

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

MIGUEL ÁNGEL SOTO ORTIZ

CITOGENÉTICA COMPARADA EM PEIXES DO GÊNERO *Cheirodon*
(OSTARIOPHYSI: CHARACIDAE), COM FOCO EM ESPÉCIES
TRANSANDINAS

Ponta Grossa

2017

MIGUEL ÁNGEL SOTO ORTIZ

CITOGENÉTICA COMPARADA EM PEIXES DO GÊNERO *Cheirodon*
(OSTARIOPHYSI: CHARACIDAE), COM FOCO EM ESPÉCIES
TRANSANDINAS

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Ponta Grossa

2017

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

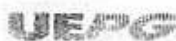
077 Ortiz, Miguel Angel Soto
Citogenética comparada em peixes do
gênero Cheirodon (Ostariophysi:
Characidae), com foco em espécies
Transandinas/ Miguel Angel Soto Ortiz.
Ponta Grossa, 2017.
66f.

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira
Filho.
Coorientador: Prof. Dr. Roberto
Ferreira Artoni.

1.Chile. 2.Cheirodontinae. 3.Cariotipo.
4.Cromossomos. I.Moreira Filho, Orlando.
II. Artoni, Roberto Ferreira. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Universidade Estadual do Centro-Oeste.
Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 576.312.32



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



UFPA

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2017

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **Miguel Angel Soto Ortiz**.

Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Orlando Moreira Filho em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Miguel Angel Soto Ortiz**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Orlando Moreira Filho (Orientador UFSCar), Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (UFPA) e Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Citogenética comparada em peixes do gênero *Cheirodon* (Ostariophysi: Characidae), com foco em espécies transandinas**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de dois mil e dezessete.

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (UFPA)

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG)

[Handwritten signatures of Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, and Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello]

À Chelita e Máximo, duas gerações que conseguiram se abraçar

Agradecimentos

Assim como qualquer novo passo na vida, a realização deste *trabalho* tornou-se possível graças ao apoio e incentivo das instituições e pessoas presentes ao longo desse caminho. Por isso gostaria de agradecer:

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa.

À Professora Osnara Mongruel por todas as orientações iniciais.

À Professora Mara Almeida Matiello por sua amável recepção e permanente orientação no programa.

À turma de 2015 do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pelo companheirismo e recepção, especialmente a Fabiane Paulitsch cuja ajuda e apoio foi fundamental no início do programa, quando meu português ainda estava iniciando.

Ao professor Roberto Ferreira Artoni por sua alegre recepção no laboratório e por ser sempre solícito e entusiasta, sempre me motivando em meus estudos.

Ao professor Orlando Moreira Filho por ser uma referência científica e motivar esta pesquisa.

À Professora Laura Walker Bozzo por sua valiosa ajuda no trabalho de laboratório no Chile.

Ao Professor Luiz Roberto Malabarba por sua recepção na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e por sua valiosa orientação e ajuda com a identificação dos peixes coletados.

Ao pessoal do Laboratorio de Ictiología da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por toda a ajuda oferecida, especialmente a Rafael Angrizani, Junior Chuctaya, Valeri Brando, Juliano Ferrer, Thiago Pinto e Sofia Steinstrasser,

Ao professor Mateus Henrique Santos por ser sempre solícito e disposto a ajudar com as dúvidas emergentes.

À professora Jesiane Batista por ajudar a melhorar este trabalho com suas sugestões.

Ao técnico Miguel Airton Carvalho por sua permanente disponibilidade e apoio no laboratório.

À secretária da pós-graduação Zoli Oliveira por sua amabilidade e permanente ajuda.

Ao Jonathan Pena Castro por sua valiosa ajuda no laboratório e por sua amizade.

Aos meus colegas do laboratório Daiane Niedzielski, Gabriel Marra, William Gross, Angelita Barth, Luz de la Ossa, Lucas Rosolen, Bruno Kubis e Matheus Azambuja pela permanente ajuda e amizade.

Ao Clovis Motta e ao Américo Moraes Neto por sua disponibilidade e ajuda no laboratório durante sua estadia na Universidade e por sua sincera amizade.

Aos meus colegas e amigos José Manuel Yañez, Christofer Hamilton-West, Victor Agurto, Edgard Bonnett, Pablo Silva, Cristóbal Verdugo, Carol Plaza de los Reyes, Javier Román, Carolina Aguirre e José Gallardo pela amizade e por todo o apoio oferecido no Chile.

À senhora Chechi e ao Gringo de Valdivia, por seu apoio e coragem oferecido na busca da espécie mais difícil.

Ao pessoal da Subpesca e Sernapesca por todas as orientações e ajuda oferecidas nas coletas.

Aos meus irmãos Pablo Alfonso Soto Ortiz e Liliana Paz Soto Ortiz por me manter sempre motivado.

E muito especialmente aos meus pais Elizabeth Miriam Ortiz Mourgues e Luis Alfonso Soto Rogel pelo apoio incondicional nesta etapa.

Grande abraço a todos e muito obrigado!!!

“Faz de tí mesmo algo e inventa,
mostra o exemplo aos próximos...
Ou por acaso você quer apenas
emergir do tóxico?” (Tea Time)

Resumo

Dentro da grande biodiversidade de peixes de água doce de América do Sul, a família Characidae tem sido um dos grupos mais controversos taxonomicamente. No país transandino Chile, a família é representada apenas pelos Cheirodontinae do gênero *Cheirodon* e suas cinco espécies, das quais *C. pisciculus*, *C. galusdae*, *C. kiliani* e *C. australe* são endêmicas. No entanto *C. interruptus* é originária das bacias atlânticas da Argentina, Uruguai e Brasil. Para contribuir na descrição das relações evolutivas e delimitação taxonômica das espécies do gênero *Cheirodon* presentes no Chile, são descritos pela primeira vez os cariótipos destas cinco espécies e comparados segundo seu número diplóide, morfologia cromossômica, bandas C, Regiões Organizadoras do Nucléolo (Ag-RON) e a marcação de DNAr 5S e 18S por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Para todas as espécies analisadas o número diplóide foi de 50 cromossomos, variando na fórmula cariotípica entre os tipos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. O número de braços cromossômicos foi de 68 em *C. australe* e *C. kiliani* e de 66 em *C. galusdae*, *C. pisciculus* e *C. interruptus*. A presença e distribuição da heterocromatina constitutiva foi similar nas cinco espécies, sendo observada principalmente nos centrômeros e telômeros. Foi observada variação no número e distribuição das regiões de DNAr 5S e 18S, podendo esses dois clusters estar em cromossomos diferentes ou em sintonia. Também foi observada variação na atividade das RONS, sendo encontrado em *C. kiliani* e em *C. galusdae*, o maior nível de atividade relativa. Existe maior similaridade cariotípica entre as duas espécies ocorrentes mais ao sul do que destas em relação àquelas mais centrais e ao norte, mostrando um reflexo da formação da hidrografia e isolamento das espécies.

