nada sozinho...sempre precisamos de alguém que nos ensine, que nos inspire, que nos apoie, que nos faça acreditar em nós mesmos ou que simplesmente nos tire da rotina pesada para um momento de descontração. E tudo isso tem grande importância para o sucesso de qualquer trabalho que nos propomos a fazer. Assim, posso dizer com toda certeza que este trabalho teve a contribuição de muitas pessoas, as quais eu jamais poderia deixar de agradecer! Agradeço primeiramente a Deus por abençoar a minha vida, me dando saúde, me ajudando a superar as dificuldades e colocando pessoas e oportunidades maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais, Sandra e Antonio, pelo apoio incondicional, pelas orações constantes e pelo exemplo de vida que representam para mim.

Aos meus irmãos, Daniel e Rafael, pela parceria e carinho.

Ao meu namorado Joubert pelo apoio (moral e prático, pois também “colocou a mão na massa”), paciência e compreensão nas minhas ansiedades e ausências.

À minha orientadora Elizete Rizzo pela oportunidade e confiança que me foram dadas, pelos muitos aprendizados adquiridos ao longo desses anos de convivência, pela paciência e tempo dedicados em me orientar.

Ao meu co-orientador Rafael pelos muitos ensinamentos, pela imensa colaboração e por ter confiado a mim este trabalho.

Ao professor Daniel Carvalho por me receber com boa vontade e disposição em seu laboratório, estabelecendo uma colaboração essencial para o sucesso deste trabalho.

Aos colegas do Labictio: Claudinha, Davidson, Luis, André, Alessandro, Lourenço, Yves, Francisco, Guto, Camila e Moniquinha pelas experiências compartilhadas, disposição em ajudar e por tornarem os dias de trabalho mais leves.

Aos colegas do LGC (Bela, Laís, Cris...) pela receptividade e boa vontade em ajudar, em especial Daniel Teixeira que teve toda paciência, interesse e disposição para me ensinar as técnicas e todas as análises de dados, bem como para responder de imediato minhas inúmeras dúvidas.

À Jeje pela cumplicidade, presença, apoio e cooperação em todos os momentos da minha vida.

À Dani pela torcida e por poder contar sempre.

À Wal pelo apoio moral e ajuda mesmo estando do outro lado do Atlântico.

A todos os demais amigos, familiares e colegas que participaram dessa trajetória e torceram por mim.

## RESUMO

Peixes do gênero *Astyanax* estão amplamente distribuídos pelas bacias hidrográficas brasileiras, mas permanecem carentes de estudos. Espécies simpátricas, que coabitam o mesmo ambiente, podem eventualmente intercruciar e gerar híbridos. A hibridação apresenta importância para ecologia, conservação e evolução das espécies, portanto sua detecção em ambiente natural é relevante. O objetivo desse trabalho foi analisar comparativamente a gametogênese e a biologia reprodutiva de *A. paranae* e *A. fasciatus* da cabeceira do Rio Grande e, verificar por análises moleculares a ocorrência de hibridação natural entre essas espécies, uma vez que um morfótipo intermediário foi amostrado e identificado como *Astyanax* sp. Um total de 491 exemplares (239 *A. paranae*, 213 *A. fasciatus* e 44 *Astyanax* sp.) foram coletados trimestralmente na cabeceira do Rio Grande entre maio de 2014 e abril de 2015. Os peixes foram eutanasiados, dissecados e tiveram dados biométricos e índices biológicos obtidos. Amostras das gônadas foram coletadas para emprego de técnicas morfológicas (microscopia de luz e eletrônica). Fragmentos das nadadeiras caudais foram coletados e fixados em álcool absoluto para extração e amplificação do DNA utilizando *primers* para o gene mitocondrial COI e então os produtos de PCR foram sequenciados bidireccionalmente (DNA *barcoding*). Para todos os peixes coletados, foram determinados estádios de maturação gonadal baseados nas características macro e microscópicas das gônadas e nos valores de IGS. A espécie *A. paranae* apresentou dimorfismo sexual, com fêmeas significativamente maiores ( $9,68 \pm 0,92$  cm) e mais pesadas ( $12,93 \pm 3,89$  g) que machos ( $8,96 \pm 0,66$  cm;  $9,50 \pm 2,06$  g). Exemplares de *Astyanax* sp. apresentaram comprimento e peso significativamente maiores ( $10,85 \pm 1,29$  cm;  $17,37 \pm 7,01$  g) que *A. paranae* e uma tendência de maior peso em relação a *A. fasciatus* (fêmeas:  $15,95 \pm 5,07$  g; machos:  $12,86 \pm 5,96$  g). As maiores médias de IGS foram encontradas nos trimestres agosto-outubro e novembro-janeiro, quando uma maior frequência de peixes maduros foi observada. *Astyanax* sp. não apresentou maturação gonadal e a média de IGS foi a menor entre os animais amostrados ( $0,08 \pm 0,18$ ). A fecundidade absoluta foi estatisticamente similar em *A. paranae* ( $5582,82 \pm 1892,78$  ovócitos) e *A. fasciatus* ( $5668,57 \pm 1816,68$  ovócitos), mas a fecundidade relativa ao peso gonadal foi maior em *A. fasciatus*. Análises histológicas, morfométricas e ultraestruturais mostraram características similares das células germinativas de fêmeas e machos das duas espécies. As gônadas de *Astyanax* sp. apresentaram várias alterações como aumento de tecido intersticial, células germinativas vacuolizadas e em degeneração, organelas alteradas, evidências de apoptose e interrupção da meiose. O DNA *barcoding* confirmou a identificação morfológica de *A. paranae* e *A. fasciatus* e mostrou a existência de haplótipos dessas duas espécies em amostras de *Astyanax* sp. O compartilhamento de haplótipos

mitocondriais de duas espécies distintas por um único morfótipo, as alterações gonadais observadas nesses animais, bem como as evidências de biologia reprodutiva de *A. paranae* e *A. fasciatus* sugerem fortemente que o morfótipo intermediário *Astyanax* sp. é um híbrido natural infértil resultante do cruzamento entre essas duas espécies de lambaris na cabeceira do Rio Grande.

Palavras-chave: hibridação natural, reprodução, lambaris, Rio Grande, DNA *Barcoding*.

## ABSTRACT

Fishes of the genus *Astyanax* are widely distributed in Brazilian watersheds, but they remain poorly studied. Sympatric species, which cohabit the same environment, may eventually interbreed and generate hybrids. Hybridization is important for the ecology, conservation and evolution of species, so its detection in natural environment is relevant. The aim of this work was to compare the gametogenesis and reproductive biology of *A. paranae* and *A. fasciatus* in the headwaters of Grande River and to verify by molecular analysis the occurrence of natural hybridization between these species, since an intermediate morphotype was sampled and identified as *Astyanax* sp. A total of 491 specimens (239 *A. paranae*, 213 *A. fasciatus* and 44 *Astyanax* sp.) was collected quarterly in the headwaters of Grande River between May 2014 and April 2015. The fish were sacrificed, dissected and had their biometric data and biological index obtained. Samples of gonads were collected for morphological techniques (light and electron microscopy). Caudal fins were collected and fixed in absolute ethanol for DNA extraction and amplification using primers for mitochondrial COI gene and then the PCR products were bidirectionally sequenced. For all fish collected, gonadal maturation stages were determined based on the macro and microscopic characteristics of the gonads and on the GSI values. The species *A. paranae* presented sexual dimorphism, with females significantly larger ( $9.68 \pm 0.92$  cm) and heavier ( $12.93 \pm 3.89$  g) than males ( $8.96 \pm 0.66$  cm,  $9.50 \pm 2.06$  g). Specimens of *Astyanax* sp. presented significantly greater length and weight ( $10.85 \pm 1.29$  cm,  $17.37 \pm 7.01$  g) than *A. paranae* and a trend of greater weight when compared to *A. fasciatus* (females:  $15.95 \pm 5.07$  G; males:  $12.86 \pm 5.96$  g). The highest averages of GSI were found in the August-October and November-January quarters, when a higher frequency of mature fish was observed. *Astyanax* sp. did not present gonadal maturation and the mean GSI was the lowest among the sampled animals ( $0.08 \pm 0.18$ ). The batch fecundity was statistically similar in *A. paranae* ( $5582.82 \pm 1892.78$  oocytes) and *A. fasciatus* ( $5668.57 \pm 1816.68$  oocytes), but the relative fecundity (body weight) was higher in *A. fasciatus*. Histological, morphometric and ultrastructural analyses showed similar characteristics of germ cells of females and males of both species. Gonads of *Astyanax* sp. presented several alterations such as increased interstitial tissue, vacuolated and degenerating germ cells, altered organelles, evidence of apoptosis and interrupted meiosis. The DNA *Barcoding* confirmed the morphological identification of *A. paranae* and *A. fasciatus* and showed the existence of haplotypes of these two species in samples of *Astyanax* sp. The sharing of haplotypes from two distinct species by a single morphotype, the gonadal alterations observed in these animals, as well as the evidences of reproductive biology of *A. paranae* and *A. fasciatus* strongly suggest that the intermediate

morphotype *Astyanax* sp. is a natural infertile hybrid resulting from the crossing between these two species of lambaris in the headwaters of Grande River

Keywords: natural hybridization, reproduction, lambaris, Grande River, DNA *Barcoding*.

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

**BOLD** - *Barcode of Life Data System*

C1 – espermátócito primário

C2 – espermátócito secundário

CA – células alteradas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CF – célula folicular

CJ – tecido conjuntivo

COI – gene da enzima Citocromo *c* Oxidase

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CT – comprimento total

CV – células vacuolizadas

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – nucleosídeo trifosfato

E - espermátides

F1 – fêmea em repouso gonadal

F2 – fêmea em maturação inicial

F3 – fêmea em maturação avançada

F4 – fêmea desovada

FA – folículo atrésico

FPO – folículo pós-ovulatório

FV – folículo vitelogênico

GA – espermátogônia primária

GB – espermátogônia secundária

GO - gônias

GR - granulócitos

GV – glóbulos de vitelo

IEF – Instituto Estadual de Florestas

IGS – índice gonadossomático

K – fator de condição de Fulton

Hd – diversidade haplotípica  
HE – hematoxilina-eosina  
M1 – macho em repouso gonadal  
M2 – macho em maturação inicial  
M3 – macho em maturação avançada  
M4 – macho espermiado  
O1 – ovócito perinucleolar inicial  
O2 – ovócito perinucleolar avançado  
O3 – ovócito pré-vitelogênico  
O4 – ovócito vitelogênico  
OG – ovogônia  
PC – peso corporal  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
PG – peso gonadal  
PN – folículo perinucleolar  
PV – folículo pré-vitelogênico  
rDNA – DNA ribossomal  
RE – retículo endoplasmático  
TI – tecido intersticial  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
Z - espermatozoide  
ZR – zona radiata

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Localização geográfica do ponto de amostragem dos lambaris na cabeceira do Rio Grande (Ponto 1), Minas Gerais. (Adaptado de Melo et al., 2016). .....	19
<b>Figura 2:</b> Lambaris coletados na cabeceira do Rio Grande. 1: morfótipo <i>A. fasciatus</i> ; 2: morfótipo <i>A. paranae</i> ; 3: morfótipo <i>Astyanax</i> sp.....	19
<b>Figura 3:</b> Secções histológicas de ovários de <i>A. paranae</i> (A, C e D) e <i>A. fasciatus</i> (B) em diferentes estádios de maturação coradas por hematoxilina-eosina. ....	25
<b>Figura 4:</b> Secções histológicas de testículos de <i>A. paranae</i> (A e D) e <i>A. fasciatus</i> (B e C) em diferentes estádios de maturação coradas por hematoxilina-eosina. ....	26
<b>Figura 5:</b> Frequência relativa sazonal dos estádios de maturação gonadal de fêmeas e machos de <i>A. paranae</i> (A e B) e <i>A. fasciatus</i> (C e D) capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015. ....	27
<b>Figura 6:</b> Distribuição sazonal dos índices gonadossomáticos (IGS) de fêmeas (linha tracejada) e machos (linha contínua) de <i>A. paranae</i> (A) e <i>A. fasciatus</i> (B) capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015. ....	27
<b>Figura 7:</b> Distribuição dos índices gonadossomáticos (IGS) de fêmeas e machos de <i>A. paranae</i> (A e B) e <i>A. fasciatus</i> (C e D) nos diferentes estádios de maturação gonadal. ....	28
<b>Figura 8:</b> Porcentagem de machos (barra preta) e fêmeas (barra branca) de <i>A. paranae</i> (A) e <i>A. fasciatus</i> (B) em atividade reprodutiva (estádios 3 e 4) por classe de comprimento. ....	29
<b>Figura 9:</b> Ultraestrutura de ovários de <i>A. paranae</i> (A e E) e <i>A. fasciatus</i> (B, C e D). ....	32
<b>Figura 10:</b> Ultraestrutura de testículos de <i>A. fasciatus</i> (A, B, C e E) e <i>A. paranae</i> (F e G). ..	33
<b>Figura 11:</b> Secções histológicas de gônadas de <i>Astyanax</i> sp. coradas por hematoxilina-eosina. ....	35
<b>Figura 12:</b> Ultraestrutura gonadal de <i>Astyanax</i> sp. ....	36
<b>Figura 13:</b> Árvore de Neighbor-Joining construída com sequências do gene mitocondrial COI .....	40
<b>Figura 14:</b> Rede de haplótipos construída com sequências do gene mitocondrial COI.....	41
<b>Figura 15:</b> Análise de <i>clustering</i> dos indivíduos analisados utilizando sequências do gene mitocondrial COI.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados físico-químicos da água no ponto de coleta dos peixes nos diferentes trimestres amostrados. ....	22
<b>Tabela 2:</b> Dados biométricos e índices biológicos de fêmeas e machos de <i>A. paranae</i> , <i>A. fasciatus</i> e <i>Astyanax</i> sp. capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015... ..	23
<b>Tabela 3:</b> Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) das células germinativas de fêmeas dos lambaris <i>A. paranae</i> e <i>A. fasciatus</i> capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015. ....	30
<b>Tabela 4:</b> Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) do núcleo das células germinativas de machos dos lambaris <i>A. paranae</i> e <i>A. fasciatus</i> capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015.....	31
<b>Tabela 5:</b> Fecundidade absoluta e relativa ao comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso gonadal (PG) de fêmeas maduras dos lambaris do gênero <i>A. paranae</i> e <i>A. fasciatus</i> da cabeceira do Rio Grande. ....	34
<b>Tabela 6:</b> Distância genética média para o gene COI, em porcentagem, entre os diferentes grupos capturados na cabeceira do Rio Grande e sequências referências das espécies estudadas. ....	39
<b>Tabela 7:</b> Distância genética média dentro dos diferentes grupos capturados na cabeceira do Rio Grande. ....	39
<b>Tabela 8:</b> Diversidade haplotípica ( $H_d$ ) dos diferentes morfótipos capturados na cabeceira do Rio Grande. ....	39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 RIO GRANDE.....	11
1.2 GÊNERO <i>ASTYANAX</i> .....	11
1.3 DNA BARCODING.....	13
1.4 REPRODUÇÃO DE PEIXES .....	14
1.5 HIBRIDAÇÃO .....	14
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
3.1 OBJETIVO GERAL .....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DOS PEIXES .....	18
4.2 MATURAÇÃO GONADAL.....	18
4.3 ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS .....	20
4.4 FECUNDIDADE.....	20
4.5 MORFOMETRIA .....	20
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE MITOCONDRIAL <i>COI</i> ..	21
4.7 ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES .....	22
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	22
5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA .....	22
5.2 ESTRUTURA POPULACIONAL BIOMÉTRICA .....	23
5.3 MATURAÇÃO GONADAL DE <i>A. PARANAE</i> E <i>A. FASCIATUS</i> .....	24
5.4 ULTRAESTRUTURA GONADAL DE <i>A. PARANAE</i> E <i>A. FASCIATUS</i> .....	29
5.5 MORFOMETRIA .....	29
5.6 FECUNDIDADE.....	31
5.7 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS DE <i>ASTYANAX SP.</i> .....	34
5.8 Identificação Molecular (DNA barcoding) .....	37
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 RIO GRANDE

O Rio Grande nasce no município de Bocaina de Minas (MG), na região da Serra da Mantiqueira e apresenta 1.360 km de extensão total (IGAM, 2012), ocupando territórios de Minas Gerais e São Paulo, com área de drenagem de cerca de 143.000 km<sup>2</sup>, sendo 60% em território mineiro (Santos, 2010). Esse rio possui um importante potencial energético e apresenta 12 usinas hidrelétricas instaladas ao longo de sua extensão, assumindo assim um papel estratégico na geração de energia elétrica nacional (Borges & Abjaudi, 2016). Essas hidrelétricas formam um sistema em cascata, perfazendo juntas uma área submersa de 3.511 km<sup>2</sup> (Santos & Formagio, 2000). Dessa forma, a bacia do Rio Grande é responsável por 7,81% da capacidade de geração de energia elétrica instalada no Brasil, com 36,21% da capacidade instalada em São Paulo e 42,86% da capacidade instalada em Minas Gerais (IPT, 2008). Além disso, a bacia do Rio Grande é uma das bacias hidrográficas com maior biodiversidade do estado de Minas Gerais (Drummond et al., 2005). Estima-se que esse estado abrange 15 bacias hidrográficas e abriga aproximadamente 354 espécies de teleósteos (Drummond et al., 2005). Desse total, pelo menos 114 são registradas na bacia do Rio Grande (Paiva et al., 2002; Santos, 2010). Apesar dessa grande biodiversidade, o Rio Grande é o rio mais represado no Brasil e, portanto, sofre grandes impactos ao longo de sua extensão (Andrade & Braga, 2005).

### 1.2 GÊNERO *ASTYANAX*

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por Baird & Girard (1854) e algumas revisões taxonômicas posteriores foram realizadas nesse gênero. Em revisão mais recente, Lima et al. (2003) sugerem a existência de 86 espécies e elevam as subespécies anteriormente propostas à categoria de espécie. Os peixes do gênero *Astyanax* são popularmente conhecidos como lambaris ou piabas e apresentam-se geograficamente distribuídos desde a Argentina até a região de fronteira entre o México e os Estados Unidos (Britski, 1972), sendo ainda, amplamente distribuídos pelas bacias hidrográficas brasileiras (Reis et al., 2003). De maneira geral, os animais desse gênero são pequenos, não-migradores e reconhecidos por possuírem linha lateral completa e discretamente curvada na região anterior; nadadeira adiposa; pré-maxilar não-protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, com cinco dentes na série interna; dentes com cúpidos; altura do corpo aproximadamente três vezes o comprimento padrão (Britski et al., 1988). Apesar de serem animais de pequeno porte, os lambaris têm grande importância ecológica, uma vez que são forrageiros e podem servir de alimento para diversas

espécies piscívoras (Câmara et al., 1991). Os lambaris têm também importância comercial por meio da pesca artesanal e profissional. Em Minas Gérias, o lambari-do-rabo-vermelho *A. fasciatus* (Cuvier, 1819), por exemplo, apresenta relevância na pesca praticada no reservatório de Furnas e constitui uma importante fonte proteica para as populações ribeirinhas (Carvalho et al., 2009). O gênero *Astyanax* apresenta mais de 100 espécies de peixes (Zanata & Camelier, 2009) e pertence à família Characidae, que apesar de possuir as espécies mais bem-sucedidas e diversificadas da região neotropical (Géry, 1977), permanece ainda carente de estudos, especialmente de caráter comparativo e filogenético (Martins, et al., 2012). A identificação das espécies do gênero *Astyanax* tem sido historicamente dificultada pela ampla similaridade morfológica compartilhada pelos animais (Melo, 2001) e este gênero é possivelmente um dos mais confusos taxonomicamente dentre os integrantes da família Characidae. Atualmente, o gênero *Astyanax* está inserido no grupo *Insetae Sedis*, que inclui 88 gêneros da família Characidae com biologia e taxonomia pouco compreendidas, sendo considerado um grupo polifilético (Lima et al., 2003).