Palavras-Chave: Chile, Cheirodontinae, Cariotipo, Cromossomos.

Abstract

Within the great biodiversity of freshwater fish of South America, the Characidae family has been one of the most controversial groups taxonomically. In the trans-Andean country of Chile, the family is represented only by the Cheirodontinae of the genus *Cheirodon* and its five species, of which *C. pisciculus*, *C. galusdae*, *C. kiliani* and *C. australe* are endemic, and *C. interruptus* is native to the Atlantic basins of Argentina, Uruguay and Brazil. In order to contribute to the description of the evolutionary relationships and taxonomic delimitation of the species of genus *Cheirodon* present in Chile, the karyotypes of these five species are described for the first time and compared by their diploid number, chromosomal morphology, C bands, Nucleolar Organizer Regions (Ag-NOR) and the rDNA 5S and 18S marking by fluorescence in situ hybridization (FISH). For all the analyzed species the diploid number was 50 chromosomes, varying in the karyotype formula among the metacentric, submetacentric, subtelocentric and acrocentric types. The number of chromosome arms was 68 in *C. australe* and *C. kiliani* and 66 in *C. galusdae*, *C. pisciculus* and *C. interruptus*. The presence and distribution of constitutive heterochromatin was similar in the five species, being observed mainly in the centromeres and telomeres. Variation in the number and distribution of the 5S and 18S rDNA regions was observed, being those two clusters on different chromosomes or in syntenia. It was also observed a variation in the activity of RONS, being found in *C. kiliani* and *C. galusdae*, the highest level of relative activity. There is a greater karyotype similarity between the two species that living more to the south in relation to those with the most central and north distribution, evidencing a reflection of hydrograph formation and species isolation.

Key words: Chile, Cheirodontinae, Chromosomes, Karyotype.

Lista de figuras

Figura 1	Mapa de Chile e algumas das suas principais bacias.....	15
Figura 2	Algumas características da subfamília Cheirodontinae.....	16
Figura 3	Peixe do gênero <i>Cheirodon</i> (<i>C. pisciculus</i>) e algumas referências anatômicas.....	17
Quadro 1	Características morfológicas das espécies do gênero <i>Cheirodon</i> no Chile segundo Campos (1982).....	18
Figura 4	Localidades e área de abrangência no Chile dos peixes do gênero <i>Cheirodon</i> segundo Campos (1982).....	19
Figura 5	Localidades e área de abrangência do <i>Cheirodon interruptus</i> (Campos, 1982; Mariguela et al, 2013; Malabarba, 2003)	19
Figura 6	Dendograma de cinco <i>Cheirodon</i> do Chile (Campos, 1982).....	20
Figura 7	A análise de agrupamento usando consenso individual de análises de morfometria geométrica.....	21
Figura 8	Fragmento do melhor ML árvore, segundo análise de DNA nuclear e mitocondrial (Mariguela et al., 2013).....	22
Quadro 2	Locais onde os <i>Cheirodon</i> foram coletados.....	27
Figura 9	Regiões de Chile e suas respectivas bacias e espécies de <i>Cheirodon</i> coletadas.....	27
Figura 10	Peixes do gênero <i>Cheirodon</i> e suas respectivas combinações de dois caracteres.....	28

Capítulo I - Citogenética comparada em peixes do gênero *Cheirodon* (Ostariophysi: Characidae), com foco em espécies transandinas.

Figura 1	Metafase do exemplar macho de <i>Cheirodon australe</i> com diferentes tratamentos.....	37
Tabela1	Marcadores cromossômicos em espécies do gênero <i>Cheirodon</i>	37

Figura 2	Cariótipos das cinco espécies do gênero <i>Cheirodon</i> presentes no Chile, e seus respectivos grupos de cromossomos.....	38
Figura 3	Cariótipos FISH para regiões 18s (verdes) e 5s (vermelho) com cromossomos Ag-NOR ⁺ e bandas C ⁺ de <i>C. interruptus</i>	39
Figura 4	Cariótipos FISH para regiões 18s (verdes) e 5s (vermelho) com cromossomos Ag-NOR ⁺ e bandas C ⁺ de <i>C. pisciculus</i>	40
Figura 5	Cariótipos FISH para regiões 18s (verdes) e 5s (vermelho) com cromossomos Ag-NOR ⁺ e bandas C ⁺ de <i>C. galusdae</i>	41
Figura 6	Cariótipos FISH para regiões 18s (verdes) e 5s (vermelho) com cromossomos Ag-NOR ⁺ e bandas C ⁺ de <i>C. kiliani</i>	42
Figura 7	Cariótipos FISH para regiões 18s (verdes) e 5s (vermelho) com cromossomos Ag-NOR ⁺ e bandas C ⁺ de <i>C. australe</i>	43
Figura 8	Idiogramas das espécies do gênero <i>Cheirodon</i> presentes no Chile.....	44
Figura 9	Cladograma das cinco espécies do gênero <i>Cheirodon</i> presentes no Chile.....	48