A espécie *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) apresenta pequeno porte e normalmente habita pequenos corpos d'água (Britski, 1972). Diferenciações morfológicas notadas dentro dessa espécie culminaram na definição de algumas subespécies como *A. scabripinnis scabripinnis* (Jenyns, 1842), *A. scabripinnis laticeps* (Cope, 1894), *A. scabripinnis longirostris* (Steindachner, 1907), *A. scabripinnis intermedius* (Eigenmann, 1908) e *A. scabripinnis paranae* (Eigenmann, 1927). Moreira-Filho & Bertolo (1991) estudaram sete populações de *A. scabripinnis* nas bacias de três diferentes rios e observaram uma grande diversidade morfológica e cariotípica nessa espécie, sugerindo assim o termo “complexo *scabripinnis*” para designar essas populações e relacionando a diversidade desses peixes ao isolamento de microbacias dos sistemas hidrográficos. *Astyanax scabripinnis paranae* é encontrado comumente na bacia do alto rio Paraná, tipicamente em regiões de cabeceiras (Britski, 1972; Garutti & Britski, 2000; Veregue & Orsi, 2003), onde essa espécie possui numerosas populações isoladas entre si (Garutti & Britski, 2000). Uma vez que existe uma tendência de se elevar as subespécies ao nível de espécie, *A. scabripinnis paranae* passou a ser classificada taxonomicamente como *A. paranae*, assim como sugerido na classificação de Graça & Pavanelli (2007).

Da mesma forma que a espécie *A. scabripinnis*, alguns autores sugerem que *A. fasciatus* (Cuvier, 1819) também representa um complexo de espécies (Garutti & Britski, 2000; Melo, 2001; Pazza et al., 2006; Pazza et al., 2008). Análises citogenéticas indicam que as populações desse complexo que habitam a bacia do alto rio Paraná pertencem a um grupo diverso de peixes

que atualmente integram esse mesmo taxa (Pazza et al., 2006). *Astyanax fasciatus* é comum em vários ecossistemas brasileiros e parece se adaptar bem ao ambiente lântico criado pelo barramento de rios, sendo abundante em reservatórios (Schulz & Martins-Júnior, 2001; Carvalho et al., 2009; Prado et al., 2011). Além disso, devido a sua ampla distribuição, tanto em águas limpas quanto em poluídas, seu pequeno tamanho, hábito alimentar onívoro e uma estratégia reprodutiva com múltiplas desovas durante o ano, *A. fasciatus* tem sido indicado como espécie sentinela para investigações ambientais e ensaios de exposição ambiental em diversos estudos (Schulz & Martins-Júnior, 2001; Alberto et al., 2005; Carrasco-Letelier et al., 2006; Prado et al., 2011; Prado et al., 2014).

### 1.3 DNA BARCODING

Proposto por Hebert et al. (2003), o DNA *barcoding* consiste em um método padronizado de identificação molecular das espécies e em animais baseia-se no uso de um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases na extremidade 5' do gene mitocondrial COI. Este gene codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria que é denominada citocromo oxidase (subunidade I). O nome desse método é uma analogia ao sistema de identificação de produtos por código de barras. Dessa forma, assim como um produto é reconhecido por sua combinação única de código de barras, uma espécie pode ser identificada por sua combinação única e exclusiva de nucleotídeos no fragmento do gene COI (Hebert et al., 2003). Uma característica do DNA mitocondrial é que ele apresenta conteúdo e número de genes relativamente constante entre os animais, o que garante a ortologia, isto é, a descendência comum desses genes, permitindo que seja obtida uma estimativa mais precisa da divergência entre eles (Russo et al., 2004). O gene COI apresenta baixa taxa de recombinação e ausência de íntrons; possui *primers* universais bem estabelecidos para a maioria dos filos animais; exibe melhor potencial de sinal filogenético, com taxas de mutação maiores quando comparadas às taxas de genes como 12S e 16S rDNA e citocromo b (Hebert et al., 2003), características que justificaram a escolha do gene COI para o método de identificação molecular das espécies. Além disso, foi observado que esse gene apresenta uma alta variabilidade interespecífica, enquanto sua variabilidade intraespecífica é reduzida – *barcode gap* (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004). Assim, o método de DNA *barcoding* explora a diversidade entre as sequências de DNA e considera que estas, através de mutações, tendem a se tornar únicas e exclusivas durante a história evolutiva das espécies (Hebert et al., 2003).

#### 1.4 REPRODUÇÃO DE PEIXES

A reprodução consiste em um dos aspectos mais importantes da biologia de uma espécie, uma vez que a manutenção de populações viáveis é diretamente dependente do seu sucesso reprodutivo (Suzuki & Agostinho, 1997). As espécies do gênero *Astyanax* geralmente apresentam longo período reprodutivo com desova parcelada, fertilização externa, ovos de pequeno diâmetro e ausência de cuidado parental, sendo encontradas em ambientes lênticos e lóticos (Sato et al., 2003, Abilhoa et al., 2007; Carvalho et al., 2009). Os índices biológicos relacionados à reprodução podem indicar a maneira pela qual os peixes usam os recursos ambientais e energéticos (Carvalho et al., 2009). Além disso, a análise da morfologia gonadal dos peixes é de grande relevância para o entendimento da biologia, reprodução e história de vida das espécies e estudos comparativos tem sido realizados em teleósteos (Martins et al., 2012). O uso de parâmetros morfológicos da reprodução pode também fornecer subsídios importantes para análises filogenéticas. Neste sentido, a ultraestrutura da micrópila e da superfície de ovos de Characiformes e Siluriformes, por exemplo, seguem um padrão em espécies da mesma família ou subfamília (Rizzo et al., 2002).

#### 1.5 HIBRIDAÇÃO

Devido a sua ampla distribuição pelas bacias hidrográficas brasileiras, algumas espécies de lambaris são simpátricas em determinados locais, isto é, coexistem em um mesmo habitat. A simpatria de espécies pode levar a uma sobreposição de nicho ecológico e/ou reprodutivo e quando há sobreposição da distribuição geográfica, morfologias comparáveis e características ecológicas similares, é esperado que indivíduos de espécies diferentes possam, eventualmente, se inter cruzar (Bassin et al., 2011). Assim, considerando a simpatria, além das semelhanças morfofisiológicas, genéticas e ecológicas encontradas entre os lambaris do gênero *Astyanax*, é possível que a sobreposição de nichos culmine em ocasional fertilização mútua dos gametas entre as espécies, um processo conhecido como hibridação.

A hibridação consiste no cruzamento de grupos ou indivíduos que diferem geneticamente, incluindo cruzamentos entre linhagens de uma mesma espécie – intraespecífica, ou entre indivíduos de espécies distintas - interespecífica (Bartley et al., 2001). Em geral, o processo de hibridação é considerado mais comum em plantas do que em animais (Trigo et al., 2008) e é mais frequente em peixes do que nos demais vertebrados (Hubbs, 1955). Nos peixes de água doce, o processo de hibridação é favorecido por características ecofisiológicas, como fertilização externa, competição por territórios de desova, fracos mecanismos de isolamento reprodutivo, abundância desigual dos parentais, susceptibilidade para contato entre indivíduos

que divergiram recentemente, bem como convivência em ambientes limitados (Hubbs, 1955; Allendorf & Waples, 1996; Scribner et al., 2001).

A hibridação pode ocorrer de maneira natural no ambiente ou ser induzida artificialmente para produzir indivíduos com melhor desempenho (vigor híbrido) para piscicultura do que as espécies parentais (Bartley et al., 2001). Embora seja um evento historicamente considerado raro, a hibridação natural é, na verdade, um evento relativamente comum, principalmente em grupos como peixes e anfíbios (Hubbs, 1955; Zaidan & Fagundes, 2014). A hibridação natural está também relacionada à evolução das espécies, uma vez que a transferência de DNA de uma espécie para o conjunto genômico de outra espécie por retrocruzamentos repetidos entre híbridos e espécies parentais (hibridação introgressiva), pode constituir uma considerável fonte de variabilidade genética nas populações (Arnold & Martin, 2009). Estima-se que o cruzamento interespecífico pode ser realizado por aproximadamente 6 a 10% das espécies animais (Mallet, 2005). Embora a hibridação natural seja aparentemente mais comum em animais do que se imaginava, ainda não está claro como sua ocorrência é difundida e se, de fato, alguns grupos zoológicos ou regiões biogeográficas podem ser mais propensos a promover tal processo (Trigo et al., 2008).

De maneira geral, os híbridos interespecíficos apresentam características morfológicas intermediárias em relação às espécies parentais (Hubbs, 1955) e, historicamente, foram identificados por métodos morfológicos de detecção (Scribner et al., 2001). Entretanto, com o avanço das técnicas moleculares, a identificação de híbridos passou a ser baseada principalmente na análise de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, com base na detecção da variabilidade de regiões do genoma nuclear e mitocondrial (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Nesse contexto, ferramentas como sequenciamento de DNA e genotipagem (microssatélites) assumiram grande importância na detecção de indivíduos híbridos (Prado et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Burcea, et al., 2014; Hashimoto et al., 2014).

A hibridação interespecífica geralmente é facilitada pela proximidade filogenética entre as espécies envolvidas, uma vez que elas tendem a apresentar menor divergência genética e número diploide de cromossomos ou tamanho do genoma parecidos (Bassin, et al., 2011; Peres et al., 2012). Apesar disso, muitas vezes o cruzamento entre diferentes espécies leva à formação de indivíduos contendo cromossomos extras, que não possuem pares homólogos e, portanto, não permitem uma divisão celular meiótica normal no momento da formação dos gametas (Bartley et al., 2001). Durante a meiose, a segregação cromossômica é precedida pela recombinação gênica, na qual fragmentos de DNA são trocados entre pares de cromossomos homólogos, os quais são separados após a primeira divisão meiótica (Whitaker, 1996). Além

de contribuir para a diversidade genética, a recombinação gênica garante que os cromossomos homólogos permaneçam pareados e unidos por meio de locais de *crossing over*, facilitando assim a segregação correta desses cromossomos durante a divisão celular meiótica (Ferguson et al., 2007). Em mamíferos, cromossomos que faltam um local de recombinação podem ser removidos do *pool* meiótico devido à ativação de um ponto de verificação no paquíteno, causando infertilidade; ou podem sofrer segregação anormal dos homólogos na meiose I uma vez que não há *crossing over* para mantê-los juntos na placa metafásica, causando possível aneuploidia (Martin, 2006). Dessa forma, muitos híbridos apresentam alterações gonadais e esterilidade.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando a importância que o Rio Grande representa para o Brasil e os impactos aos quais está submetido, um estudo conduzido na cabeceira desse rio, onde ainda existem melhores condições de conservação ambiental, é de grande importância. Além disso, a utilização das espécies *Astyanax fasciatus* e *Astyanax paranae* como modelos de estudo, as quais são abundantes nesse rio e apresentam importância econômica e ecológica, é de interesse científico, uma vez que o gênero *Astyanax* e a família Characidae permanecem ainda carente de estudos, apresentando problemas taxonômicos e filogenéticos. Assim, o estudo das características morfológicas reprodutivas pode permitir a comparação da história de vida dessas espécies e o conhecimento da biologia reprodutiva pode fornecer informações importantes para a sustentabilidade das populações a longo prazo em seu habitat. Assim, em um cenário no qual o número de espécies ameaçadas de extinção tende a aumentar, o estudo da biologia reprodutiva das espécies de peixes nativas é de grande relevância para conservação da ictiofauna e para o equilíbrio entre o meio ambiente e a economia.

Haja vista os problemas taxonômicos e filogenéticos do gênero *Astyanax* e a dificuldade de identificação das suas espécies, a utilização de métodos morfológicos, reprodutivos e moleculares em conjunto pode levar a obtenção de dados mais robustos e confiáveis sobre as espécies. Dessa forma, a utilização do método de DNA *barcoding* para caracterização molecular das espécies torna-se interessante nesse estudo.

Dados preliminares indicaram que as espécies *A. paranae* e *A. fasciatus* apresentam simpatria (coexistência) na cabeceira do Rio Grande e sobreposição de período reprodutivo, com possibilidade de hibridação. Poucos casos de hibridação natural entre animais foram descritos em detalhe, assim, a constatação desses eventos e o estudo de mecanismos celulares

e moleculares envolvidos nesse processo são de grande interesse científico para sua melhor compreensão na natureza. Historicamente, os estudos de hibridação baseavam-se exclusivamente em caracteres anatômicos, como aqueles utilizados na taxonomia convencional. Entretanto, com o avanço das técnicas moleculares, o DNA passou a ser a principal ferramenta desse tipo de estudo. Dessa forma, um trabalho utilizando morfologia gonadal, biologia reprodutiva e dados moleculares em conjunto como ferramentas para detecção e descrição de eventos de hibridação natural constitui uma novidade científica relevante.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar comparativamente a gametogênese e a biologia reprodutiva dos lambaris *A. fasciatus* e *A. paranae* da cabeceira do Rio Grande e verificar por meio de análises morfológicas e moleculares a ocorrência de hibridação natural entre essas espécies.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a estrutura populacional biométrica, os índices biológicos e os parâmetros reprodutivos das duas espécies de lambaris;
- Caracterizar os estádios de maturação gonadal e determinar a frequência desses estádios por período de amostragem;
- Determinar o diâmetro das células germinativas das espécies através de morfometria;
- Avaliar a fecundidade em fêmeas maduras no pico da atividade reprodutiva;
- Analisar as características ultraestruturais das células germinativas de ambas espécies através de microscopia eletrônica de transmissão;
- Sequenciar o gene mitocondrial COI dos peixes;
- Avaliar os níveis de divergência e diversidade genéticas existentes entre as espécies de lambaris;
- Inferir rede de haplótipos das espécies;
- Identificar e descrever a ocorrência de hibridação interespecífica natural entre as espécies simpátricas de lambaris.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DOS PEIXES

A área de estudo está localizada na Cachoeira do Rio Grande (22°13'7.04"S 44°32'23.14"O), próximo à nascente deste rio, no município de Bocaina de Minas, sul do estado de Minas Gerais (**Figura 1**). A região não possui atividade industrial, a área de estudo apresenta pouca influência antrópica e a mata ciliar é preservada. Exemplares de *A. fasciatus*, *A. paranae* e *Astyanax* sp. foram capturados trimestralmente entre maio de 2014 e abril de 2015 com redes de emalhar (0,8, 1,3 e 1,5 cm entre nós opostos) expostas por 12 horas na superfície da água. Durante a captura dos peixes, os parâmetros físico-químicos da água foram obtidos utilizando uma sonda multiparâmetro Horiba U-51.

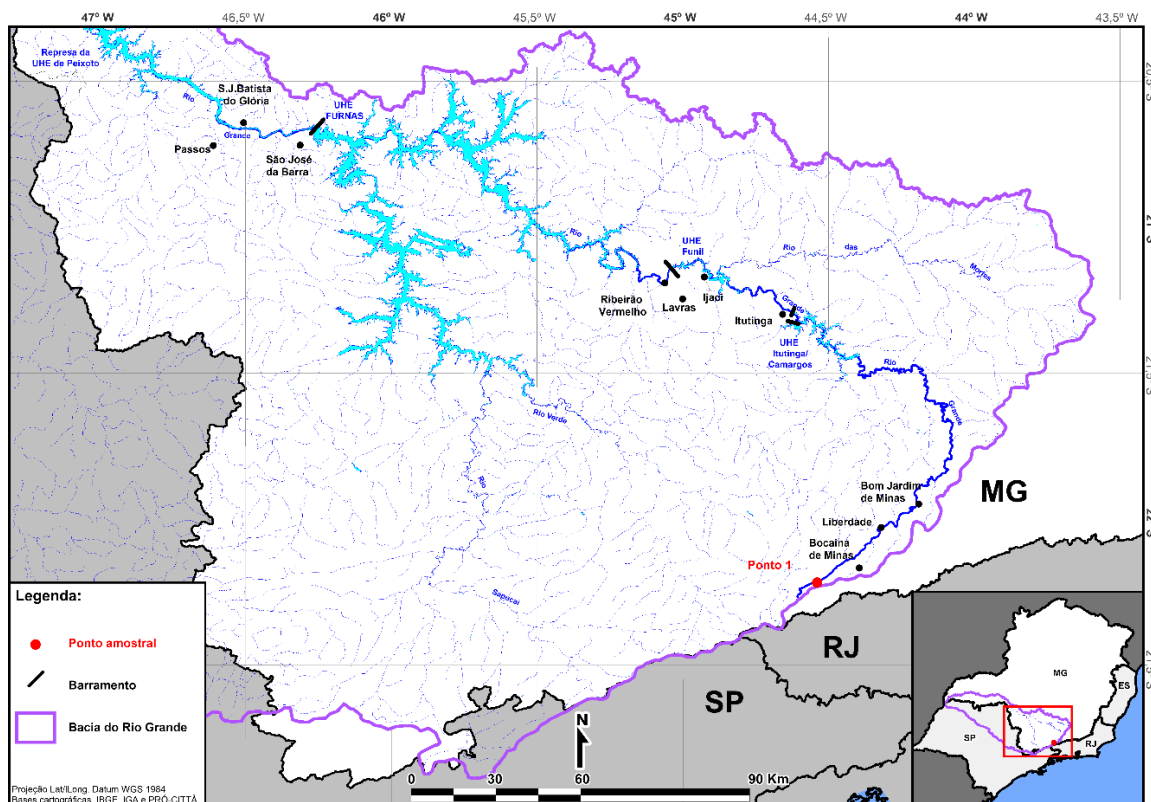
Em campo, os peixes foram eutanasiados por meio de secção transversal da medula cervical e em seguida foram obtidos os dados biométricos de cada peixe. Após dissecação, amostras seriais das gônadas dos animais foram coletadas para o emprego de diversas técnicas morfológicas. Para análise genética, fragmentos das nadadeiras caudais foram coletados, fixados em álcool absoluto e posteriormente armazenados em congelador. Todos os procedimentos indicados seguiram os princípios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo IEF – licença de pesca n°. 153/2014 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFMG) – protocolo 92/2010.

Um total de 491 exemplares de lambaris foram coletados na cabeceira do Rio Grande. Os animais apresentaram três morfótipos diferentes, que foram identificados de acordo com Graça & Pavanelli (2007): 1. *A. fasciatus* (n=209), 2. *A. paranae* (n=238) e 3. *Astyanax* sp. (n=44) (**Figura 2**). Exemplares de *A. paranae* (MZUEL11274) e *A. fasciatus* (MZUEL11275) foram identificados e tombados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL). Após a dissecação dos peixes, observou-se que exemplares de *Astyanax* sp., embora com tamanho compatível com a idade reprodutiva, não apresentaram gônadas desenvolvidas. Dessa forma, não foi possível separar esses peixes em grupos de machos e fêmeas.