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1 Aspectos gerais da ictiofauna límnic do Chile.....	14
2.2. Estado atual da sistemática do gênero <i>Cheirodon</i>	16
2.3. As espécies de <i>Cheirodon</i> no Chile (as “pochas”).....	17
2.4. Relações evolutivas entre os <i>Cheirodon</i> chilenos.....	20
2.4.1. Segundo Campos (1982).....	20
2.4.2. Segundo Salas; Véliz e Scott (2012).....	20
2.4.3. Segundo Mariguela et al. (2013).....	21
2.5. Análises dos cromossomos em peixes.....	22
3. Justificativa e objetivos.....	24
4. Material e métodos.....	26
4.1. Material biológico e locais de coletas	26
4. 2. Estudos Citogenéticos.....	28
4. 2. 1. Citogenética Convencional.....	28
4. 2. 2. Citogenética Molecular: Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	29
4. 2. 3. Análises cariotípicas.....	29
5. Resultados.....	30
Capítulo I: Citogenética comparada em peixes do gênero <i>Cheirodon</i> (Ostariophys: Characidae), com foco em espécies transandinas.....	31
Discussão.....	45
6. Conclusões.....	49
7. Referências Bibliográficas.....	51
Anexos.....	57

1. Introdução

Dentro da grande biodiversidade de peixes de água doce da América do Sul, a família Characidae tem sido um dos grupos mais controversos taxonomicamente. Por exemplo no país transandino Chile, a família é representada apenas pelo gênero *Cheirodon*, cujas espécies são morfologicamente semelhantes, constituindo um desafio para classificação a nível específico. As características hidrogeográficas e o grande isolamento natural do Chile influenciaram o desenvolvimento de uma ictiofauna pouco diversa, altamente endêmica e críptica.

No Chile, as cinco espécies do gênero *Cheirodon* presentes são distribuídas em um sentido latitudinal. Destas cinco espécies, *Cheirodon pisciculus*, *Cheirodon galusdae*, *Cheirodon kiliani* e *Cheirodon australe* são endêmicas do Chile, enquanto *Cheirodon interruptus* é originária das bacias atlânticas da Argentina, Uruguai e Brasil.

As espécies de *Cheirodon* presentes no Chile já foram estudadas segundo combinação de caracteres morfológicos e análises de sequências de DNA mitocondrial e nuclear. Para ambos tipos de análises, *C. australe* aparece mais próximo filogeneticamente do introduzido *C. interruptus*, o mais distante geograficamente. No entanto, alguns dos caracteres morfológicos usados, como o número de cúspides dos dentes, podem variar entre e dentro de cada espécie, o que normalmente leva a erros na identificação de populações de *Cheirodon*. Além disso, as análises morfológicas e moleculares mais recentes não incluíram todas as espécies de *Cheirodon* transandinas.

Outra ferramenta utilizada em estudos evolutivos e comparativos é a citogenética, especialmente útil em grupos taxonômicos de difícil diagnóstico. O cariótipo e seus cromossomos são os elementos fundamentais dos estudos citogenéticos e a base física dos genes. Assim processos como a hereditariedade, variação, mutação e conseqüentemente a evolução dos organismos, podem ser consistentemente estudados mediante as características cromossômicas das espécies tais como número, posição do centrômero, dimensão absoluta e relativa, quantidade e distribuição da heterocromatina e posição de Regiões Organizadoras de Nucléolo.

No início, os estudos citogenéticos sobre peixes foram pouco informativos por causa de seus cromossomos pequenos e numerosos. No entanto, usando novas técnicas, os estudos citogenéticos contribuíram significativamente para o estudo das relações evolutivas da ictiofauna, permitindo resolver problemas difíceis de elucidar apenas com taxonomia clássica.

Assim, o objetivo deste trabalho é estabelecer as relações carioevolutivas das espécies chilenas do gênero *Cheirodon* e inferir sua posição filogenética em relação a outros Cheirodontinae. Para isso, são descritos e comparados os cromossomos das cinco espécies do gênero *Cheirodon*, presentes no Chile, segundo seu número, morfologia, bandas C para heterocromatina constitutiva, Regiões Organizadoras do Nucléolo e Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) para a localização cromossômica de sondas de DNAr 5S e 18S.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Aspectos gerais da ictiofauna límnic do Chile

Os peixes representam cerca da metade de todas as espécies de vertebrados existentes (POUGH; JANIS; HEISER, 2003). A importância deste grupo não é apenas como fonte de alimento ou, no caso de algumas espécies, como modelos para estudos evolutivos e biomédicos (BRAASCH et al., 2016). Sua importância como grupo é, num sentido amplo, em relação a sua antiguidade, diversidade e papel ecológico nos habitats aquáticos, especialmente nas águas doces, recurso escasso e altamente vulnerável à ação humana (HABIT; DYER; VILA, 2006b).

Na região Neotropical, o Chile é caracterizado por apresentar uma diversidade de peixes límnicos relativamente baixa, sendo composto por 11 famílias, 17 gêneros e 44 espécies. No entanto, seu grau de endemismo e retenção de características primitivas tornam este um conjunto ictiofaunístico de alto valor biogeográfico e de conservação (HABIT; DYER; VILA, 2006b). Infelizmente, o tamanho pequeno, a simplicidade morfológica e a escassa coloração da maioria das espécies de peixes de água doce chilenas tem contribuído para a falta de conhecimento sobre eles. Assim, o desenvolvimento da pesca esportiva tem sido associado principalmente com espécies introduzidas como salmonídeos e com exceção de uma ou duas espécies nativas, muitas outras passam despercebidas além de ter problemas de conservação (VILA; PARDO, 2008).

Para entender as particularidades da ictiofauna límnic chilena é preciso revisar as características hidrogeográficas do Chile. Na América do Sul, o Chile se estende quase em linha reta ao longo de 38 graus de latitude (de 18°S para 56°S), o que gera um gradiente climático com rios de baixo fluxo no extremo norte, que aumenta consideravelmente para o sul. Além disso, a distância média entre as montanhas e a costa são 180 quilômetros somente (com uma mínima de 90km e uma máxima de 445 km). Estas características geográficas determinaram que as bacias hidrográficas do Chile sejam curtas, o que, somado ao fato de ter nascido acima de 3.000 metros, geram rios de baixa ordem, com redes de água

subdesenvolvidos e altamente dependentes das chuvas e queda de neve. Além disso, devido ao elevado declive dos rios, os peixes são incapazes de subir, limitando a distribuição do seu habitat para altitudes abaixo dos 1000-1500 metros acima do nível do mar (VILA; PARDO, 2008).