### 4.2 MATURAÇÃO GONADAL

Em campo foram obtidos comprimento total (CT) dos peixes em centímetros e o peso corporal (PC) e peso das gônadas (PG) em gramas. Estes dados biométricos foram utilizados para calcular os índices biológicos: gonadossomático ( $IGS = PG \times 100/PC$ ) e fator de condição de Fulton ( $K = PC \times 100/CT^3$ ).

Para análise histológica, amostras da região média das gônadas de cada peixe foram fixadas em líquido de Bouin, incluídas em parafina, seccionadas com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e coradas por hematoxilina-eosina (HE). Os estádios de maturação gonadal foram determinados baseando-se nas características macroscópicas e microscópicas das gônadas e nas variações do IGS.



**Figura 1:** Localização geográfica do ponto de amostragem dos lambaris na cabeceira do Rio Grande (Ponto 1), Minas Gerais. (Adaptado de Melo et al., 2016).



**Figura 2:** Lambaris coletados na cabeceira do Rio Grande. 1: morfótipo *A. fasciatus*; 2: morfótipo *A. paranae*; 3: morfótipo *Astyanax* sp.

#### 4.3 ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS

Pequenos fragmentos de gônadas foram fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) por até 24 horas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3 e mantidas nessa solução a 4°C até o momento do processamento para a microscopia eletrônica de transmissão.

No Centro de Microscopia da UFMG as amostras foram lavadas em tampão fosfato e posteriormente submetidas à fixação secundária em tetróxido de ósmio 2% por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem com água, as amostras foram incubadas em solução de sacarose com acetato de uranila 4% overnight. Em seguida, foram desidratadas em álcool e incluídas em resina Epon. Cortes semifinos (cerca de 200 nm de espessura) foram corados com azul de toluidina e utilizados para delimitação da área de interesse para realização de cortes ultrafinos (60 nm). As secções ultrafinas foram posteriormente contrastadas com citrato de chumbo e, finalmente, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão a 120 kV.

#### 4.4 FECUNDIDADE

Para análise de fecundidade, fragmentos de ovários maduros coletados em janeiro de 2015 (pico de maturação gonadal) foram fixados em solução de Gilson e foram periodicamente agitados para completa dissociação dos ovócitos e posteriormente mantidos em álcool 70%. Os ovócitos vitelogênicos dissociados foram separados dos outros ovócitos e contados sob um microscópio estereoscópico. O número de ovócitos por grama de ovário foi determinado e utilizado para calcular a fecundidade absoluta baseada no peso total do ovário. As fecundidades relativas foram estimadas a partir do número de ovócitos vitelogênicos nos ovários por unidade de comprimento total, peso corporal e peso gonadal.

#### 4.5 MORFOMETRIA

O diâmetro das células germinativas de fêmeas em maturação avançada de cada espécie capturadas no pico da estação reprodutiva foi mensurado por meio da utilização do software de análise de imagens Axiovision SE64 acoplado ao fotomicroscópio Axioplan 2 Zeiss. Foram medidas as maiores células de cada tipo (ovócitos perinucleolares iniciais e avançados, pré-vitelogênicos e vitelogênicos) de 05 peixes de cada espécie, utilizando objetiva de 10x e

totalizando 50 medidas de cada tipo celular. Usando o mesmo *software* de análise de imagens, foram medidos os diâmetros nucleares das células germinativas de 05 machos em maturação avançada de cada espécie. Foram medidas 10 células de cada tipo por peixe amostrado, perfazendo um total de 50 núcleos de cada tipo celular da linhagem espermatogênica (espermatogônica, espermátocitos primários e secundários, espermátides e espermatozoides), utilizando a objetiva de 100x.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE MITOCONDRIAL COI

O DNA foi obtido a partir de amostras de tecido da nadadeira caudal conservadas em álcool absoluto de 74 exemplares de peixes (26 *A. paranae*, 25 *A. fasciatus* e 23 *Astyanax* sp.). A extração foi realizada através do método de extração salina, adaptada de Aljanabi & Martinez (1997), com a utilização de proteinase K para digestão das amostras. Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para confirmação da extração de DNA.

As sequências foram amplificadas utilizando um coquetel de *primers* com cauda M13 para o gene COI (Ivanova et al., 2007). A amplificação foi feita por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador (Veriti® 96 - Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) usando 10,0 µl de solução composta de 7,0 µl de água ultrapura (milli-Q), 0,3 µl de dNTP (10mM), 1,0 µl de tampão contendo MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de *primer* M13 (10 µM), 0,3 µl de Taq DNA polimerase (5U/ µl) e 1,0 µl de DNA molde.

As condições de PCR utilizadas para amplificação do gene COI foram: desnaturação a 95 °C (2 min), posteriormente 35 ciclos de desnaturação a 94 °C (30 s), anelamento de *primers* a 56 °C (30 s), extensão a 72 °C (1 min) e extensão final a 72 °C (10 min). A confirmação da amplificação das sequências foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

O produto de PCR obtido foi sequenciado bidirecionalmente pelo método de Sanger usando um kit comercial de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1. A solução teve um volume final de 10 µl contendo 1 µl de DNA (produto amplificado), 1 µl de *primer* (10µM), 0,5 µl de solução pré-mix (BigDye kit), 1,5 µl de tampão 5X (BigDye kit) e 6,0 µl de água ultrapura autoclavada. A amplificação foi executada em um termociclador com as seguintes condições: 30 ciclos de desnaturação a 96 °C (30 s), anelamento a 60 °C (3 min) e extensão a 60 °C (3 min). As sequências foram obtidas no sequenciador automático de DNA ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências referências dos bancos de dados BOLD Systems ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) e GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### 4.7 ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES

Para a construção das sequências consenso (*contigs*) foi utilizado o *software* DNABaser 4.16. O alinhamento dos *contigs* foi feito no MEGA 6.0, seguido por conferência manual e edição. DnaSP 5.10.1 foi utilizado para estimar a diversidade haplotípica e PopART 1.7 foi usado para construir a rede de haplótipos. O *software* BAPS 6.0 foi utilizado para as análises de *clustering*.

#### 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os *softwares* BioEstat e GraphPad Prisma 5 foram usados na confecção de gráficos e análises estatísticas. O teste de normalidade Lilliefors foi realizado para definir os dados paramétricos e não paramétricos para a posterior escolha do teste estatístico mais adequado para cada análise comparativa (Teste t, Mann Whitney, ANOVA ou Kruskal-Wallis).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Os dados físico-químicos da água no ponto de coleta dos peixes não apresentaram variação entre os períodos de amostragem em relação à condutividade elétrica e a quantidade de sólidos dissolvidos totais (**Tabela 1**). A temperatura foi mais elevada no trimestre referente aos meses de novembro a janeiro, quando menores médias de pH e oxigênio dissolvido foram observadas.

**Tabela 1:** Dados físico-químicos da água no ponto de coleta dos peixes nos diferentes trimestres amostrados.

	Maio-Julho	Agosto-Outubro	Novembro-Janeiro	Fevereiro-Abril
Temperatura (°C)	13,54 ± 1,34	11,26 ± 0,01	16,18 ± 0,01	14,02 ± 0,01
pH	6,57 ± 0,15	6,07 ± 0,05	5,98 ± 0,02	6,543 ± 0,02
Oxigênio dissolvido (mg/L)	13,28 ± 0,66	12,64 ± 0,08	11,19 ± 0,12	12,75 ± 0,46
Condutividade elétrica (µS/cm)	12,00 ± 0,01	12,00 ± 0,01	12,33 ± 0,58	12,00 ± 0,01
Sólidos dissolvidos totais (mg/L)	8,00 ± 0,01	8,00 ± 0,01	8,00 ± 0,01	8,00 ± 0,01

Valores são expressos como média ± DP.

## 5.2 ESTRUTURA POPULACIONAL BIOMÉTRICA

As análises de comprimento e peso dos peixes mostraram a presença de dimorfismo sexual em tamanho na espécie *A. paranae*, com fêmeas estatisticamente maiores e mais pesadas que machos (**Tabela 2**). Em *A. fasciatus*, não houve uma diferença significativa (dimorfismo) entre fêmeas e machos. Comparando as espécies, exemplares de *A. fasciatus* foram significativamente maiores e mais pesados que exemplares de *A. paranae*. As médias de comprimento total e peso corporal do morfótipo *Astyanax* sp. foram significativamente maiores que *A. paranae* e houve uma tendência de maior peso em relação a espécie *A. fasciatus*. Em geral, foram observadas maiores médias de índice gonadossomático (IGS) em fêmeas quando comparadas com machos e maiores médias na espécie *A. paranae*, quando comparada a *A. fasciatus* e *Astyanax* sp. Exemplares de *Astyanax* sp. apresentaram a menor média de IGS entre os exemplares comparados. O fator de condição de Fulton (K) foi estatisticamente maior na espécie *A. paranae* em comparação com *A. fasciatus* e a média observada para *Astyanax* sp. foi similar às médias de *A. paranae*.

**Tabela 2:** Dados biométricos e índices biológicos de fêmeas e machos de *A. paranae*, *A. fasciatus* e *Astyanax* sp. capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015.

	<i>A. paranae</i>		<i>A. fasciatus</i>		<i>Astyanax</i> sp.
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	
<b>CT (cm)</b>	9,68 ± 0,92 <sup>a</sup>	8,96 ± 0,66 <sup>b</sup>	10,92 ± 1,05 <sup>c</sup>	10,53 ± 1,66 <sup>ac</sup>	10,85 ± 1,29 <sup>c</sup>
<b>PC (g)</b>	12,93 ± 3,89 <sup>a</sup>	9,50 ± 2,06 <sup>b</sup>	15,95 ± 5,07 <sup>bc</sup>	12,86 ± 5,96 <sup>ab</sup>	17,37 ± 7,01 <sup>c</sup>
<b>IGS</b>	6,93 ± 7,21 <sup>a</sup>	2,17 ± 2,88 <sup>b</sup>	2,73 ± 4,55 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,45 <sup>bc</sup>	0,08 ± 0,18 <sup>c</sup>
<b>K</b>	1,41 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,07 <sup>ac</sup>	1,20 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,15 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,11 <sup>c</sup>

Valores são expressos como média ± DP. Em cada linha, valores seguidos por letras diferentes possuem diferenças significativas ( $p < 0.05$  - Kruskal-Wallis).

A relação peso-comprimento foi estimada separadamente para os três grupos amostrados nesse estudo (*A. paranae*, *A. fasciatus* e *Astyanax* sp.) por meio da equação  $PC = a \times CT^b$ , onde  $a$  é a intersecção e  $b$  o coeficiente angular, que se relaciona à forma de crescimento do animal. O parâmetro  $b$  foi 2,98 para *A. paranae* e 3,07 para *A. fasciatus* e *Astyanax* sp. Dessa forma, a relação peso-comprimento mostrou crescimento aproximadamente isométrico para os exemplares, com valores de  $b$  similares entre os grupos amostrados e estatisticamente iguais a 3,0 (teste G,  $p > 0,05$ ). O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) revelou alta correlação entre os

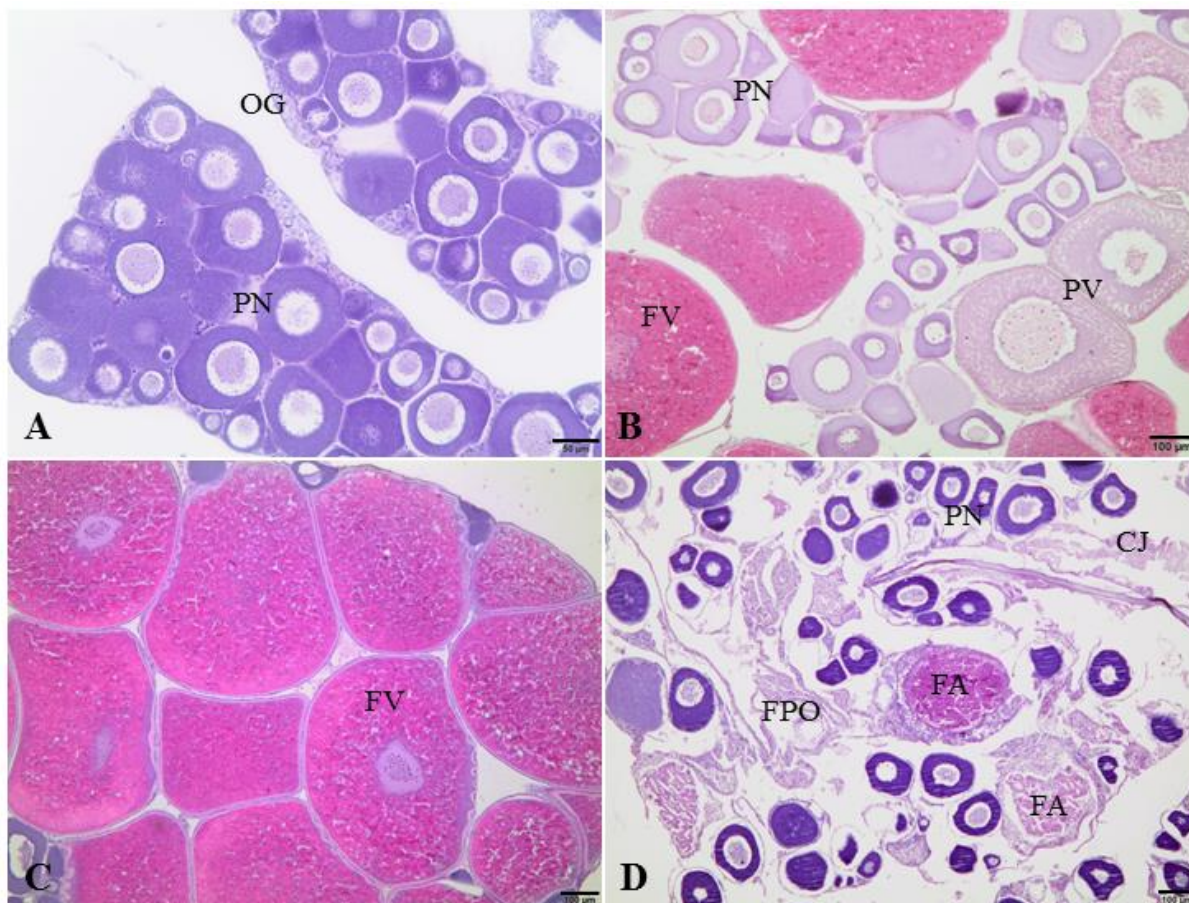
parâmetros CT e PC ( $r^2 = 0,85$  para *A. paranae*,  $0,89$  para *A. fasciatus* e  $0,95$  para *Astyanax* sp.).

### 5.3 MATURAÇÃO GONADAL DE *A. PARANAE* E *A. FASCIATUS*

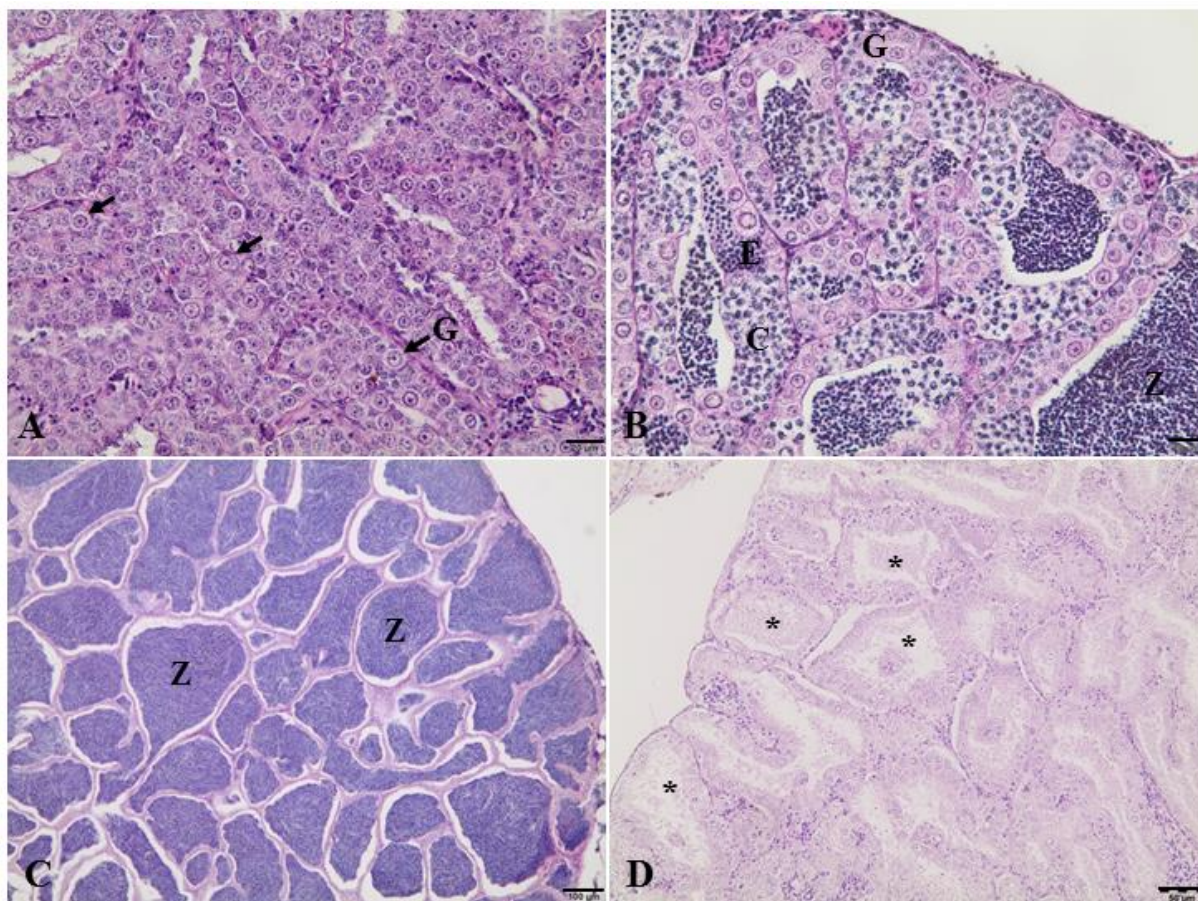
Baseado nas características macro e microscópicas das gônadas e nos valores do índice gonadossomático (IGS), foram definidos os seguintes estádios de maturação gonadal para fêmeas e machos: repouso (1), maturação inicial (2), maturação avançada/maduro (3) e desovado/espermiado (4) (**Figuras 3 e 4**). A frequência relativa dos estádios de maturação gonadal mostrou uma maior quantidade de animais maduros (F3 e M3) nos trimestres agosto-outubro e novembro-janeiro (**Figura 5**), quando, em geral, as maiores médias de IGS para fêmeas também foram observadas (**Figura 6**). Assim, de maneira geral, os lambaris da cabeceira do Rio Grande apresentaram período reprodutivo prolongado com maior atividade reprodutiva de agosto a janeiro.

Comparando as espécies, o estágio 1 (repouso) foi mais frequente em *A. fasciatus* enquanto o estágio 3 (maduro) foi mais abundante em *A. paranae* (**Figura 5**). *A. paranae* apresentou fêmeas desovadas (estádio 4) em todos os períodos de amostragem, mas em geral esse estágio foi pouco frequente para ambas as espécies.

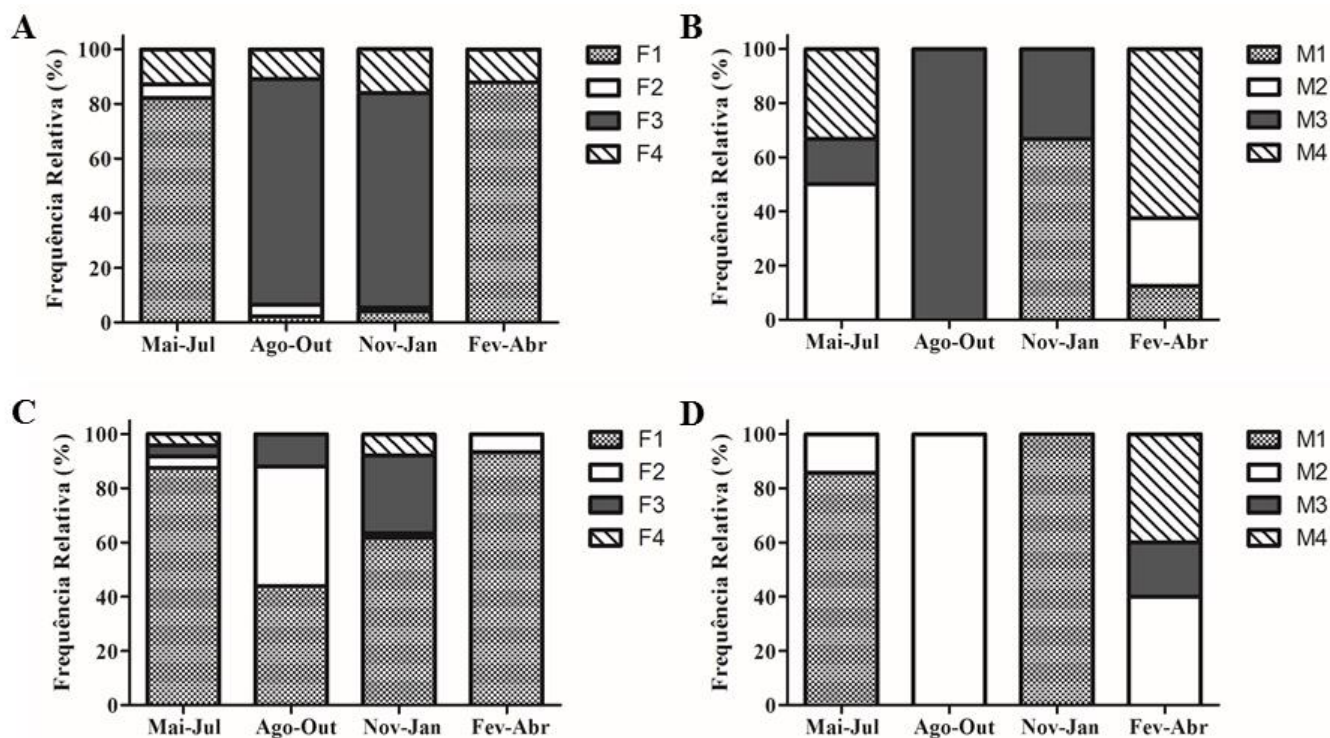
Os valores de IGS variaram de acordo com o estágio de maturação gonadal e as maiores médias desse índice foram observadas em fêmeas e machos maduros (F3 e M3) (**Figura 7**). De maneira geral, as médias de IGS da espécie *A. paranae* foram superiores às médias de *A. fasciatus*, principalmente em relação aos machos.



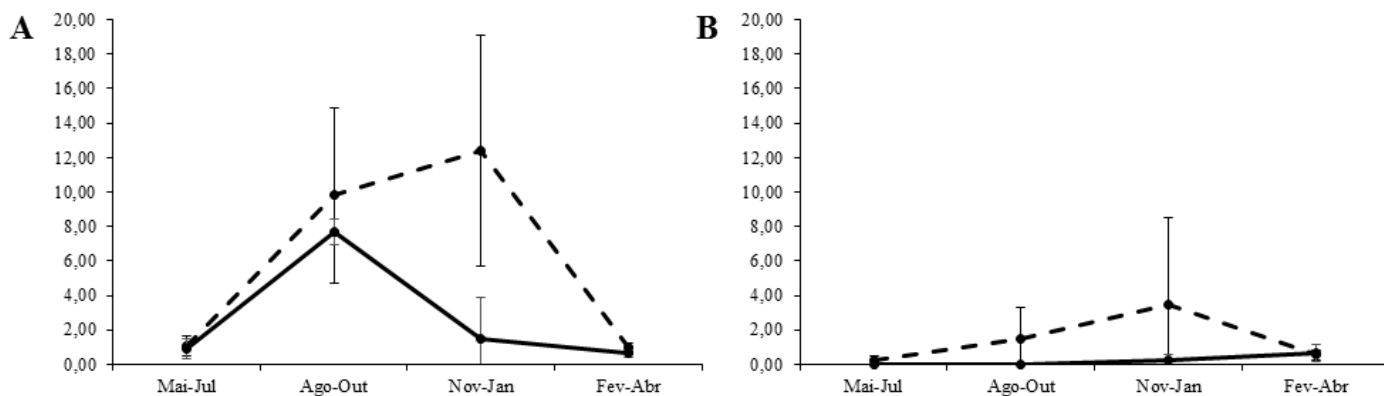
**Figura 3:** Secções histológicas de ovários de *A. paranae* (A, C e D) e *A. fasciatus* (B) em diferentes estádios de maturação coradas por hematoxilina-eosina. A: Repouso (F1), com lamelas ovulíferas contendo folículos perinucleolares (PN) e ninhos de ovogônias (OG). B: Maturação inicial (F2), com presença de folículos perinucleolares (PN), pré-vitelogênicos (com vesículas corticais) e vitelogênicos (FV). C: Maturação avançada (F3), com predominância de folículos vitelogênicos (FV). D: Desovado (F4), com tecido conjuntivo evidente (CJ) contendo folículos atrésicos (FA) e folículos pós-ovulatórios em regressão (FPO). Barras: 50  $\mu\text{m}$  (A); 100  $\mu\text{m}$  (B, C e D).



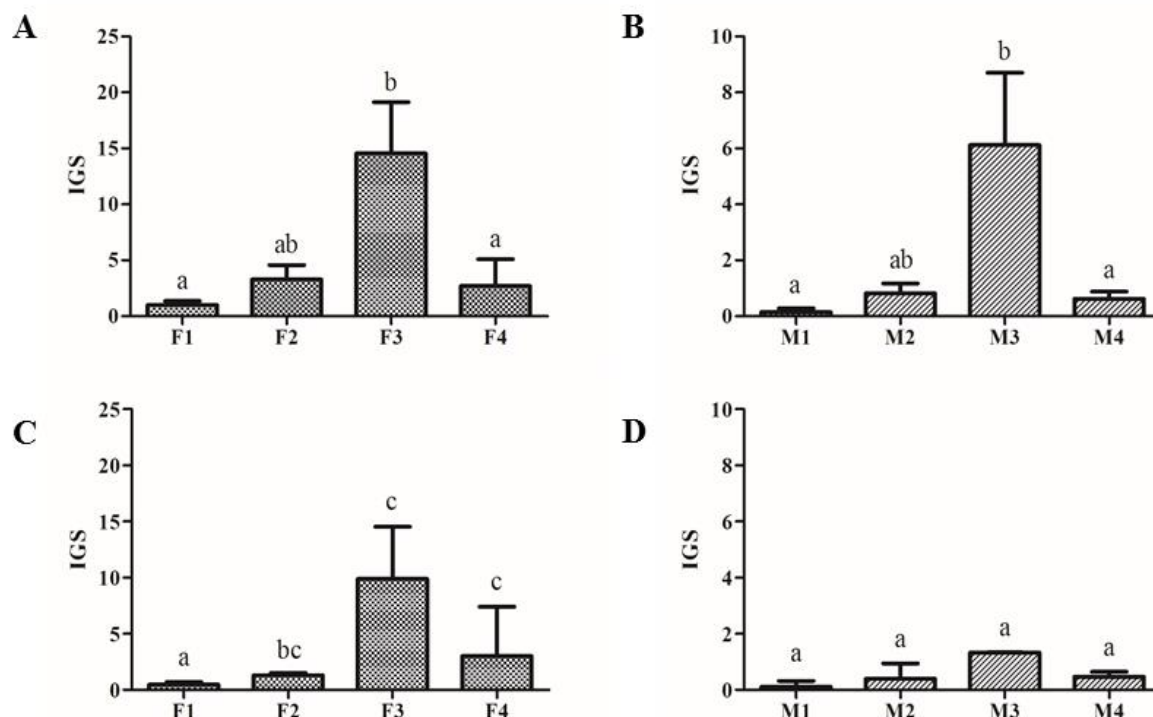
**Figura 4:** Secções histológicas de testículos de *A. paranae* (A e D) e *A. fasciatus* (B e C) em diferentes estádios de maturação coradas por hematoxilina-eosina. A: Repouso (M1), com túbulos seminíferos apresentando lumes fechados e numerosas espermatogônias (G - setas). B: Maturação inicial (M2), com presença cistos de todas as células da linhagem espermatogênica incluindo espermatogônias (G), espermatócitos (C), espermatídes (E), e espermatozoides (Z). C: Maturação avançada (M3), com lumes repletos de espermatozoides. D: Espermiado (M4), com túbulos seminíferos vazios ou contendo espermatozoides residuais (\*). Barras: 20  $\mu\text{m}$  (A e B); 100  $\mu\text{m}$  (C); 50  $\mu\text{m}$  (D).



**Figura 5:** Frequência relativa sazonal dos estádios de maturação gonadal de fêmeas e machos de *A. paranae* (A e B) e *A. fasciatus* (C e D) capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015.



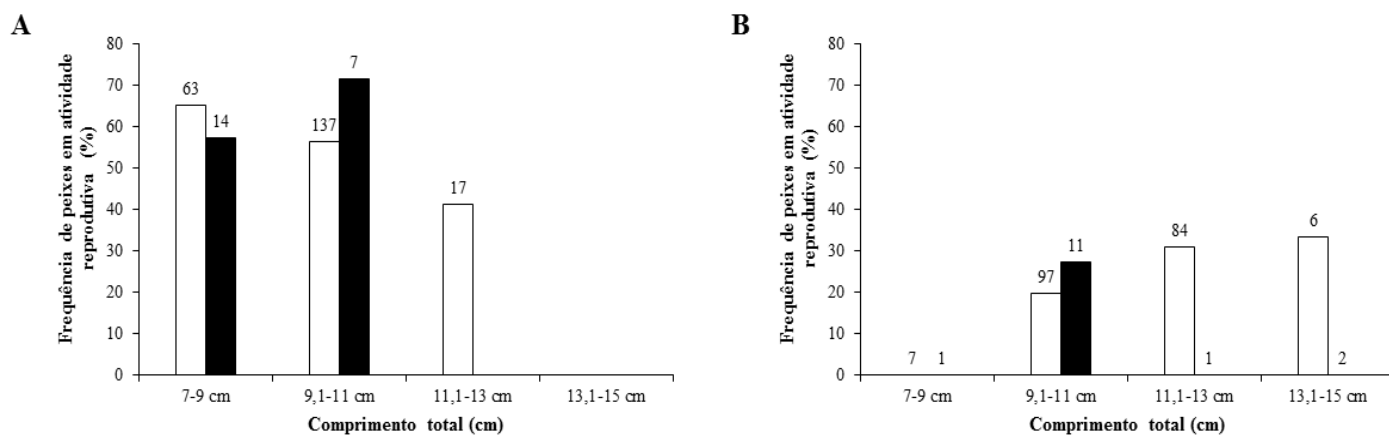
**Figura 6:** Distribuição sazonal dos índices gonadosomáticos (IGS) de fêmeas (linha tracejada) e machos (linha contínua) de *A. paranae* (A) e *A. fasciatus* (B) capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015. Os valores representam média ± DP.



**Figura 7:** Distribuição dos índices gonadosomáticos (IGS) de fêmeas e machos de *A. paranae* (A e B) e *A. fasciatus* (C e D) nos diferentes estádios de maturação gonadal. Os valores representam média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os estádios de maturação gonadal de uma espécie.

O menor peixe em atividade reprodutiva (estádios 3 e 4) observado nesse estudo foi uma fêmea pertencente à espécie *A. paranae*, com 7,6 cm de comprimento total. Em relação a *A. fasciatus*, o menor exemplar sexualmente maduro foi um macho com 9,4 cm. Na espécie *A. paranae*, 65,08% das fêmeas e 57,15 % dos machos com comprimento de 7-9 cm estavam reproduzindo. Uma alta frequência de animais em atividade reprodutiva também foi observada na classe de tamanho de 9,1-11 cm. Comparando essas duas classes, observou-se uma maior quantidade de fêmeas reproduzindo com 9,1 a 11 cm de comprimento, enquanto uma maior quantidade de machos reproduzindo foi observada na classe de 7-9 cm de comprimento, refletindo o dimorfismo sexual nessa espécie (**Figura 8A**). Na espécie *A. fasciatus* menos de 35% dos animais em todas as classes de tamanho estavam em atividade reprodutiva. Essa espécie apresentou cerca de 20% das fêmeas e 25% dos machos com 9-11 cm de comprimento reproduzindo. Além disso, foi observada uma frequência de cerca de 30% de fêmeas com 11,1-13 cm em atividade reprodutiva (**Figura 8B**). Em conjunto esses dados sugerem que a primeira maturação gonadal em *A. paranae* ocorre quando os animais atingem entre 7 e 9 cm de

comprimento total, enquanto na espécie *A. fasciatus* a primeira maturação ocorre entre 9 e 11 cm de comprimento.



**Figura 8:** Porcentagem de machos (barra preta) e fêmeas (barra branca) de *A. paranae* (A) e *A. fasciatus* (B) em atividade reprodutiva (estádios 3 e 4) por classe de comprimento.

#### 5.4 ULTRAESTRUTURA GONADAL DE *A. PARANAE* E *A. FASCIATUS*

A ultraestrutura de ovários mostrou ovogônias com núcleo grande e nucléolo evidente (**Figura 9A**), zona radiata espessa contendo poros canais (**Figura 9B, C e D**) e células foliculares com núcleo alongado e retículo endoplasmático abundante (**Figura 9B e E**). Testículos apresentaram espermatogônias com núcleo grande e nucléolo evidente (**Figura 10A**), cistos de espermatócitos em diferentes fases da meiose (**Figura 10B e C**), alguns em processo de apoptose (**Figura 10C**). Espermátides e espermatozoides também foram observados (**Figura 10D, E e F**). Espermatozoides apresentaram cabeça constituída por núcleo condensado, peça intermediária contendo várias mitocôndrias e flagelo contendo 2 microtúbulos centrais circundados por 9 pares de microtúbulos dispostos simetricamente (padrão 9 + 2) (**Figura 10F e G**).

#### 5.5 MORFOMETRIA

As análises morfométricas mostraram padrões semelhantes para as células germinativas de ambas as espécies de lambaris. Embora diferenças significativas tenham sido observadas em algumas células ao longo da gametogênese de fêmeas e machos, os gametas formados ao final desse processo não apresentaram diferenças significativas entre as espécies estudadas (**Tabelas 3 e 4**). De maneira geral, células germinativas da espécie *A. fasciatus* apresentaram maiores médias de diâmetro quando comparadas a *A. paranae*. Ao longo da oogênese houve aumento

de mais de 500  $\mu\text{m}$  no diâmetro das células germinativas de ambas as espécies, com ovócitos perinucleolares e pré-vitelogênicos significativamente maiores na espécie *A. fasciatus*. Além disso, todas as células da linhagem germinativa feminina foram estatisticamente distintas entre si numa mesma espécie. Ao longo da espermatogênese, as células germinativas apresentaram grande condensação dos núcleos, diminuindo seus diâmetros em mais de 4  $\mu\text{m}$  em ambas as espécies. Espermatócitos primários e secundários foram estatisticamente maiores na espécie *A. fasciatus*, enquanto as espermatídes foram significativamente maiores na espécie *A. paranae*. De maneira geral, em uma mesma espécie, as espermatogônias primárias e secundárias não apresentaram diferenças significativas, assim como as comparações entre espermatogônias secundárias e espermatócitos primários também não apresentaram. Além disso, espermatídes e espermatozoides não foram estatisticamente diferentes em uma mesma espécie.

**Tabela 3:** Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) das células germinativas de fêmeas dos lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus* capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015.

	<i>A. paranae</i>	<i>A. fasciatus</i>
<b>OG</b>	14,76 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>	15,16 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>
<b>O1</b>	133,60 $\pm$ 11,92 <sup>b</sup>	146,70 $\pm$ 18,66 <sup>*b</sup>
<b>O2</b>	207,90 $\pm$ 28,42 <sup>c</sup>	229,90 $\pm$ 36,84 <sup>*c</sup>
<b>O3</b>	324,10 $\pm$ 34,65 <sup>d</sup>	341,90 $\pm$ 32,69 <sup>*d</sup>
<b>O4</b>	609,20 $\pm$ 37,32 <sup>e</sup>	598,80 $\pm$ 45,54 <sup>e</sup>

Valores são expressos como média  $\pm$  DP. Em cada linha, asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies ( $p < 0,05$  - Mann-Whitney). Em uma coluna, letras diferentes indicam diferenças significativas entre células da mesma espécie ( $p < 0,05$  - Kruskal-Wallis). OG: ovogônia; O1: ovócito perinucleolar inicial; O2: ovócito perinucleolar avançado; O3: ovócito pré-vitelogênico; O4: ovócito vitelogênico.

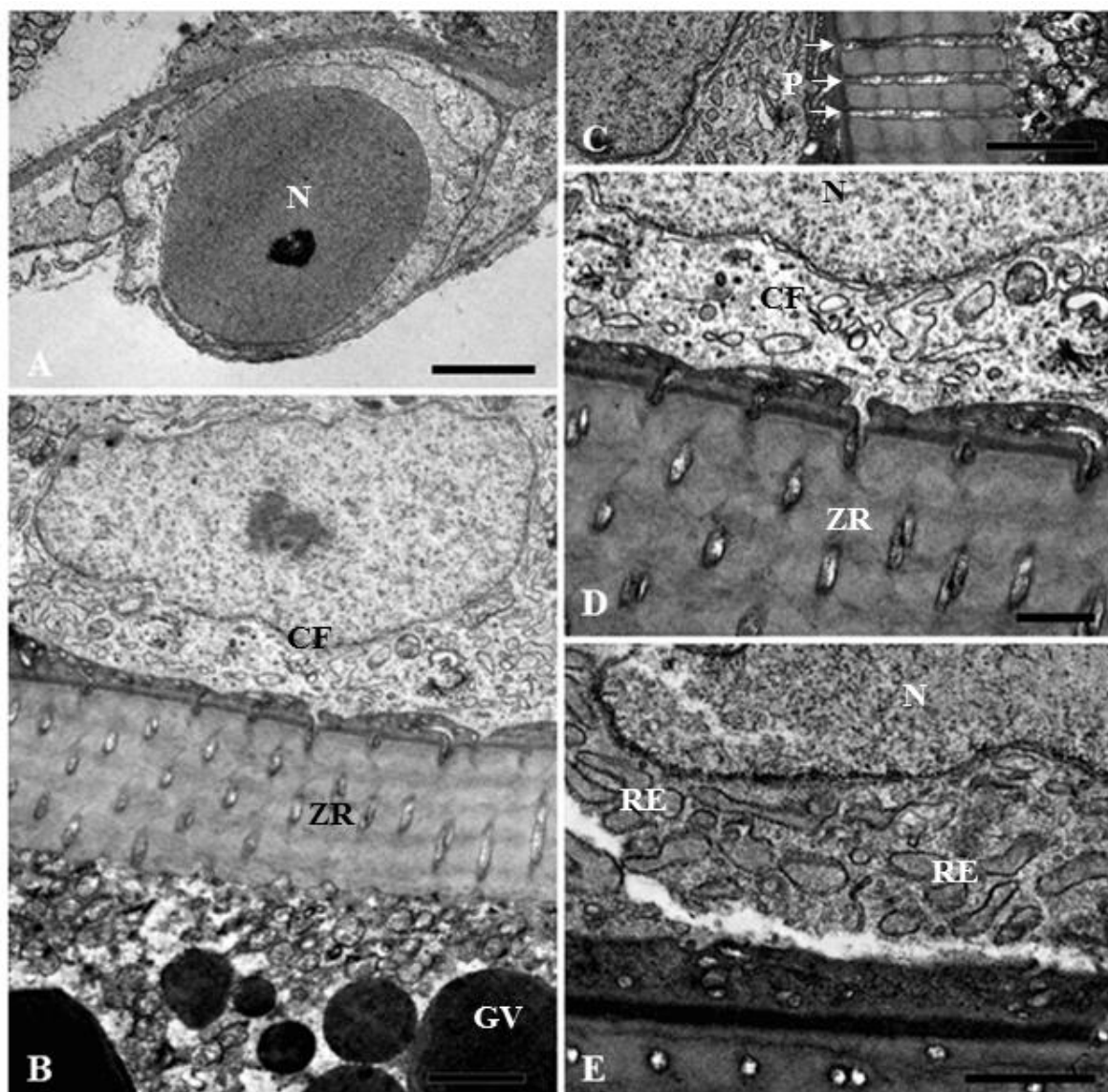
**Tabela 4:** Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) do núcleo das células germinativas de machos dos lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus* capturados na cabeceira do Rio Grande entre 2014 e 2015.