Por outro lado, o Chile continental apresenta um alto nível de isolamento geográfico, determinado pelo Deserto do Atacama ao norte, a Cordilheira dos Andes a leste, e o Oceano Pacífico a oeste (Figura 1). Este isolamento, juntamente com ausência de conexões internas entre as bacias, determinaram uma ictiofauna única com espécies basais, altamente especializadas e com 54% de endemismo (24 de 44 espécies), que poderia ter evoluído desde o início do Terciário de latitudes mais tropicais. Os grupos predominantes são os Siluriformes como *Nematogenys* e *Diplomystes* e os Characiformes representados pelo gênero *Cheirodon* (VILA; PARDO, 2008).

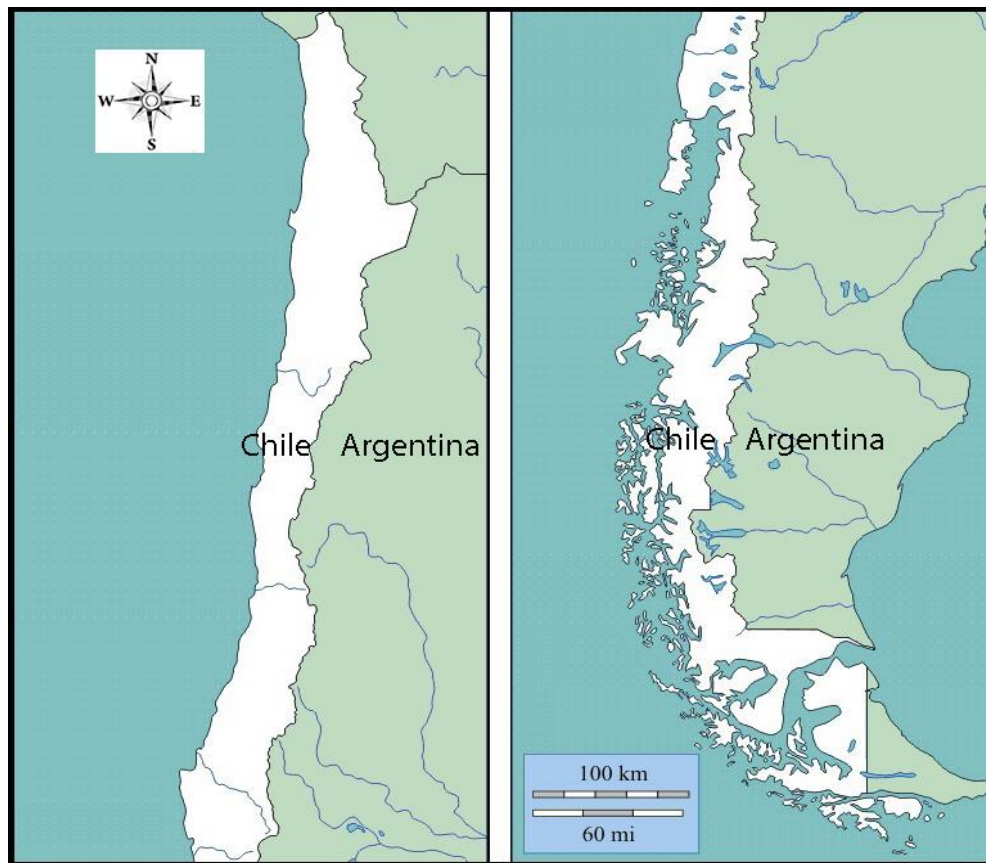


Figura 1 – Mapa do Chile e algumas das suas principais bacias. Observe-se a descontinuidade entre as bacias chilenas e as argentinas.

2.2. Estado atual da sistemática do gênero *Cheirodon*

Cheirodontinae é uma subfamília de peixes da família Characidae constituída por 16 gêneros abundantes nas águas lânticas e de planície das bacias hidrográficas da América do Sul e Central e são os únicos membros da ordem dos Characiformes encontrados nas águas do declive ocidental dos Andes, no Chile. Entre as características da subfamília *Cheirodontinae* foram mencionadas: dentes com variável número de cúspides, conjunto de dentes únicos no pré-maxilar, um hiato triangular (pseudotímpano) formado pelos músculos que recobrem a bexiga natatória (Figura 2) e ausência de uma mancha escura na região umeral (Figura 3). A maioria das espécies é pequena, com adultos atingindo 30-40 mm de comprimento padrão, no máximo (MALABARBA, 2003).

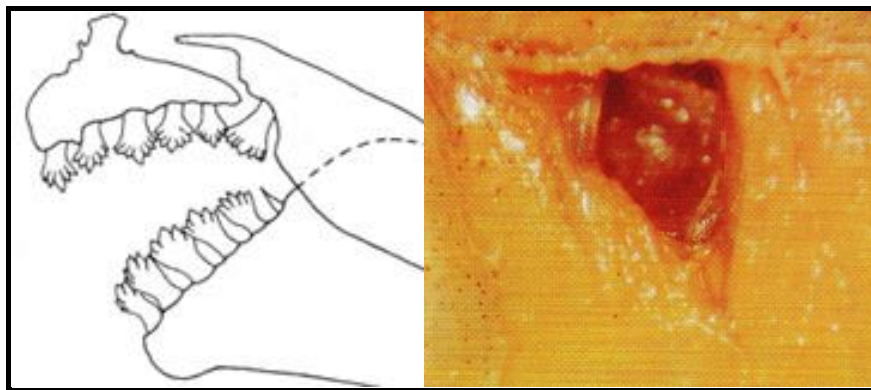


Figura 2- Detalhe de algumas características da subfamília *Cheirodontinae*: Dentes (esquerda) e pseudotímpano (direita)

Cheirodon é o gênero tipo da subfamília *Cheirodontinae*. As características principais do gênero *Cheirodon* são resumidas por Eigenman (1928) na presença de uma única linha de dentes inseridos nas mandíbulas (Figura 2), linha lateral incompleta, escamas simples na base da nadadeira caudal e espinhos nos machos. Destes o carácter mais constante é a posição dos dentes em linha única nas mandíbulas (CAMPOS, 1982). Também é descrita a presença de espinhos na nadadeira pélvica tanto em machos como em fêmeas (menores nestas), o que os diferencia de outros gêneros (MALABARBA, 1998) (Figura 3).

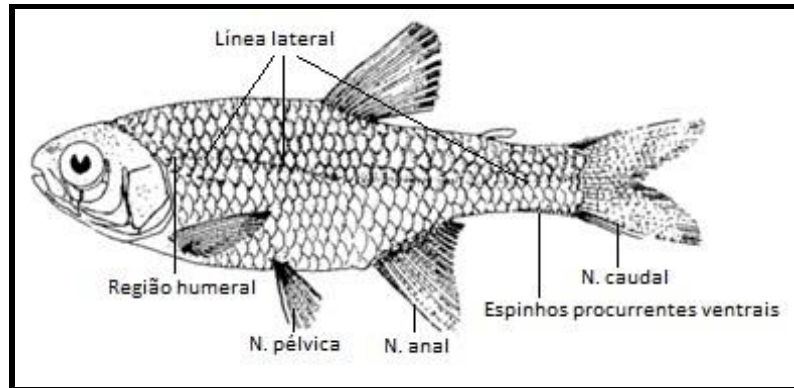


Figura 3 – Peixe do gênero *Cheirodon* (*C. pisciculus*) e algumas referências anatômicas.

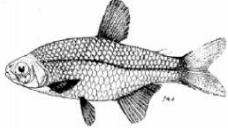
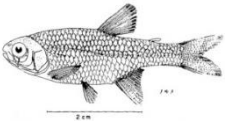
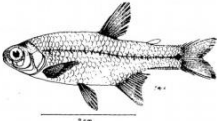
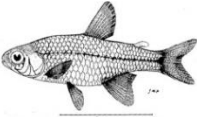
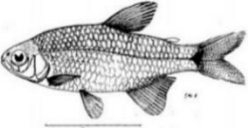
As espécies de *Cheirodon* são encontradas em drenagens atlânticas da Argentina, Uruguai e Brasil (entre 27° e 40° S) e drenagens do Pacífico do Chile (entre 28° e 42° S) (MALABARBA, 1998). Assim, a distribuição desses peixes compreende a parte sul da distribuição dos Cheirodontinae: leste e oeste dos Andes, na Argentina e no Chile (MARIGUELA et al., 2013).

2.3. As espécies de *Cheirodon* no Chile (as “pochas”)

No Chile, são reconhecidas cinco espécies do gênero *Cheirodon*, popularmente conhecidos como “pochas” das quais *Cheirodon pisciculus*, *C. galusdae*, *C. australe* e *C. kiliani* são considerados nativos e *C. interruptus* (CAMPOS, 1982; HABIT; DYER; VILA, 2006b; VILA; HABIT, 2015). Esta última tem uma distribuição original na Argentina, Brasil e Uruguai (MALABARBA, 2003).

Campos (1982) publicou um estudo que descreve em detalhe as características morfológicas das espécies do gênero *Cheirodon* do Chile. Além disso, o autor descreveu a nova espécie *C. kiliani*. A seguir, uma comparação de algumas características morfológicas de cada uma dessas espécies segundo aquele estudo (Quadro 1) e as localidades onde elas foram encontradas no Chile (Figura 4) e na Argentina, Uruguai e Brasil, no caso de *C. interruptus* (Figura 5).

Quadro 1 - Características morfológicas das espécies do gênero *Cheirodon* no Chile, segundo Campos (1982). À esquerda, um esboço de cada uma das espécies, onde a linha abaixo de cada diagrama mostra 2 cm.

Espécie	Espinhas procurrentes ventrais	Região predorsal	Cúspides dentais (n° predominante)	Comprimento (mm)	Outras características
 <i>Cheirodon interruptus</i>	Em quase todo o pedúnculo caudal	escamosa	5 (4-7)	padrão: 29,4 - 43,4 máximo: 60	Perfil da nadadeira anal visivelmente côncavo
 <i>Cheirodon pisciculus</i>	Na metade do pedúnculo caudal	poco escamosa	5	padrão: 23-48,5 máximo: 68	Raio mais longo da nadadeira anal atinge o último raio
 <i>Cheirodon galusdae</i>	Em quase todo o pedúnculo caudal	escamosa	5	padrão: 33 - 51 máximo: 62,5	Muito semelhante a <i>Cheirodon australe</i>
 <i>Cheirodon kiliani</i>	Na metade do pedúnculo caudal	poco escamosa	3	padrão: 24 - 32,4 máximo: 39,6	Nadadeira peitoral atinge a nadadeira pélvica
 <i>Cheirodon australe</i>	Em quase todo o pedúnculo caudal	escamosa	3	padrão: 29-52 máximo: 70	Raio mais longo da nadadeira anal não atinge o último raio. Terceiro suborbital atinge o preopérculo.