	<i>A. paranae</i>	<i>A. fasciatus</i>
<b>GA</b>	6,37 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	6,70 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>
<b>GB</b>	4,62 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	4,80 $\pm$ 0,49 <sup>ab</sup>
<b>C1</b>	3,70 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	3,96 $\pm$ 0,34 <sup>*bc</sup>
<b>C2</b>	2,29 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>	2,44 $\pm$ 0,19 <sup>*c</sup>
<b>E</b>	1,93 $\pm$ 0,14 <sup>*cd</sup>	1,87 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>
<b>Z</b>	1,84 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	1,81 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>

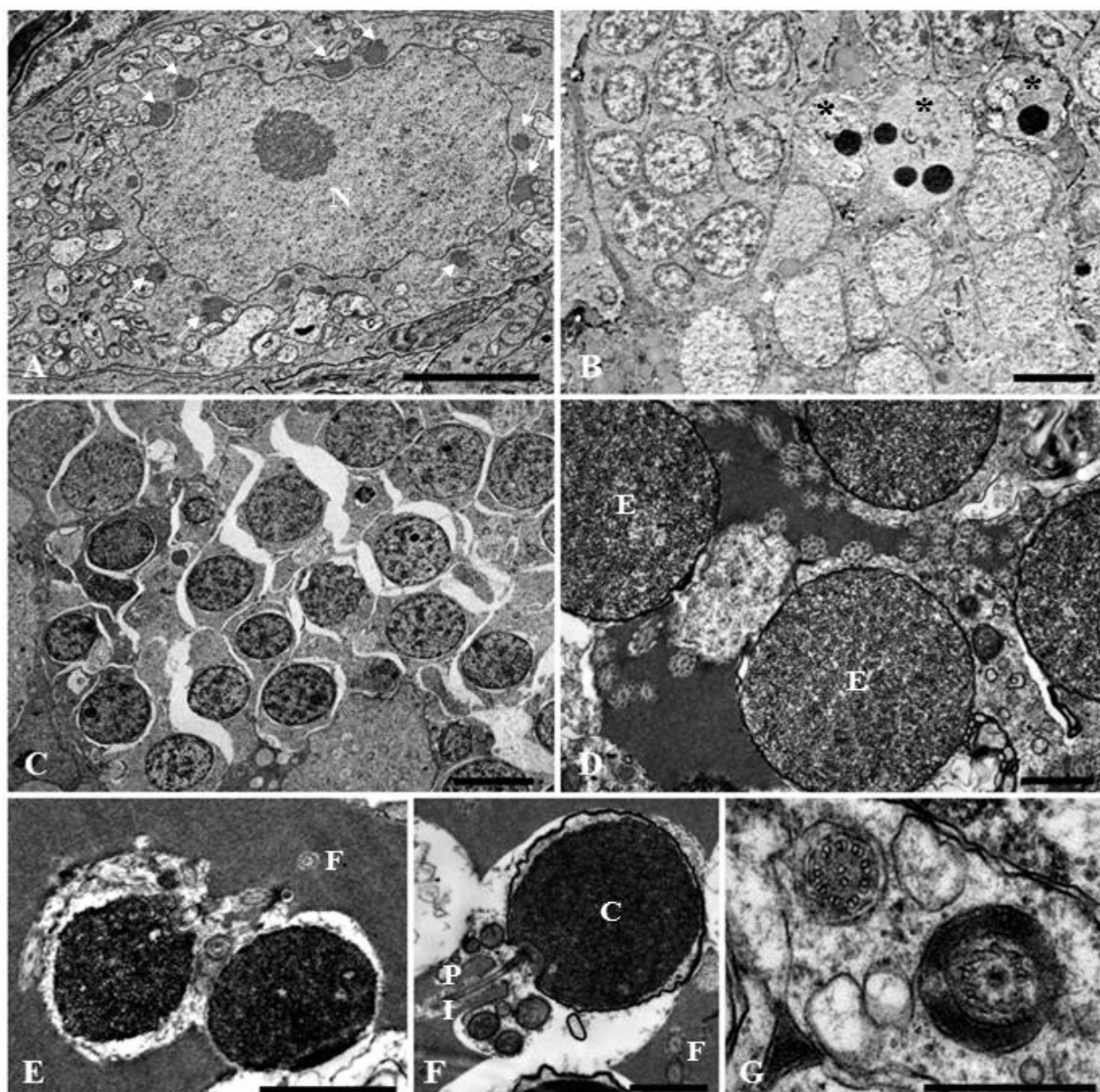
Valores são expressos como média  $\pm$  DP. Em cada linha, asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies ( $p < 0,05$  - Mann-Whitney). Em uma coluna, letras diferentes indicam diferenças significativas entre células da mesma espécie ( $p < 0,05$  - Kruskal-Wallis). GA: espermatogônia primária; GB: espermatogônia secundária; C1: espermátócito primário; C2: espermátócito secundário; E: espermátides; Z: espermatozoide.

### 5.6 FECUNDIDADE

A fecundidade absoluta de fêmeas maduras não foi significativamente diferente entre as duas espécies analisadas e uma correlação positiva significativa entre a fecundidade absoluta e o peso do ovário dos peixes foi observada para ambas as espécies (**Tabela 5**). A fecundidade relativa ao peso gonadal foi significativamente diferente entre as espécies de lambaris analisadas nesse estudo e não houve diferença entre fecundidade relativa ao comprimento total e peso corporal (**Tabela 5**).



**Figura 9:** Ultraestrutura de ovários de *A. paranae* (A e E) e *A. fasciatus* (B, C e D). A: Ovogônia. B: Detalhe de folículo vitelogênico mostrando glóbulos de vitelo (GV), zona radiata (ZR) com poros canais e célula folicular (CF). C: Detalhe de zona radiata com poros canais em corte longitudinal (P – setas). D: Contato entre a célula folicular (CF) e a zona radiata (ZR) do ovócito. E: Detalhe de célula folicular apresentando retículo endoplasmático (RE) abundante. N: núcleo. Barra = 2  $\mu\text{m}$  (A, B e C); 1  $\mu\text{m}$  (D e E).



**Figura 10:** Ultraestrutura de testículos de *A. fasciatus* (A, B, C e E) e *A. paranae* (F e G). A: Espermatogônia com núcleo grande, nucléolo evidente e presença de nuages (setas). B e C: Cistos de espermatócitos, alguns contendo corpos apoptóticos (\*). D: Espermatídes (E). E e F: Espermatozoides (C: cabeça; PI: peça intermediária contendo mitocôndrias; F: flagelo). G: Detalhe de flagelos apresentando o padrão de 9 + 2 de microtúbulos. Barra = 5  $\mu$ m (A, B e C); 1  $\mu$ m (D e F); 2  $\mu$ m (E); 500 nm (G).

**Tabela 5:** Fecundidade absoluta e relativa ao comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso gonadal (PG) de fêmeas maduras dos lambaris do gênero *A. paranae* e *A. fasciatus* da cabeceira do Rio Grande.

Espécies	Fecundidade absoluta					
	Min.	Max.	Média	r (CT)	r (PC)	r (PG)
<i>A. paranae</i>	2439,11	10216,46	5582,82 ± 1892,78 <sup>a</sup>	0,265	0,339	0,848*
<i>A. fasciatus</i>	2675,77	8119,98	5668,57 ± 1816,68 <sup>a</sup>	0,058	0,088	0,669*

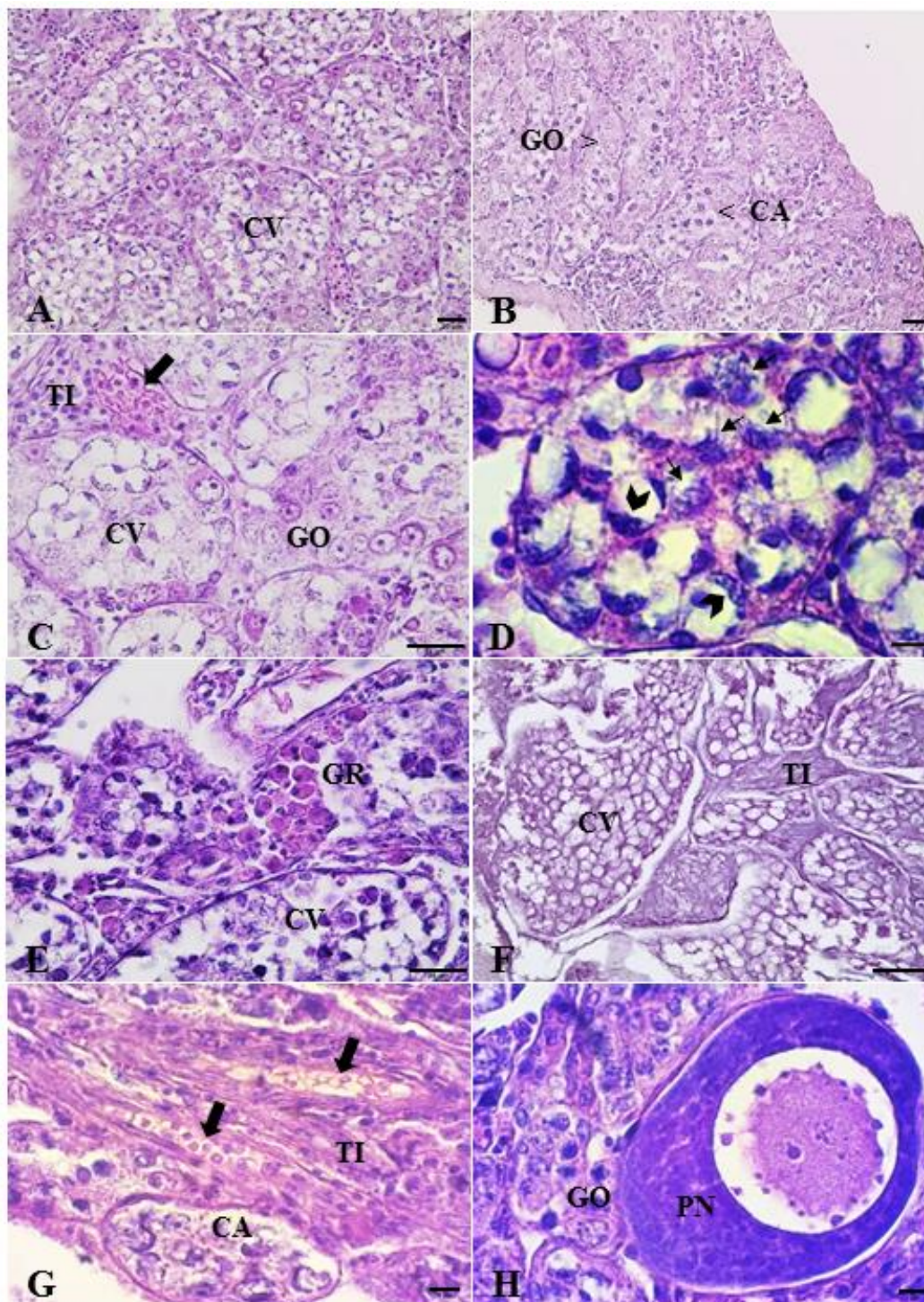
Espécies	Fecundidade relativa		
	CT (cm)	PC (g)	PG (g)
<i>A. paranae</i>	575,55 ± 175,17 <sup>a</sup>	372,40 ± 98,50 <sup>a</sup>	1984,16 ± 375,36 <sup>b</sup>
<i>A. fasciatus</i>	525,94 ± 169,29 <sup>a</sup>	325,51 ± 102,60 <sup>a</sup>	2662,84 ± 621,75 <sup>a</sup>

Valores são expressos como média ± DP. Em cada coluna, valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças significativas ( $p > 0.05$ ). Coeficiente de correlação de Pearson (r) com o comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso gonadal (PG). \*Correlação significativa entre fecundidade e PG ( $p < 0.05$ ).

### 5.7 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS DE *ASTYANAX SP.*

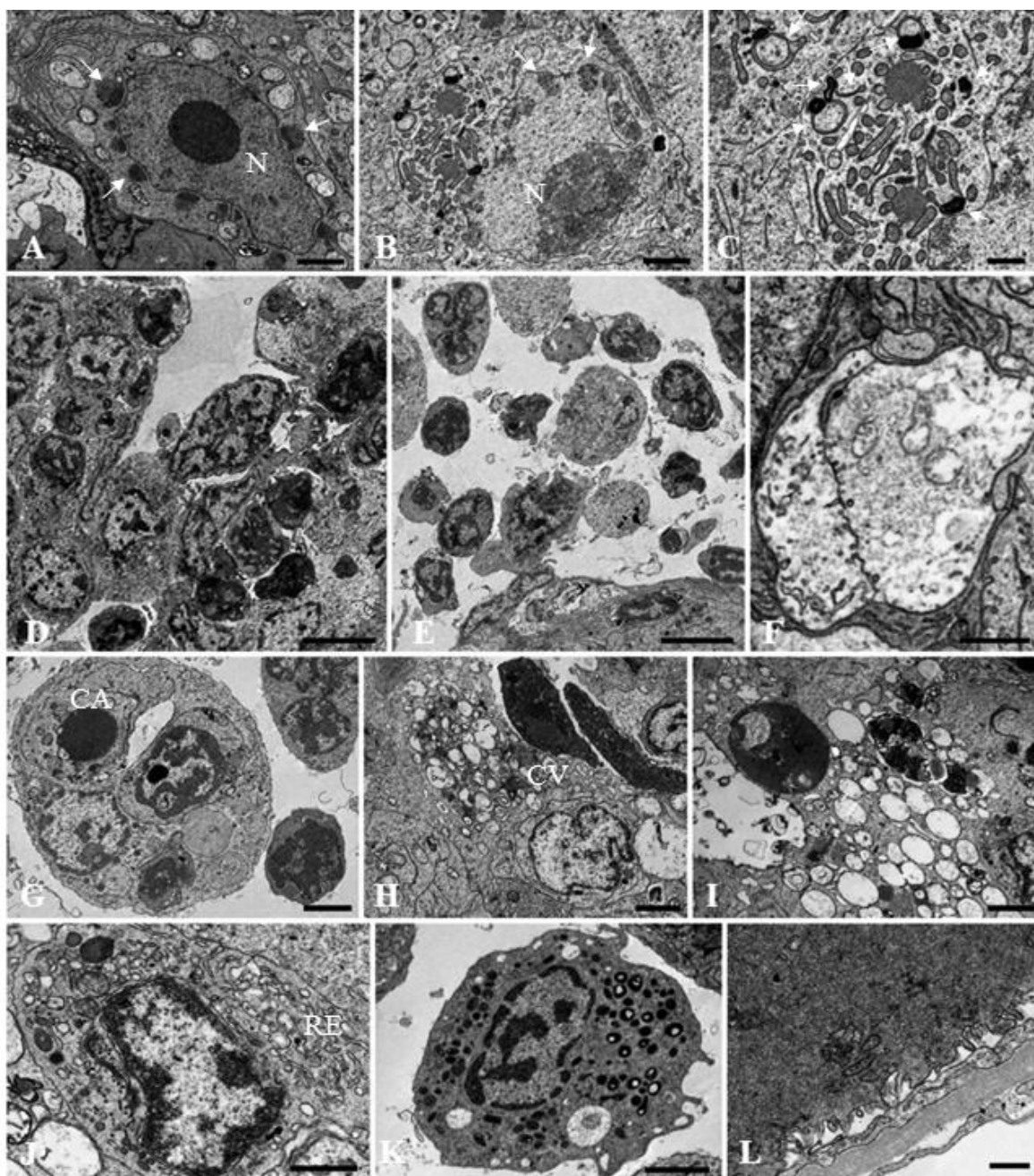
Exemplares de *Astyanax sp.* não apresentaram maturação gonadal e análises morfológicas demonstraram várias alterações como aumento de tecido intersticial, células germinativas hipertrofiadas, vacuolizadas e em degeneração (**Figura 11**). Muitas células apresentaram cromatina anexada ao envoltório nuclear, na periferia da célula, constituindo uma evidência de apoptose (**Figura 11D**). Nesses animais, foi observado um contínuo, desde tecido completamente vacuolizado com gônias (espermatogônias ou ovogônias) que não avançaram na meiose (**Figura 11A**), até tecidos que apresentaram avanço nesse processo e eventualmente exibiram alguns ovócitos perinucleolares ou espermátocitos (**Figura 11H, 12D e 12L**). Entretanto, ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos bem como espermátides e espermatozoides não foram observados em nenhum dos exemplares de *Astyanax sp.* De maneira geral, devido às intensas alterações celulares observadas, não foi possível confirmar o sexo desses animais.

A análise ultraestrutural desses animais mostrou ausência de gametas, presença de células de defesa, células intensamente vacuolizadas, degeneração de organelas, lisossomos e estruturas similares a vacúolos autofágicos (**Figura 12**).



**Figura 11:** Secções histológicas de gônadas de *Astyanax* sp. coradas por hematoxilina-eosina. A: Aspecto geral da gônada, com células intensamente vacuolizadas (CV) organizadas em estruturas semelhantes a cistos. B: Presença de gônias aparentemente normais (GO) e células alteradas aparentemente apresentando núcleos com cromatina condensada. C: Células vacuolizadas (CV) com núcleo deslocado para a periferia, gônias (GO) e tecido intersticial (TI) com vaso sanguíneo (seta grossa). D: Detalhe de células vacuolizadas apresentando cromatina anexada ao envoltório nuclear na periferia da célula (cabeças de setas), nucléolo pouco evidente

e indícios de meiose interrompida com formação de cromossomos e fibras do fuso alterados (setas finas). E: Presença de granulócitos (GR) no tecido intersticial e células vacuolizadas (CV). F: Degeneração tecidual intensa, com células vacuolizadas (CV) sem núcleo evidente e aumento de tecido intersticial (TI). G: Aumento de tecido intersticial (TI) e vasos sanguíneos (setas grossas) e presença de cisto de células alteradas (CA). H: Presença de folículo perinuleolar (PN) e gônia aparentemente normais. Barra = 20  $\mu\text{m}$  (A, B, C, E e F), 5  $\mu\text{m}$  (D, G e H).