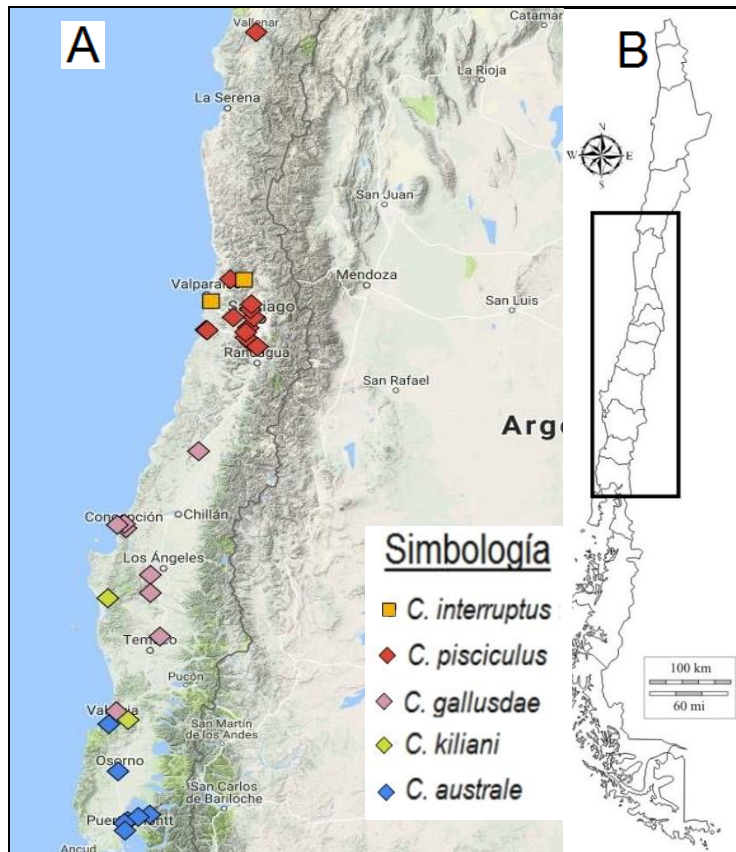


Figura 4 – A: Localidades onde os peixes do gênero *Cheirodon* foram encontrados no Chile segundo CAMPOS (1982); **B:** Área de abrangência dos peixes do gênero *Cheirodon* no Chile continental segundo CAMPOS (1982).

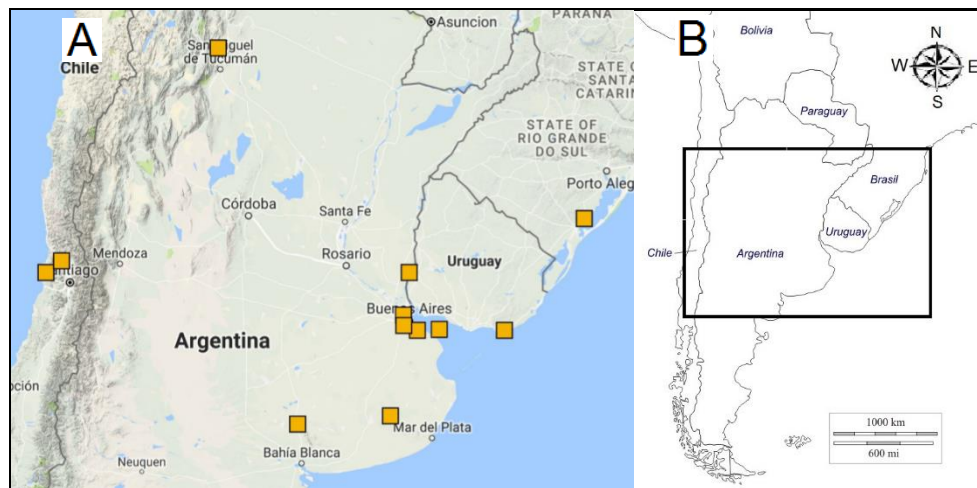


Figura 5 - A: Localidades onde os *Cheirodon interruptus* foram encontrados no Chile, Argentina, Uruguai e Brasil (CAMPOS, 1982; MARIGUELA et al., 2013). **B:** Área de abrangência do *Cheirodon interruptus* no América do Sul (CAMPOS, 1982; MALABARBA, 2003).

2.4. Relações evolutivas entre os *Cheirodon* chilenos

Aqui são revistos os resultados de três estudos sobre as relações evolutivas entre os *Cheirodon* chilenos.

2.4.1. Segundo Campos (1982)

Campos (1982) fez uma análise estatística para observar as relações de similaridade entre as espécies descritas no seu trabalho segundo 33 características, das quais 21 foram morfométricas tais como os comprimentos: total, predorsal, prepectoral, prepélvico, preanal, do pedúnculo caudal, da cabeça, altura do corpo, etc. Os outros 12 restantes foram caracteres merísticos como número de: escamas na linha lateral, escamas predorsais, raios procurrentes ventrais da nadadeira caudal, cúspides dentais, etc.

Assim, segundo este estudo, as cinco espécies evidenciaram elevada similaridade, formando dois grupos distintos, um incluindo *C. kiliani*, *C. pisciculus* e *C. galusdae*, o outro com *C. interruptus* e *C. australe*. O primeiro agrupamento é formado por *C. kiliani* e *C. pisciculus* apesar de estarem muito distantes geograficamente, o que poderia ter uma explicação filogenética. Neste grupo, *C. pisciculus* aparece um pouco longe de *C. galusdae* mesmo sendo geograficamente vizinha e ainda mais distante de *C. australe* que pertence ao outro grupo, localizado mais ao sul (Figura 6).

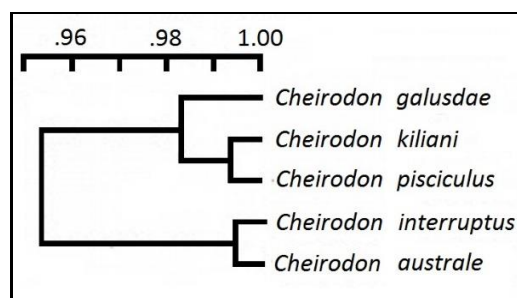


Figura 6 – Dendrograma de cinco espécies de *Cheirodon* do Chile, baseado em 33 características morfométricas e merísticas (CAMPOS, 1982).

2.4.2. Segundo Salas; Véliz e Scott (2012)

Além dos estudos de Campos (1982), uma outra análise foi realizada mais recentemente por Salas; Véliz e Scott (2012) levaram em consideração a

morfometria tradicional juntamente com morfometria geométrica de caracteres externos nas espécies *C. pisciculus*, *C. interruptus*, *C. galusdae* e *C. australe* (não foi incluído *C. killiani*).

Para a morfometria tradicional foram consideradas 14 medidas morfológicas como as usadas por Campos (1982), e para morfometria geométrica foi considerada a localização de 17 pontos anatômicos.

Tanto na morfometria tradicional como na geométrica, os caracteres associados com o arranjo das nadadeiras e medidas relacionadas com a cabeça, altura do corpo e pedúnculo caudal foram importantes para a diferenciação. De acordo com estas análises *C. interruptus* e *C. australe* também foram as mais semelhantes (Figura 7), mesmo sendo ambas as mais distantes geograficamente.

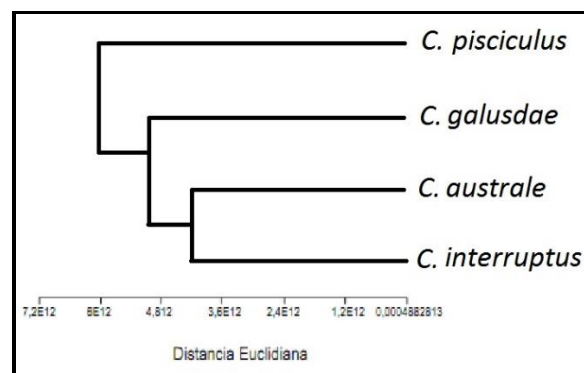


Figura 7 - A análise de agrupamento usando consenso individual de análises de morfometria geométrica (SALAS; VÉLIZ E SCOTT, 2012).

2.4.3. Segundo Mariguela et al. (2013)

Mais recentemente, análises de DNA nuclear (genes Myh6, Rag1 e Rag2) e mitocondrial (genes 16SrRNA e Cytb) foram feitas para várias espécies de Cheirodontinae, incluindo alguns *Cheirodon* chilenos, por Mariguela et al. (2013). Segundo este estudo, o gênero *Cheirodon* é monofilético, mas não foram observados dois grupos de *Cheirodon* distintos separados pela Cordilheira dos Andes. Assim, segundo estas análises, o *C. australe* (Chile) foi o grupo irmão de *C. interruptus* (Rio Grande do Sul, Brasil) (Figura 8). Além disso a relação filogenética de *C. killiani* como a espécie irmã do clado formado por *C. australe* e *C. interruptus*

corroborar as hipóteses morfológicas de Campos (1982). No entanto, nesta análise não foram considerados *C. pisciculus* nem *C. galusdae*.

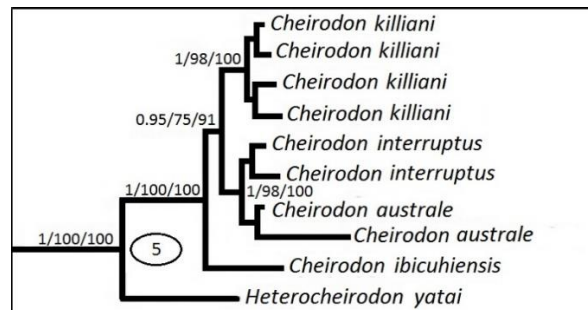


Figura 8 - Detalhe do melhor ML árvore, segundo análise de DNA nuclear e mitocondrial (MARIQUELA et al., 2013).

2.5. Análises dos cromossomos em peixes

Salas; Véliz e Scott (2012), mencionam que os estudos morfológicos são úteis para a identificação de espécies, tanto para trabalhos científicos quanto para estudos de impacto ambiental. No entanto, estes autores também mostram a dificuldade de estabelecer caracteres fenotípicos diagnósticos para classificar populações de *Cheirodon* claramente devido em parte, à grande semelhança interespecífica evidenciada por eles.

Caracteres como o número de cúspides dos dentes, têm sido utilizados para discriminar as espécies de *Cheirodon*; no entanto, eles podem variar entre e dentro de cada espécie, o que normalmente leva a erros na identificação com base nesta característica (CAMPOS, 1982). Malabarba (1998) também expressa essa dificuldade e menciona "caracteres lábeis" para se referir àqueles que foram usados para diagnóstico sendo estes adquiridos e perdidos muitas vezes, de forma independente, por várias linhagens de Characideos.

Outra ferramenta útil para gerar informação importante para a distinção de espécies de peixes é a citogenética. No início, os estudos citogenéticos de peixes foram pouco informativos e tediosos porque as metáfases obtidas eram de má qualidade para a análise por causa de seus cromossomos pequenos e numerosos em relação aos mamíferos. No entanto, usando novas técnicas, a citogenética contribuiu significativamente para o estudo das relações e classificação da

ictiofauna, permitindo resolver problemas difíceis de elucidar apenas com taxonomia clássica (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2014). Assim, os estudos citogenéticos servem para completar, reforçar e ocasionalmente corrigir resultados de outros estudos taxonômicos baseados em dados morfológicos, moleculares, biogeográficos, etc. (WALKER, 1993).

Nirchio e Oliveira (2014), mencionaram exemplos para as famílias de peixes Mugilidae, Gymnotidae, Haemulidae, Ariidae, Characidae, Parodontidae e Pimelodidae, onde o poder da citogenética é demonstrado como uma ferramenta auxiliar na distinção de grupos taxonômicos de difícil diagnóstico. Assim, as características cromossômicas tais como posição do centrômero, número, tipo e posição de Regiões Organizadoras de Nucléolo, dimensão absoluta e relativa dos cromossomos, quantidade e distribuição de heterocromatina, oferecem valiosas contribuições para a resolução de problemas taxonômicos, evolutivos e aplicados (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2014).

Os estudos publicados até esta data mostram que os cromossomos dos peixes têm, em geral, entre 1 e 6 microns de comprimento (pequenos em comparação com os cromossomos de outros grupos de vertebrados) e um número diplóide que varia de $2n = 12$ em *Gonostoma bathyphylum* (POST, 1974 apud PAEPKE, 2008) a $2n = 446$ em *Diptychus dipogon* (JIANXUN; XIUHAI; QIXING, 1991). A variabilidade cariotípica verificada nesses estudos revela a necessidade de analisar sistematicamente os grupos de peixes naturais, tendo em conta a sua distribuição geográfica e a utilização máxima das técnicas e métodos disponíveis (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

Como particularidade, cinco sistemas de determinação de sexo diferentes foram detectados em peixes neotropicais: ZZ/ZW, XX/XY, X1X1X2X2/X1X2Y, XX/XY1Y2 e ZZ/ZW1W2, cada um caracterizado por certas linhas gerais de eventos evolutivos. Análises mais aprofundadas com um maior número de espécies de peixes poderiam fornecer informações interessantes para os fins de uma melhor compreensão da heterogeneidade nos mecanismos de determinação do sexo e processos evolutivos envolvidos em tais diferenciações (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

3. Justificativa e objetivos

No caso dos representantes de Cheirodontinae, os dados cariotípicos disponíveis são escassos e frequentemente representados apenas pela identificação do número diplóide de alguns gêneros como *Paracheirodon*, *Odontostilbe* e *Holoshestes* com $2n=52$ cromossomos (OLIVEIRA et al., 1988; NISHIYAMA, P.B.; MARTINS-SANTOS, 1996; WASKO et al., 2001) e sem uma descrição das características cromossômicas com aplicação de técnicas de bandeamento (DE SOUZA PAIVA, 2007). No caso do gênero *Cheirodon*, foi descrito para *C. notomelas* um $2n$ de 52 cromossomos e um sistema de diferenciação sexual de tipo ZZ/ZW por Nishiyama, P.B. e Martins-Santos (1996). No entanto a espécie *C. notomelas* passou a ser considerada pertencente ao gênero *Serrapinnus* (MALABARBA, 1998), deixando novamente aberta a pergunta sobre a citogenética do gênero *Cheirodon*.