**Figura 12:** Ultraestrutura gonadal de *Astyanax* sp. A: Espermatogônia apresentando núcleo (N) alongado e presença de nuages (setas). B: Núcleo com cromatina agrupada e presença de nuages

(setas). C: Detalhe da imagem B - citoplasma contendo organelas com morfologia atípica. D: Espermátocitos apresentando núcleo alterado. E: Células de defesa. F: Vacúolo grande semelhante a vacúolo autofágico, contendo organelas no interior. G: Célula alterada apresentando cromatina condensada e evidência de apoptose. H: Célula intensamente vacuolizada. I: Detalhe da imagem H mostrando vacúolos de diferentes tamanhos. J: Célula secretora apresentando cisternas do retículo endoplasmático (RE) dilatadas. K: Granulócito. L: Detalhe de um folículo perinuleolar e a membrana basal adjacente. Barra = 2  $\mu\text{m}$  (A, B, G, H, J e K); 1  $\mu\text{m}$  (C e F); 5  $\mu\text{m}$  (D e E); 500 nm (I e L).

### 5.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODING)

Após o alinhamento, a conferência manual e o aparo das extremidades ambíguas as sequências de DNA obtidas tiveram comprimento de 564 pares de bases. Foram obtidas 26 sequências do morfótipo *A. paranae*, 25 de *A. fasciatus* e 23 de *Astyanax* sp. A árvore de Neighbor-Joining evidenciou a presença de dois clados filogeneticamente distintos (**Figura 13**), um referente à espécie *A. paranae* e outro referente à espécie *A. fasciatus*. As sequências referências baixadas estão exibidas na árvore com o número de identificação do BOLD. Os números de acesso das sequências referências no GenBank são: JQ 353543, JQ 353534 (*A. fasciatus*); JN 988740, JN 988739 (*A. paranae*).

Um total de 9 haplótipos foi detectado nas 74 amostras de lambaris e foram numerados de H-1 a H-9, conforme mostrado na rede de haplótipos (**Figura 14**). O haplótipo H-10 foi exibido apenas por sequências referências para a espécie *A. paranae* obtidas do banco de dados GenBank. Entre os haplótipos amostrados neste estudo, dois foram relacionados à espécie *A. fasciatus* (H-1 e H-2) e os outros sete à espécie *A. paranae* (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-9). O haplótipo H-6, único exclusivo ao morfótipo *Astyanax* sp., provavelmente foi herdado de um indivíduo da espécie *A. paranae* que não foi amostrado. O haplótipo H-2 foi o mais representativo neste estudo, sendo compartilhado por 40 animais, incluindo a maioria dos exemplares de *A. fasciatus*. Entre os exemplares de *A. paranae*, o haplótipo mais representativo foi H-5, que foi compartilhado por 15 indivíduos. A rede de haplótipos mostrou que diferentes exemplares morfologicamente identificados como *Astyanax* sp. compartilharam haplótipos das duas espécies de lambaris, mesmo exibindo apenas um morfótipo, indicando que esses peixes possivelmente sejam híbridos provenientes do cruzamento de *A. paranae* e *A. fasciatus*. Dessa forma, foi possível separar os exemplares de *Astyanax* sp. em dois grupos: exemplares que foram agrupados com o clado *paranae* (n= 7) e exemplares agrupados com o clado *fasciatus* (n= 16), para análises posteriores.

Para a análise de *clustering* dos indivíduos amostrados (**Figura 15**), foi sugerido ao programa BAPS a existência de três populações ou *clusters* devido à presença de três morfótipos nas amostras. Entretanto, baseada nas semelhanças entre os haplótipos essa análise detectou, com 100% de probabilidade a existência de apenas dois *clusters* que foram associados aos indivíduos puros das espécies *A. paranae* (vermelho) e *A. fasciatus* (verde). O morfótipo *Astyanax* sp. foi associado a uma mistura dos *clusters* observados, isto é, esses exemplares apresentaram informação genética dos dois grupos que o programa demonstrou serem puros. Dessa forma, assim como a rede de haplótipos, a análise de *clustering* evidencia que os exemplares de *Astyanax* sp são provavelmente híbridos entre as duas espécies de lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus*.

A distância genética média entre as sequências do gene mitocondrial COI, detectada nos diferentes grupos, variou de 0,0% a 2,2% (**Tabela 6**). As análises de distância genética confirmaram que os morfótipos *A. paranae* e *A. fasciatus* correspondem a espécies distintas, uma vez que a distância entre esses dois grupos foi de 2,2%. Além disso, as divergências observadas entre as amostras e as sequências referências foram baixas (0,5% para *A. paranae* e 0,0% para *A. fasciatus*). A distância genética encontrada entre os haplótipos de *A. paranae* foi de 0,171%, enquanto os haplótipos de *A. fasciatus* apresentaram 0,014% de distância (**Tabela 7**). Deste modo, observou-se um “*barcode gap*” de DNA entre as espécies do gênero *Astyanax*, mostrando que DNA barcoding conseguiu distinguir essas espécies de maneira bem sucedida.

Em relação a *Astyanax* sp., exemplares do clado *paranae* apresentaram 0,2% de divergência em relação aos indivíduos da espécie *A. paranae*, enquanto o único haplótipo dos exemplares do clado *fasciatus* também foi detectado em indivíduos de *A. fasciatus*, não havendo divergência genética entre esses dois grupos. Apesar dessa ausência de divergência genética, os peixes agrupados com *A. fasciatus* eram morfologicamente diferentes dessa espécie, sendo por esse motivo identificados como um morfótipo distinto (*Astyanax* sp.). Em relação à distância genética dentro dos grupos analisados, observou-se que os exemplares de *A. paranae* (0,171%) apresentaram maior distância entre seus haplótipos do que a espécie *A. fasciatus* (0,014%) e que os exemplares de *Astyanax* sp. apresentaram valores semelhantes aos observados para as espécies com as quais esses animais foram agrupados, isto é, exemplares do clado *paranae* apresentando 0,186% de distância genética, enquanto exemplares do clado *fasciatus* apresentaram 0% de distância entre os indivíduos amostrados (**Tabela 7**).

Entre os grupos analisados neste estudo, a maior diversidade genética foi observada em *A. paranae* (Hd=0,720), que apresentou seis haplótipos. A menor diversidade genética foi

detectada em *A. fasciatus* ( $Hd=0,083$ ), com dois haplótipos, enquanto *Astyanax* sp. apresentou diversidade intermediária ( $Hd=0,493$ ) entre os grupos amostrados, com cinco haplótipos.

**Tabela 6:** Distância genética média para o gene COI, em porcentagem, entre os diferentes grupos capturados na cabeceira do Rio Grande e seqüências referências das espécies estudadas.

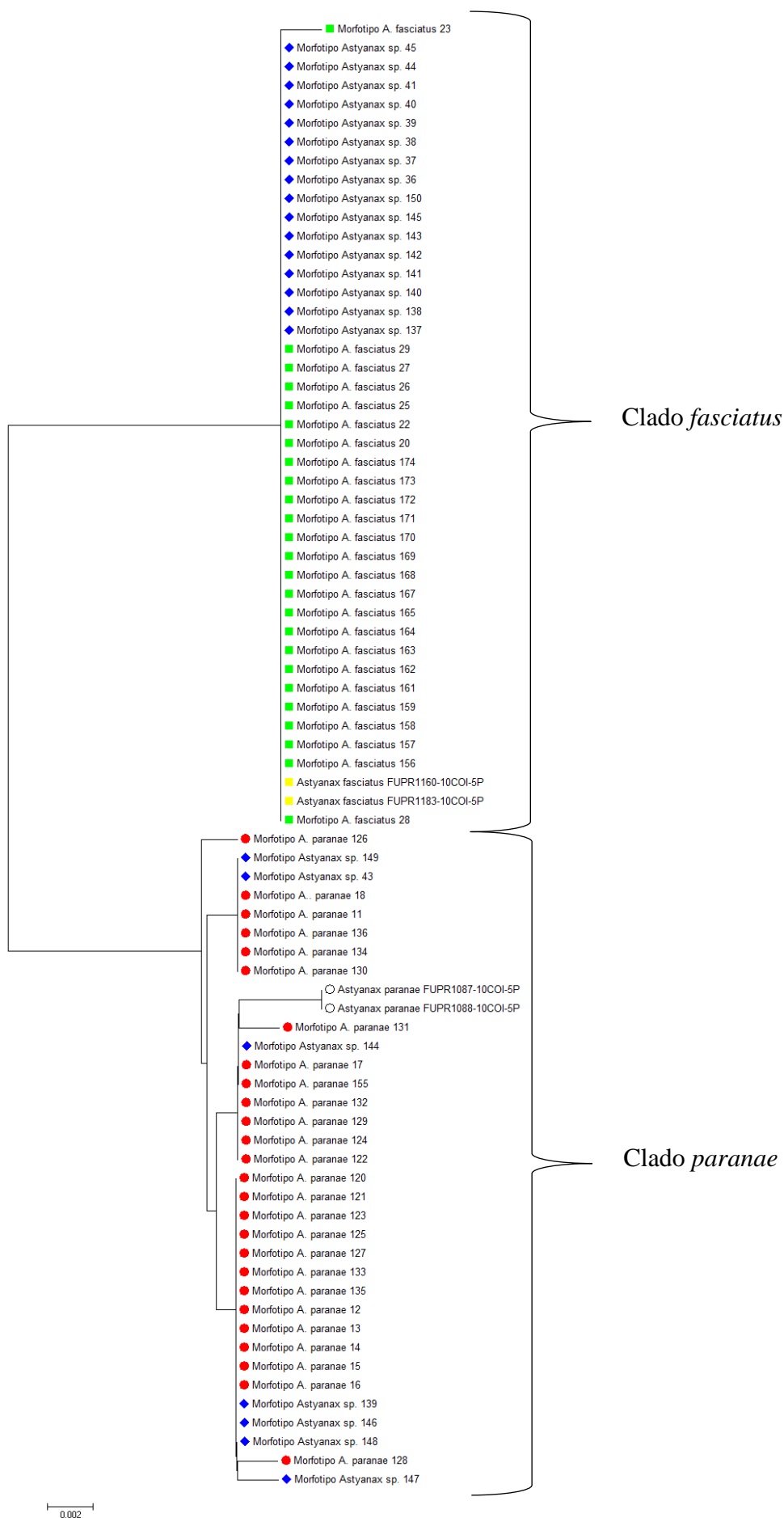
Morfótipos	1	2	3	4	5	6
1. <i>A. paranae</i>	-					
2. <i>Astyanax</i> sp. clado <i>paranae</i>	0,2	-				
3. <i>Astyanax</i> sp. clado <i>fasciatus</i>	2,2	2,2	-			
4. <i>A. fasciatus</i>	2,2	2,2	0,0	-		
5. Referência <i>A. paranae</i>	0,5	0,6	2,5	2,5	-	
6. Referência <i>A. fasciatus</i>	2,2	2,2	0,0	0,0	2,5	-

**Tabela 7:** Distância genética média dentro dos diferentes grupos capturados na cabeceira do Rio Grande.

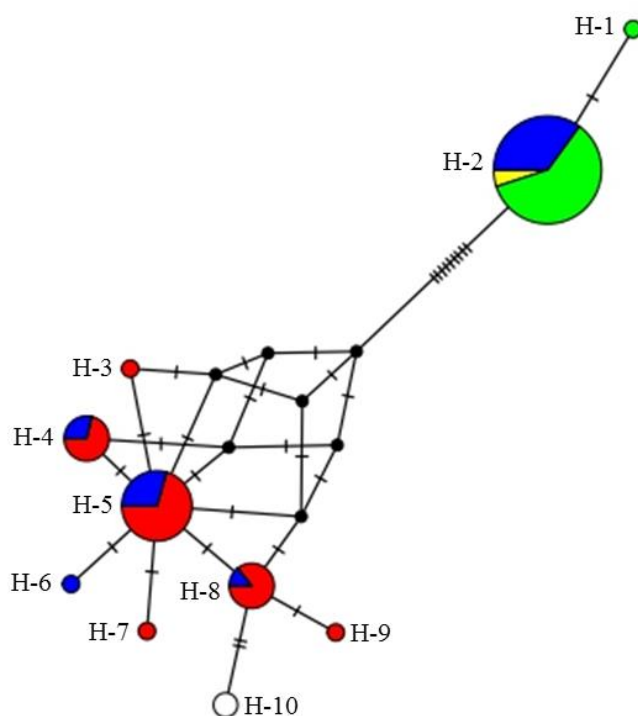
Morfótipos	Distância genética (%)
<i>A. paranae</i>	0,171
<i>Astyanax</i> sp. clado <i>paranae</i>	0,186
<i>Astyanax</i> sp. clado <i>fasciatus</i>	0,000
<i>A. fasciatus</i>	0,014

**Tabela 8:** Diversidade haplotípica ( $Hd$ ) dos diferentes morfótipos capturados na cabeceira do Rio Grande.

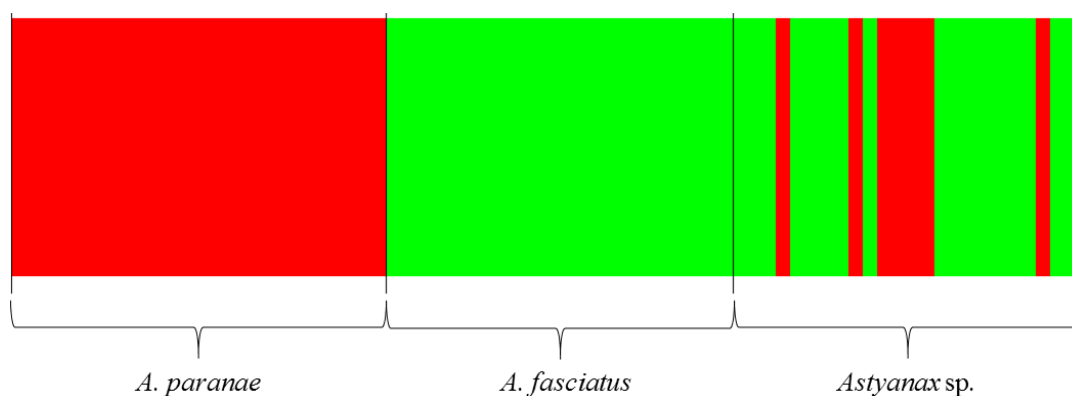
Morfótipos	N.º de Amostras	N.º de Haplótipos	Diversidade haplotípica ( $Hd$ )
<i>A. paranae</i>	26	6	0,720
<i>Astyanax</i> sp.	23	5	0,493
<i>A. fasciatus</i>	25	2	0,083



**Figura 13:** Árvore de Neighbor-Joining construída com sequências do gene mitocondrial COI. Quadrados representam sequências de DNA do morfótipo *A. fasciatus* (verde: amostras; amarelo: referências). Círculos representam sequências do morfótipo *A. paranae* (vermelho: amostras; branco: referências). Losangos representam sequências dos exemplares identificados como *Astyanax* sp. Número de acesso das sequências referências no GenBank: JQ 353543, JQ 353534 (*A. fasciatus*); JN 988740, JN 988739 (*A. paranae*).



**Figura 14:** Rede de haplótipos construída com sequências do gene mitocondrial COI. Sequências referências para *A. fasciatus* (amarelo) e para *A. paranae* (branco); *Astyanax* sp. (azul); *A. fasciatus* (verde); *A. paranae* (vermelho).



**Figura 15:** Análise de *clustering* dos indivíduos amostrados utilizando sequências do gene mitocondrial COI. Cada cor indica um *cluster* baseado em similaridade genética e cada indivíduo é representado por uma barra vertical.

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou comparativamente pela primeira vez a gametogênese e biologia reprodutiva das duas espécies de lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus* usando ferramentas morfológicas associadas à genética molecular para evidenciar a ocorrência de hibridação natural entre estes lambaris na cabeceira do Rio Grande. Poucos estudos abordaram a biologia reprodutiva de *A. paranae* e *A. fasciatus*, e nenhum deles foi realizado em região de cabeira do Rio Grande. As cabeceiras dos rios são regiões vulneráveis aos impactos antrópicos e constituem locais de importância para a conservação de espécies de peixes e do curso do rio. De acordo com Maistro et al. (2000), o estudo de peixes de cabeceiras de rios é também interessante de um ponto de vista evolutivo devido à ocorrência de um pequeno número de indivíduos isolados geograficamente. Os dados físico-químicos da água no ponto de amostragem desse estudo mostraram-se condizentes com o que é esperado em um ambiente de cachoeira, como temperaturas mais baixas ao longo do ano e maiores quantidades de oxigênio dissolvido. A quantidade de sólidos dissolvidos totais encontrou-se muito abaixo do limite considerado máximo (500 mg/L) pela resolução CONAMA/357 de 2005, indicando que o ponto de amostragem desse estudo apresenta água de boa qualidade. A maior média de temperatura foi observada no trimestre equivalente ao período chuvoso (novembro a janeiro).

No presente trabalho observou-se a presença de dimorfismo sexual em *A. paranae*, com fêmeas maiores e mais pesadas que os machos. Outros estudos encontraram resultados semelhantes nessa espécie e nas espécies congêneres *A. bimaculatus* e *A. scabripinnis* com fêmeas maiores que machos (Barbieri, 1992; Barreto et al., 1998; Veloso-Júnior et al., 2009). O IGS médio de fêmeas foi estatisticamente maior que o de machos na espécie *A. paranae*. De maneira geral, é comum observar presença de IGS maior em fêmeas, refletindo o seu alto investimento em reprodução e a intensa atividade ovariana (Lubzens et al., 2010). O fator de condição de Fulton (K) está associado ao estado fisiológico, geralmente com valores maiores indicando melhores condições de saúde (Froese, 2006). Nesse contexto, o presente estudo constatou valores de K estatisticamente maiores na espécie *A. paranae* quando comparados a *A. fasciatus*. A determinação do tamanho da primeira maturação, além de ajudar na tomada de medidas conservacionistas, contribui para o esclarecimento de fatores importantes da dinâmica populacional (Veregue & Orsi, 2003). Os valores mínimos de comprimento total observados

para ambas as espécies desse estudo foram próximos dos tamanhos determinados para a maturação gonadal desses animais, indicando que a maturação ocorre cedo no desenvolvimento dos lambaris. De acordo com Veregue & Orsi (2003), o tamanho da primeira maturação gonadal pode ser inerente da espécie ou resultante das condições ambientais vigentes no momento da coleta dos peixes. De maneira geral, a espécie *A. paranae* reproduz com comprimentos menores que a espécie *A. fasciatus*. Entretanto, existe uma classe de tamanho (de 9,1 a 11 cm de comprimento) que ambas as espécies estão em atividade reprodutiva. Nesse estudo, a relação peso-comprimento indicou crescimento do tipo isométrico para *A. paranae*, *A. fasciatus* e para *Astyanax* sp., uma vez que o valor do coeficiente angular  $b$  não foi estatisticamente diferente de 3. Dessa forma, nos animais amostrados, o incremento em peso acompanha o crescimento em comprimento (Orsi et al., 2002). Assim, o tipo de crescimento não varia significativamente entre as espécies, embora existam diferenças entre as médias de comprimento e peso desses animais.

A identificação correta do estado reprodutivo dos indivíduos é essencial para a compreensão do uso de uma área ou sistema por uma determinada espécie de teleósteo e a utilização de escalas simplificadas de classificação das gônadas é importante para maior viabilidade da classificação, principalmente em estudos que utilizam várias populações (Dias et al., 1998; Veregue & Orsi, 2003). Assim, os estádios de maturação gonadal descritos nesse estudo demonstraram o ciclo reprodutivo das espécies *A. paranae* e *A. fasciatus*. A morfologia de ovários e testículos das espécies *A. paranae* e *A. fasciatus* é similar, assim como observado em outras espécies do gênero *Astyanax* (Melo et al., 2016). A observação de uma maior frequência de animais maduros nos trimestres referentes aos meses de agosto a outubro e de novembro a janeiro indicam que esse é o período de maior atividade reprodutivas dos lambaris. Fêmeas desovadas de *A. paranae* foram observadas ao longo de todas as coletas, o que sugere que esta espécie reproduz ao longo de todo o ano na cabeceira do Rio Grande, apresentando desova parcelada. Essa mesma estratégia reprodutiva tem sido associada à espécie *A. fasciatus* em alguns estudos (Gurgel, 2004; Carvalho et al., 2009). Os valores de IGS observados no presente estudo acompanharam as variações sazonais da maturação gonadal de *A. paranae* e *A. fasciatus*, principalmente nas fêmeas. Foram observados maiores médias de IGS nos períodos de maior atividade reprodutiva (de agosto a janeiro), período que também coincide com a maior frequência de chuvas no local. Em peixes, a reprodução é regulada por condições ambientais que estimulam a produção de hormônios sexuais durante o desenvolvimento gonadal através do eixo neuroendócrino-gonadal (Nagahama e Yamashita, 2008). Fatores ambientais, principalmente índice pluviométrico, temperatura e fotoperíodo são críticos para a maturação

gonadal e para o sucesso reprodutivo de peixes neotropicais (Lowe-McConnell, 1987; Schugardt & Kirschbaum, 2004). Nesse contexto, a reprodução de ambas as espécies de lambaris pode ter sido desencadeada por esses fatores, uma vez que a estação chuvosa está compreendida nos trimestres nos quais se observou maior atividade reprodutiva e maior temperatura da água também foi observada no trimestre de novembro a janeiro. Valores de IGS aumentados são associados com a maturação gonadal, enquanto que os valores reduzidos são associados com o repouso e a extrusão ou absorção de gametas (Le Cren, 1951). Dessa forma, os maiores valores de IGS encontrados nesse estudo foram observados no estágio 3 ou maduro de machos e fêmeas, enquanto os menores valores foram observados no estágio 1 ou repouso. Além disso, comparando os mesmos estádios de maturação entre as duas espécies de lambaris desse estudo, observou-se que o IGS de *A. paranae* tende a ser mais alto, com diferenças mais pronunciadas em machos. Isso pode refletir um maior investimento energético dessa espécie nesse local.

Diferentemente da oogênese de mamíferos, na qual os ovócitos não aumentam de tamanho, em teleósteos os ovócitos crescem enquanto o ciclo celular está interrompido em diplóteno na prófase meiótica (Nagahama, 1994). A gametogênese de fêmeas começa com a divisão meiótica de ovogônias, gerando os primeiros ovócitos, que interrompem a meiose e crescem acumulando reservas nutricionais, RNA e completam a formação da zona radiata, passando posteriormente pelo processo de maturação, quando a meiose é reassumida, ocorre quebra das vesículas germinais e finalmente ovulação (Lubzens et al., 2010). Os dados encontrados nesse estudo corroboram esse fato, mostrando um aumento de mais de 500  $\mu\text{m}$  no diâmetro dos ovócitos quando considerados desde o diâmetro das ovogônias até o diâmetro dos ovócitos vitelogênicos. Dessa forma, todas as células da linhagem germinativa feminina foram estatisticamente diferentes entre si, sendo as células mais avançadas na oogênese sempre maiores que as anteriores. Durante a espermatogênese, desde a fase mitótica de diferenciação das espermatogônias, passando pela fase meiótica, até a fase de espermiogênese, as células da linhagem germinativa masculina sofrem intensas mudanças estruturais que incluem a redução citoplasmática e nuclear (Magalhães et al., 2004). Em machos, espermatogônias dão origem a espermatócitos primários que por sua vez iniciam a meiose e apresentam variações morfológicas referentes à prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), posteriormente sofrendo a primeira divisão meiótica e gerando os espermatócitos secundários que após a segunda divisão (mais rápida) geram as espermatídes que sofrem alterações morfológicas pronunciadas (espermiogênese) dando origem aos espermatozoides (Shoulz et al., 2010). Assim, ao contrário do observado para fêmeas, machos apresentaram redução considerável no

tamanho das células germinativas ao longo do processo de espermatogênese, com diferença de mais de 4 µm entre o diâmetro nuclear de espermatogônias primárias e espermatozoides. Resultados próximos aos do presente estudo foram observados por Martins et al. (2010), que constataram uma redução de 80-90% do diâmetro nuclear de células germinativas de quatro espécies de teleósteos neotropicais durante a espermatogênese. Apesar de algumas diferenças significativas terem sido observadas entre as células germinativas das espécies de lambaris estudadas, nenhuma delas foi relativa aos ovócitos vitelogênicos e espermatozoides resultantes da gametogênese.

Assim como observado nas análises histológicas, a ultraestrutura gonadal de *A. paranae* e *A. fasciatus* também se mostrou muito similar entre as duas espécies. As ovogônias apresentaram núcleo grande com nucléolo único e citoplasma escasso contendo poucas organelas visíveis. A carência de retículo endoplasmático, por exemplo, sugere que essa célula tem baixa atividade secretora nessa fase do desenvolvimento. Todas essas características também foram observadas por Guimarães & Quagio-Grassiotto (2001) utilizando uma espécie pertencente à mesma família dos lambaris (Characidae). A zona radiata que envolve o ovócito é constituída de uma matriz extracelular complexa com poros-canais preenchidos pelas microvilosidades do ovócito e extensões da célula folicular (Rizzo et al., 2002). Nesse estudo foi possível observar essa região de contato entre o ovócito e a célula folicular através da zona radiata, que se apresenta completamente formada nos folículos vitelogênicos. Os poros-canais da zona radiata, além de serem importantes para a comunicação entre o ovócito e a célula folicular, também podem seguir um padrão entre espécies da mesma família ou subfamília, fornecendo subsídios para análises filogenéticas (Rizzo et al., 2002). A abundância de retículo endoplasmático observada nas células foliculares corrobora a literatura que associa a essas células um papel na produção de substâncias relacionadas com esteroidogênese, vitelogênese, bem como crescimento e maturação dos ovócitos (Nagahama, 1994; Senthilkumaran et al., 2004; Yaron & Levavi-Sivan, 2011, Almeida, 2013). Em relação à ultraestrutura de machos, no presente estudo foi possível observar espermatogônia tipo A contendo núcleo grande e nucléolo evidente. No citoplasma dessa célula, em região justaposta ao envelope nuclear foi visível a presença de nuages, muitas vezes associadas a mitocôndrias. As nuages apresentam-se como massas de material elétron-denso características de células germinativas primordiais de vertebrados e são compostas por RNA e proteínas, possivelmente resultantes de trocas entre núcleo e citoplasma (Braat et al., 1999). Essas estruturas foram observadas em espermatogônias e ovogônias de várias espécies, incluindo algumas da família Characidae. (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001; Magalhães et al., 2004; Magalhães et al., 2011). Foram observados

espermatócitos primários e secundários, alguns possivelmente sofrendo processo de apoptose. As estruturas elétron-densas presentes no interior dessas células possivelmente constituem corpos apoptóticos resultantes da fragmentação de DNA nucleossomal. Os espermatozoides das espécies *A. paranae* e *A. fasciatus* são uniflagelados, sem acrossomo e exibem morfologia característica com cabeça arredondada, peça intermediária contendo várias mitocôndrias esféricas e a inserção dos centríolos e uma cauda longa formada por flagelo com típico arranjo axonemal de dois microtúbulos centrais e nove pares periféricos. Espermatozoides de peixes de fertilização externa geralmente não apresentam acrossomo, fato que tem sido relacionado à presença de micrópila nos ovócitos desses animais (Mattei, 1991).

A fecundidade é uma variável que estima o potencial reprodutivo de uma espécie. Sua utilização é importante na aquicultura, manejo e conservação de espécies (Welcomme, 1979; Vazzoler, 1996). Peixes forrageiros, como *A. paranae* e *A. fasciatus*, geralmente apresentam estratégia reprodutiva oportunista, caracterizada por longos períodos reprodutivos, desovas múltiplas e baixa fecundidade em lotes (Winemiller, 1989). De fato, essas características foram observadas por Normando et al. (2013) em *A. fasciatus* e *A. bimaculatus*. De acordo com Suzuki et al. (2000), peixes de desova múltipla ou parcelada apresentam baixos valores de fecundidade quando comparados com aqueles de desova total. Corroborando a literatura, no presente estudo, a fecundidade absoluta de *A. paranae* foi de aproximadamente 5580 ovócitos em média, enquanto a espécie *A. fasciatus* apresentou média de aproximadamente 5670 ovócitos, valores baixos quando comparados com a fecundidade absoluta de mais de 200 mil ovócitos em *Prochilodus argenteus*, uma espécie de desova total (Arantes et al., 2010). Além disso, os dados de fecundidade absoluta das duas espécies também sugerem que a desova desses animais ocorre de forma parcelada, em lotes, uma vez que foi observada uma grande amplitude da quantidade de ovócitos nas fêmeas amostradas. Comparando as duas espécies de lambaris analisadas nesse estudo, não foram observadas diferenças significativas em relação à fecundidade absoluta e fecundidade relativa ao peso corporal. Entretanto, foi observada uma maior fecundidade relativa ao peso da gônada na espécie *A. fasciatus*, indicando que apesar desses animais apresentarem menores médias de IGS quando comparados à espécie *A. paranae*, eles produzem uma maior quantidade de ovócitos por grama de ovário, possivelmente ovócitos de menor peso.

Apesar do comprimento de *Astyanax* sp. nesse estudo estar compreendido em classes de tamanho que correspondem a animais com atividade reprodutiva nas espécies *A. paranae* e *A. fasciatus*, esses exemplares não apresentaram desenvolvimento e maturação gonadal. Uma vez que as gônadas desses animais não se desenvolvem, não foi possível separá-los em machos e fêmeas e os valores de IGS foram muito baixos, com média inferior às médias de todos os

outros peixes amostrados nesse estudo (machos e fêmeas de *A. paranae* e *A. fasciatus*). Em geral, os dados sugerem que além de serem espécies simpátricas, *A. paranae* e *A. fasciatus* compartilham semelhanças na morfologia gonadal, estratégia reprodutiva e possivelmente nos seus nichos ecológicos/reprodutivos, com sobreposição de período reprodutivo na cabeceira do Rio Grande, características que podem favorecer um eventual inter cruzamento entre essas espécies (Bassin et al., 2011). Assim, a presença de indivíduos com características similares às duas espécies e que não apresentam maturação gonadal, pode ser um indicativo de um processo de hibridação entre as duas espécies de lambaris, gerando indivíduos inférteis. O estado geral de saúde de *Astyanax* sp., representado pelo valor médio de K, foi maior que as médias de K da espécie *A. fasciatus* e próximo às médias observadas para *A. paranae*. A tendência de maior peso apresentada por esses exemplares pode ser decorrente da ausência de investimento energético em reprodução, uma vez que esses animais aparentemente não reproduzem. Características como maior comprimento e peso em indivíduos híbridos são eventualmente observadas e constituem grande interesse para aquicultura, levando à criação de programas de hibridação artificial para aquisição do vigor híbrido em peixes de interesse comercial (Alves et al., 2014).

As análises histológicas e ultraestruturais realizadas com exemplares de *Astyanax* sp. sugerem fortemente que a meiose desses animais se encontra interrompida e por isso suas gônadas não se desenvolvem e não atingem a maturação. Uma das evidências desse processo é que não foram observadas células como espermátides, espermatozoides, folículos pré-vitelogênicos e vitelogênicos em nenhum dos exemplares de *Astyanax* sp. analisados. Além disso, o tecido gonadal desses animais mostrou-se intensamente alterado, com células germinativas hipertrofiadas, vacuolizadas ou em degeneração, além de aumento do tecido intersticial e presença de células de defesa. A observação em detalhe de algumas células mostrou indícios de formação de cromossomos e fibras do fuso alteradas, o que constitui outro indício de meiose interrompida nesses animais. A cromatina anexada ao envoltório nuclear, na periferia da célula pode ser indício de apoptose. A apoptose é um processo fisiológico regulado geneticamente que elimina as células desnecessárias ou danificadas durante o desenvolvimento e garante a homeostase de organismos multicelulares (Jenkins et al., 2013). As principais características da apoptose são: fragmentação do DNA nucleossomal formando corpos apoptóticos que são posteriormente endocitados por fagócitos ou células vizinhas, não culminando em reação inflamatória; perda de junções de adesão com outras células e com a matriz extracelular; condensação da cromatina na periferia do envoltório nuclear e retração celular (Bangs et al., 2000; Santos et al., 2005). Apesar das alterações citadas, algumas células

normais foram observadas na histologia e na microscopia eletrônica, mostrando que aparentemente algumas células de alguns indivíduos conseguem avançar na divisão meiótica enquanto em outros indivíduos esse processo parece estar mais prejudicado, assim como demonstrado por Wills et al. (2000) em híbridos de peixe-sol. As análises ultraestruturais, além de confirmarem as observações histológicas, mostraram ainda a degeneração de organelas e presença de estruturas similares a vacúolos autofágicos. A autofagia é um processo celular associado ao estresse ou dano da célula, como inanição, estresse oxidativo, privação de nutrientes, senescência de organelas e retirada de fatores de crescimento que é induzido para fornecer a energia necessária para sustentar as mudanças no metabolismo, sendo caracterizado pelo sequestro partes do citoplasma e organelas dentro de vacúolos (autofagossomos) que são entregues aos lisossomos para degradação em massa (Maiuri et al., 2007; Moreau et al., 2010; Morais et al., 2012).

Em conjunto, as evidências observadas corroboram a hipótese de *Astyanax* sp. como híbridos resultantes do cruzamento das espécies de lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus*. Híbridos de peixes ciclídeos, por exemplo, apresentaram aumento de tecido intersticial, células em degeneração contendo lisossomos grandes e núcleos apoptóticos, bem como formação de “espermatogônias gigantes” contendo núcleos grandes e opacos, que foram correlacionadas à acumulação de cromatina sem a subsequente divisão celular, uma vez que a meiose se mostrou interrompida nesses animais (Fishelson, 2003). Em indivíduos triploides, sabe-se que durante a meiose todos os três homólogos se alinham lado a lado, mas apenas dois cromossomos se envolvem na sinapse (Roeder, 1997), o que pode culminar em interrupção da meiose (Blanco et al., 2001). Híbridos de medaka apresentaram o ciclo celular meiótico interrompido antes de atingir a metáfase I e quando híbridos de ambos os sexos foram cultivados juntos, fêmeas foram capazes de realizar desova, mas os ovos não se desenvolveram e machos não produziram espermatozoides funcionais (Shimizu et al., 1997). Apesar de os híbridos de medaka apresentarem cariótipo com a mesma quantidade de cromossomos das espécies parentais, os espermatozoides tinham diversas alterações como aumento de diâmetro, variação na espessura do flagelo e microtúbulos do flagelo com padrão diferente da estrutura normal 9+2 (Shimizu et al., 1997). Defeitos na meiose de híbridos de peixe-sol que levaram a esterilidade e produção de gametas alterados também foram observados por Wills et al. (2000).

As análises de DNA *barcoding* confirmaram que os morfótipos *A. paranae* e *A. fasciatus* correspondem a duas espécies distintas, uma vez que a divergência entre eles foi maior que 2%, valor de corte definido para peixes por Ward (2009). A proximidade do valor de referência padrão pode estar relacionada com a proximidade filogenética entre as espécies

analisadas. De fato, Rossini et al. (2016) sugerem que as espécies *A. paranae* e *A. fasciatus* apresentam radiação recente, com valores de distância genética baixos. Além disso, a identificação molecular das espécies confirmou a identificação morfológica feita de acordo com Graça & Pavanelli (2007).

Um haplótipo é uma sequência única de DNA, que se distingue dos demais pela mutação de pelo menos um par de base (sítios polimórficos), e que pode ser compartilhado por diferentes indivíduos (indivíduos com sequências idênticas). A rede de haplótipos considera os passos mutacionais (pares de bases distintos na mesma posição) acumulados pelos haplótipos amostrados separando-os de acordo com essa característica. Dessa forma, quanto mais geneticamente distantes são as amostras, mais longes elas estarão na rede de haplótipos. Nessa rede cada círculo representa um haplótipo e as cores indicam qual morfótipo compartilha o haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional ao número de amostras que compartilham o mesmo haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos não amostrados que foram utilizados pelo programa para conectar os dois grupos genéticos distintos observados. O fato de um morfótipo único compartilhar haplótipos de duas espécies distintas pode ser um indício de hibridação, uma vez que os haplótipos apresentam herança uniparental (Yu et al., 2014). Dessa forma, nesse estudo, os exemplares de *Astyanax* sp. possivelmente são híbridos resultantes do cruzamento entre as espécies de lambari *A. paranae* e *A. fasciatus*. Considerando que o COI é um gene mitocondrial e sua herança é materna, esse cruzamento pode ser do tipo: fêmeas de *A. paranae* x machos de *A. fasciatus* ou machos de *A. paranae* x fêmeas de *A. fasciatus*, uma vez que a herança mitocondrial foi associada a ambas as espécies. De fato, corroborando esta hipótese, a árvore de Neighbor-Joining agrupou os exemplares do morfótipo *Astyanax* sp. com ambas as espécies de lambaris identificadas nesse estudo. Além disso, outra evidência apresentada por este estudo foi a detecção de apenas dois *clusters* entre as amostras (com 100% de probabilidade), embora tenha sido pré-definida a presença de três *clusters* no *software* que realizou a análise. Dessa forma, a análise de *clustering* considerou *A. paranae* e *A. fasciatus* como populações puras enquanto *Astyanax* sp. foi considerado uma mistura dessas duas populações baseado na semelhança entre os haplótipos das amostras.

A distância genética dentro dos grupos e entre os grupos estudados é resultante de quantidades de haplótipos diferentes amostrados no estudo e do grau de diferenciação entre eles (sítios polimórficos). Assim, a distância entre *A. fasciatus* e *Astyanax* sp. clado *fasciatus* foi de 0,0% devido ao fato dos exemplares deste grupo terem apresentado apenas um haplótipo (que corresponde ao haplótipo mais representativo de *A. fasciatus*) enquanto os exemplares de *A. fasciatus* apresentaram apenas dois (que foram separados na rede por apenas um passo

mutacional). Da mesma forma, a divergência genética dentro do clado *fasciatus* de *Astyanax* sp. foi de 0,0% porque todas as sequências amostradas nesse grupo eram iguais, ou seja, esses exemplares apresentaram um único haplótipo. De maneira geral, a baixa distância genética observada dentro dos grupos justifica os agrupamentos, indicando que a chance de os indivíduos pertencerem a outras espécies é muito baixa.

A diversidade haplotípica é um estimador de diversidade genética utilizado para verificação da variabilidade dentro de uma população. Dessa forma, este dado pode indicar o status de conservação da população, isto é, uma população com diversidade muito baixa pode estar geneticamente ameaçada de extinção. Geralmente análises de diversidade utilizam marcadores mais variáveis, porém a utilização do COI no presente estudo foi suficiente para mostrar a baixa diversidade genética na população de *A. fasciatus* amostrada. Um estudo utilizando DNA mitocondrial da espécie *Leporinus elongatus* (piapara) da bacia do rio Paraná encontrou diversidade haplotípica variando de  $Hd=0,848$  a  $Hd=1,000$  entre os locais de amostragem, enquanto outro estudo utilizando a espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) mostrou diversidade haplotípica  $Hd=0,999$  e  $Hd=1,000$  (Martins et al., 2003; Santos et al., 2007). Em contrapartida, a espécie *A. fasciatus* no atual estudo apresentou um valor consideravelmente menor de diversidade ( $Hd=0,083$ ). Esse dado pode indicar uma colonização mais recente dessa espécie na cabeceira do Rio Grande quando comparada à espécie *A. paranae* ( $Hd=0,720$ ), o que pode indicar uma maior vulnerabilidade de *A. fasciatus* nesse ambiente.

Apesar de a maioria dos estudos utilizar marcadores moleculares mitocondriais apenas para detecção do parental materno envolvido na hibridação (Marie et al., 2007; Prado et al., 2011; Morgan et al., 2012; Prado et al., 2012; Burcea et al., 2014; Hashimoto et al., 2014; Vaini et al., 2014), no atual estudo o uso do COI foi suficiente para indicar uma evidência de hibridação natural entre as espécies de lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus*. Neste estudo, destacam-se os dados de biologia e morfologia reprodutivas que corroboram fortemente os dados moleculares. Poucos estudos avaliaram a morfologia gonadal de híbridos e, geralmente, a hibridação nesses casos é feita de maneira experimental, tornando-se sabidamente híbridos todos indivíduos resultantes do cruzamento e, assim, não sendo necessária a utilização de métodos para a identificação desses animais (Wills et al., 2000; Fishelson, 2003; Luin et al., 2013). Dessa forma, o presente estudo utiliza de maneira inédita dados de biologia reprodutiva, morfologia gonadal e DNA mitocondrial de maneira integrada para detecção de hibridação natural entre duas espécies de lambaris. Entretanto, análises de DNA nuclear como microssatélites são de grande relevância para confirmação desse processo e representam uma das perspectivas de continuação deste trabalho.

## 7. CONCLUSÕES

- As espécies *A. paranae* e *A. fasciatus* coabitam a cabeceira do Rio Grande, com sobreposição de período reprodutivo;
- Uma parcela dos lambaris coletados (*Astyanax* sp.) apresenta características morfológicas e genéticas compartilhadas com *A. paranae* e *A. fasciatus*, mas não apresentam desenvolvimento gonadal e análises histológicas e ultraestruturais mostraram várias alterações nas gônadas desses animais;
- O DNA *barcoding* dos lambaris confirmou a identificação morfológica de *A. paranae* e *A. fasciatus* como espécies distintas e mostrou compartilhamento de haplótipos dessas duas espécies nos exemplares com características intermediárias (*Astyanax* sp.);
- O compartilhamento de haplótipos de duas espécies em exemplares que apresentam apenas um morfótipo sugere que esses indivíduos sejam híbridos resultantes do cruzamento dos lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus*;
- Os híbridos interespecíficos de *A. paranae* e *A. fasciatus* são aparentemente inférteis e apresentam uma tendência de maior tamanho e peso possivelmente por não alocarem energia para reprodução.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alberto, A.; Camargo, A. F. M.; Verani, J. R.; Costa, O. F. T.; Fernandes, M. N. (2005). Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61, 247-255.
- Abilhoa, V. (2007). Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 24(4): 997-1005.
- Aljanabi, S. M.; Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25(22): 4692-4693.
- Almeida, F. L. (2013). Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 37 (2): 174-180.
- Allendorf, F. W.; Waples, R. S. (1996). Conservation and genetics of salmonid fishes. In: Avise, J. C.; Hamrick, J. L. (Ed.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, USA. 238–280.

- Andrade, P. M.; Braga, F. M. S. (2005). Reproductive seasonality of fishes from a lotic stretch of the Grande River, High Paraná River Basin, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*. 65(3): 387-394.
- Arantes, F. P.; Santos, H. B.; Rizzo, E.; Sato, Y.; Bazzoli, N. (2010). Profiles of sex steroids, fecundity and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream of Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science*. 118: 330-336.
- Arnold, M. L.; Martin, N. H. (2009). Adaptation by introgression. *Journal of Biology*. 8:82.
- Bangs, P.; Franc, N.; White, K.; (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*. 7: 1027–1034.
- Barbieri, G., (1992). Biologia de *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae) do Ribeirão do Fazzari, São Carlos, São Paulo II aspectos quantitativos da reprodução. *Revista Brasileira de Biologia*. 52, 589–596.
- Barreto, B. P.; Ratton, T. F.; Ricardo, M. C. P.; Alves, C. B. M; Vono, V.; Vieira, F.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. (1998). Biologia reprodutiva do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) no rio Carmo, bacia do rio Grande, São Paulo. *Bios Scientific Publishers*. 6 (6): 117-126.
- Bartley, D. M.; Rana, K.; Immink, A. J. (2001). The use of hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10: 325-337.
- Bassin, L.; Alvarez, N.; Pellissier, L.; Triponez, Y. (2011). Ecological niche overlap in sister species: how do oil-collecting bees *Macropis europaea* and *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae) avoid hybridization and competition? *Apidologie*. 42: 579–595.
- Borges, G. C.; Abjaudi, G. A. (2016). Caracterização ambiental da bacia do Rio Grande. In: Melo, R. M. C. & Borges, G. C. (Eds.). *Rio Grande: Ambiente, Peixes e Pessoas*. Belo Horizonte: Instituto de Estudos Pró-Cidadania. Cap.1, p.8-101.
- Braat, A. K.; Zandbergen, T.; Van de Water, S.; Goos, H. J. T.; Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics*. 216: 153–167.
- Britski, H. A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai (Ed). *Poluição e Piscicultura: notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura*. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Instituto de Pesca. Cap.2, p. 79-108.
- Britski, H. A.; Sato, Y.; Rosa, A. B. S. (1988). *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco*. Brasília. CODEVASF. 115p.

- Burcea, A.; Florescu, J. E.; Dudu, A.; Georgescu, S. E.; Costache, M. (2014). Molecular methods for the detection of natural hybrids in sturgeon populations. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*. 16(1): 65-72.
- Câmara, J. J. C.; Rodrigues, A. M.; Campos, E. C.; Santos, R. A.; Mandelli, J. (1991). Pesca seletiva do tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), com utilização de redes de emalhar, na represa de Ibitinga, rio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo. 18: 51-60.
- Carrasco-Letelier, L.; Eguren, G.; Mello, F. T.; Groves, P. A. (2006). Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. *Chemosphere*. 62, 1245-1252.
- Carvalho, D. C.; Seerig, A. S.; Brasil, B. S. A. F.; Crepaldi, D. V.; Oliveria, D. A. A. (2013). Molecular identification of the hybrid between the catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* using a set of eight microsatellite markers. *Journal of Fish Biology*. 83(3): 671–6.
- Carvalho, P. A.; Paschoalini, A. L.; Santos, G.B.; Rizzo, E; Bazzoli, N. (2009). Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in Southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*. 25: 306–313.
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). (2005). *Resolução 357*. <http://www.mma.gov.br/conama>.
- Dias, J. F.; Peres-Rios, E.; Chaves, P. T. C.; Rossi-Wongtschowski, C. L. B. (1998). Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de classificação e recomendações de procedimentos. *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos, 58 (1): 55-69.
- Drummond, G. M.; Martins, C. S.; Machado, A. B. M.; Sebaio, F. A.; Antonini, Y. (2005) Peixes. In: Machado, A. B. M.; Martins, C. S.; Sebaio, F.; Drummond, G. M.; Antonini, Y. (Ed.). *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para conservação sua conservação*. 2º. ed. Belo Horizonte: Ed. Fundação Biodiversitas, vol. 1.
- Ferguson, K. A.; Wong, E. C.; Chow, V.; Nigro, M; Ma, S. (2007). Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Human Molecular Genetics*. 16(23): 2870-2879.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20. 220 p.
- Fishelson, L. (2003). Comparison of Testes Structure, Spermatogenesis, and Spermatocytogenesis in Young, Aging, and Hybrid Cichlid Fish (Cichlidae, Teleostei). *Journal of Morphology*. 256: 285-300.

- Froese, R., 2006: Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 241–253.
- Garutti, V.; Britski, H. A. (2000). 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. *Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS*, Porto Alegre. 13: 65-88.
- Géry, J. (1977). Characoids of the world. T.F.H. Publications Inc. Ltd., Neptune City. 672 p.
- Graça, W. J.; Pavanelli, C. S. (2007). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM. 241 p.
- Gurgel, H.C.B. (2004). Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do rio Ceará Mirim, Poço Brando, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 21 (1), 131-135.
- Hashimoto, D. T.; Senhorini, J. A.; Foresti, F.; Martinez, P.; Porto-Foresti, F. (2014). Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid juvenile hybrids in brazilian aquaculture. *PlosOne*. 9(3): 1-9.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; deWaard, J. R. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*: 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N.; Penton, E. H.; Burns, J. M.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of National Academy of Sciences*. USA, v. 101, p. 14812-14817.
- Hubbs, C. L. (1955). Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, 4: 1-20.
- IGAM (Instituto Mineiro de Gestão das Águas). (2012). *Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia do Alto Rio Grande*. Belo Horizonte: IGAM/Consórcio Ecoplan-Lume-Skill. 57p.
- Ivanova, N. V.; Zemlak, T. S.; Hanner, R. H.; Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. 7: 544-548.
- Jenkins, V. K.; Timmons, A. K.; McCall, K. (2013) Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. *Trends in Cell Biology*. 332: 159–170.
- Le Cren, E.D. (1951). The length–weight relationship and seasonal cycle gonad weight and condition in the perch, *Perca fluviatilis*. *Journal of Animal Ecology*. 2092: 201–219.
- Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Pezzi da Silva, J. F., Vari, R., Harold, P. A., et al. (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O. and

- Ferraris Jr, C. J. (Eds): Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America, pp. 106–168. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Lowe-McConnell, R. (1987). Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge University Press, London, p. 382.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 367-389.
- Magalhães, A. L. B.; Bazzoli, N.; Santos, G. B.; Rizzo, E. (2004). Reproduction of the South American dogfish characid, *Galeocharax knerii*, in two reservoirs from upper Paraná River basin, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*. 70: 415-425.
- Magalhães, A. L. B.; Andrade, R. F.; Gomes, B. V. C.; Perini, V. R.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. (2011). Ultrastructure of the semicystic spermatogenesis in the South American freshwater characid *Hemigrammus marginatus* (Teleostei, Characiformes). *Journal of Applied Ichthyology*. 27: 1041-1046.
- Maistro, E. L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2000). Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*. 23(2): 365-369.
- Maiuri, M. C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 741–752.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*. 20(5): 229–237.
- Martin, R. H. (2006). Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reproductive Toxicology*. 22: 142-147.
- Martins, Y. S.; Moura, D. F.; Santos, G. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. (2010). Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 91: 466–473.
- Martins, Y. S.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Santos, J. E.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. (2012). Comparative analysis of gonadal morphology in six fish species of the Incertae Sedis genera in Characidae of occurrence in the São Francisco River Basin, Brazil. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 93:48–56.
- Mattei, X., 1991: Spermatozoon ultrastructure and its systematics implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*. 69: 3038–3055.

- Melo, F. A. G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arq. Mus. Nac.*, Rio de Janeiro. 59:1-46.
- Melo, R. M. C.; Gomes, D. D.; Moreira, D. P.; Gomes, M. R.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. (2016). Comparative Morphology of the Reproductive System of Seven Species of Ostariophysan Fishes From the Upper Das Velhas River, Brazil. *Journal of Morphology*.
- Melo, R. M. C.; Torquato, G. V.; Birindelli, J. L. O. (2016). Caracterização ambiental da bacia do Rio Grande. In: Melo, R. M. C. & Borges, G. C. (Eds.). *Rio Grande: Ambiente, Peixes e Pessoas*. Belo Horizonte: Instituto de Estudos Pró-Cidadania. Cap.2, p.104-154.
- Morais, R. D. V. S.; Thomé, R. G.; Lemos, F. S.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. (2012). Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. *Cell Tissue Reserach*. 347: 467–478.
- Moreau, K.; Luo, S.; Rubinsztein, D. C. (2010) Cytoprotective roles for autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 22: 206–211.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinni* (Pisces, Characidae) a species complex. *Revista Brasileira de Genética*. 14(2): 331-357.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*. 38: 217–229.
- Nagahama, Y., Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth and Differentiation*. 50 (1), 195-219.
- Normando, F. T.; Santiago, K. B.; Gomes, M. V. T. Rizzo, E.; Bazzoli, N. (2013). Impact of the Três Marias dam on the reproduction of the forage fish *Astyanax bimaculatus* and *A. fasciatus* from the São Francisco River, downstream from the dam, southeastern Brazil *Environmental Biology of Fishes*. DOI 10.1007/s10641-013-0153-3.
- Orsi, M. L.; Shibatta, O. A.; Silva-Souza, A. T. (2002). Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis, p.425-432. In: Medri, M. E. (Ed). *A Bacia do Rio Tibagi*. Londrina, Universidade Estadual de Londrina.595p.
- Paiva, M. P.; Andrade-Tubino, M. F.; Godoy, M. P. (2002). *As Represas e os Peixes Nativos do Rio Grande*. Rio de Janeiro. Editor Interciência. 78p.
- Pazza, R.; Kavalco, K. F.; Bertollo, L. A. C. (2006). Chromosome Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). I - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*. 112, 313–319.

- Pazza, R.; Kavalco, S. A. F.; Penteadó, P. R.; Kavalco, K. F.; Almeida-Toledo, L. F. (2008). The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*. 72, 2002–2010.
- Peres, W. A. M.; Bertollo, L. A. C.; Buckup, P. A.; Blanco, D. R.; Kantek, D. L. Z.; Moreira-Filho, O. (2012). Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* ‘‘bimaculatus group’’ (Characiformes: Characidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 22:519–526.
- Prado, F. D.; Hashimoto, D. T.; Senhorini, J. A.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2012). Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Journal of Fish Research*. 125-126: 300–305.
- Prado, P. S.; Pinheiro, A. P. B.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. (2014). Reproductive biomarkers response induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environmental Research*. 131, 165–173.
- Prado, P. S.; Souza, C. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. (2011). Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 1879–87.
- Guimarães, A. C. D.; Quagio-Grassiotto, I. (2001). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Tissue and Cell*. 33 (3): 241-248.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J.; Jr. (2003). Check list of freshwater fishes of South and Central América. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil. 742 p. ISBN: 8574303615.
- Rizzo, E.; Sato, Y.; Barreto, B. P.; Godinho, H. P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*. 61: 615–632.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development*. 11: 2600-2621. ISSN 0890-9369/97.
- Rossini, B. C.; Oliveira, C. A. M.; Melo, F. A. G.; Bertaco, V. A.; Astarloa, J. M. D.; Rosso, J. J.; Foresti, F.; Oliveira, C. (2016). Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. *PlosOne*. DOI:10.1371/journal.pone.0167203.
- Russo, C. A. M.; Miyaki, C. Y.; Pereira, S. L. (2004). Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In Matioli, R. S. (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora.

- Santos, G. B.; Formagio, P. S. (2000). Estrutura da ictiofauna dos reservatórios do rio Grande, com ênfase no estabelecimento de peixes piscívoros. *Inf. Agrop.*, Belo Horizonte, 21(2):98-106.
- Santos, G. B. (2010). A ictiofauna da bacia do Alto Paraná (rio Grande e rio Paranaíba). *MG Biota*. Belo Horizonte. 2(6):5-25.
- Santos, H. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N.; Sato, Y.; Moro, L. (2005). Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology*. 67: 1446–1459.
- Sato, Y.; Verani, N. F.; Nuñez, A. P. O.; Godinho, H. P.; Verani, J. R. (2003). Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho, H.P. & Godinho, A. L. (Ed.) Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Ed. PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil, pp. 229–274.
- Schugardt, C.; Kirschbaum, F., 2004: Control of gonadal maturation and regression by experimental variation of environmental factors in the mormyrid fish, *Mormyrus rume* proboscirostris. *Environmental Biology of Fishes*. 70: 227–233.
- Scribner, K. T.; Page, K. S.; Bartron, M. L. (2001). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10: 293–323.
- Senthilkumaran, B.; Yoshikuni, M.; Nagahama, Y. (2004). A shift steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 215: 11-18.
- Shimizu, Y.; Shibata, N.; Yamashita, M. (1997). Spermiogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *The Journal of Experimental Zoology*. 279: 102-112.
- Schulz, U.H., Martins-Júnior, H. (2001). *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 61, 615-622.
- Suzuki, H. I.; Agostinho, A. A. (1997). Reprodução de peixes do reservatório de Segredo. p. 163-181. In: Agostinho, A. A.; Gomes, L. C. (Ed.). Reservatório de Segredo: Bases ecológicas para o manejo. Maringá. EDUEM. 387p.
- Suzuki, H. I.; Agostinho, A. A.; Winemiller, K. O. (2000) Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology*. 57: 791–807.
- Trigo, T. C.; Freitas, T. R. O.; Kunzler, G.; Cardoso, L.; Silva, J. C. R.; Johnson, W. E.; O'Brien, S. J.; Bonatto, S. L.; Eizirik, E. (2008). Inter-species hybridization among Neotropical cats

- of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*. 17: 4317–4333.
- Vazzoler, A. E. A. (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá., 169 p.
- Veloso-Júnior, V. C.; Guimarães-Cruz, R. J; Barros, M. D. M.; Barata, R. S. L.; Santos, J. E. (2009). Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*. 25: 314-320.
- Veregue, A. M. L; Orsi, M. L. (2003). *Biologia reprodutiva de Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia*. 20 (1): 97-105.
- Ward, R. D.; Zemlak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R.; Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of Royal Society*. 360: 1847-1857.
- Ward, R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*. 9: 1077-1085.
- Whitaker, M. (1996). Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*. 1: 127-135.
- Welcomme, R. L. (1979). *Fisheries ecology of foodplain rivers*. Longman, New York, 317p.
- Winemiller, K. O. (1989) Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Collections*. 241: 225–241.
- Wills, P. S.; Sheehan, R. J.; Allen Jr, S. K. (2000). Reduced Reproductive Capacity in Diploid and Triploid Hybrid Sunfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 129: 30–40.
- Yaron, Z.; Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine regulation of fish reproduction. In: Farrel, A. P. (Ed). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Elsevier p. 1500-1508.
- Yu, J.; Kuroda, C.; Gong, X. (2014) Natural hybridization and introgression between *Lingularia cymbulifera* and *L. tongolensis* (Asteraceae, Senecioneae) in four different locations. *PlosOne*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115167>.
- Zaidan, F. C.; Fagundes, V. (2014). An effective method for interspecific introgression identification based on SNPs. *Conservation Genetics Resources*. 6: 543-546.