Embora para os *Cheirodon* chilenos tenham sido realizadas as mencionadas análises morfológicas (CAMPOS, 1982; SALAS; VÉLIZ; SCOTT, 2012) e moleculares (MARIGUELA et al., 2013), no Chile o estado do conhecimento da biologia e ecologia dos peixes de água doce é ainda incompleto (VILA; HABIT, 2015). Sobre o estado de conservação destas espécies, segundo Campos et al. (1998), *C. pisciculus* e *C. galusdae* são vulneráveis, *C. kiliani* rara e *C. australe* estaria fora de perigo, mas esta última possui dados insuficientes segundo a IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais) sugerindo a necessidade de aprofundar o seu conhecimento.

Além disso, as análises morfológicas e moleculares realizadas para os *Cheirodon* chilenos mostram relações filogeneticamente mais próximas entre espécies que não são necessariamente mais próximas geograficamente. É notável por exemplo que *C. australe* foi mais relacionada morfológica e geneticamente com *C. interruptus* do que as espécies geograficamente mais próximas como *C. kiliani* ou *C. galusdae* mesmo sendo simpátricas na área de Valdivia (Figura 4). Portanto, é necessário aprofundar neste assunto e realizar testes adicionais e a análise citogenética oferece uma boa oportunidade nesse sentido.

Objetivo Geral

-Estabelecer as relações carioevolutivas entre espécies chilenas do gênero *Cheirodon* e inferir sua posição filogenética em relação a outros Cheirodontinae.

Objetivos específicos

- Descrever citogeneticamente as espécies do gênero *Cheirodon* no Chile.
- Comparar os cariótipos das espécies do gênero *Cheirodon* no Chile.
- Inferir possíveis rearranjos cromossômicos entre os cariótipos das espécies analisadas.
- Contrastar os dados obtidos com estudos moleculares e morfológicos disponíveis para espécies do gênero *Cheirodon* no Chile.
- Testar uma nova técnica de obtenção de cromossomos para Cheirodontinae.

4. Material e métodos

4. 1. Material biológico e locais de coleta

Foram estudadas diferentes espécies pertencentes ao gênero *Cheirodon* provenientes de bacias hidrográficas chilenas. Os locais de coletas foram escolhidos levando em consideração os dados de Campos (1982) (Figura 4).

Antes de prosseguir com as coletas, foi necessário solicitar uma autorização para pesca de investigação à Subsecretaria de Pesca e Aquicultura do Governo do Chile, segunda *Lei Geral de Pesca e Aquicultura Nº. 18.892 (CHILE, 1989)*, Decreto Supremo Nº 461 do Ministério de Economia, Fomento e Reconstrução (CHILE, 1995). A autorização foi aprovada segundo resolução Nº740 da Subsecretaria de Pesca e Aquicultura (CHILE, 2016) (anexo 4), e de acordo com ela, antes de cada coleta foi necessário notificar pelo menos com dois dias de antecedência ao Serviço Nacional de Pesca e Aquicultura (SERNAPESCA), mais próximo ao ponto de coleta.

Os exemplares foram coletados com puçás nas localidades e coordenadas mostradas no quadro 2. Assim, 15 exemplares por espécie foram coletados entre a V região de Valparaíso e a X região de Los Lagos do Chile (Figura 9), transportados vivos e mantidos em aquários até sua utilização em análises de citogenética e banco de tecidos. Exemplares representativos das diferentes espécies (Figura 10) foram anestesiados e posteriormente etiquetados e conservados em álcool 95%, para sua identificação pelo Dr. Luiz Roberto Malabarba, especialista da sistemática e taxonomia deste grupo de peixes. Após a identificação, os exemplares testemunhos foram depositados no Museu da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, com os Vouchers UFRGS 22295 (*C. interruptus*), UFRGS 22296 (*C. galusdae*), UFRGS 22297 (*C. pisciculus*), UFRGS 22298 (*C. kiliani*), UFRGS 22299 e UFRGS 22300 (*C. australe*).

Quadro 2 – Locais específicos onde os *Cheirodon* foram coletados. Cada cor representa uma espécie.

Espécie		Pontos de coleta			
Nome científico	Nome comum	Bacia	Localidade	Região do Chile	Coordenadas GPS (UTM)
<i>Cheirodon interruptus</i>	Pocha	Estero Marga-Marga	Viña del Mar	V	19H 0263800.90 m E 6342166.09 m S
<i>Cheirodon pisciculus</i>	Pocha	Rio Angostura	Hospital	Metropolitana	19H 0338122.17 m E 6250729.69 m S
<i>Cheirodon galusdae</i>	Pocha de los Lagos	Rio Andalién	Concepción	VIII	18H 0682055.00 m E 5925386.00 m S
<i>Cheirodon kiliani</i>	Pochita	Rio Calle-Calle (San Pedro)	Antilhue	XIV	18H 0674363.00 m E 5592270.00 m S
<i>Cheirodon australe</i> *	Pocha del Sur	Rio Calle-Calle (San Pedro)	Antilhue	XIV	18H 0674363.00 m E 5592270.00 m S
<i>Cheirodon australe</i>	Pocha del Sur	Lagoa La Poza, Lago Llanquihue	Puerto Varas	X	18G 0679651.18 m E 5428179.56 m S

*Em simpatria com *Cheirodon kiliani*

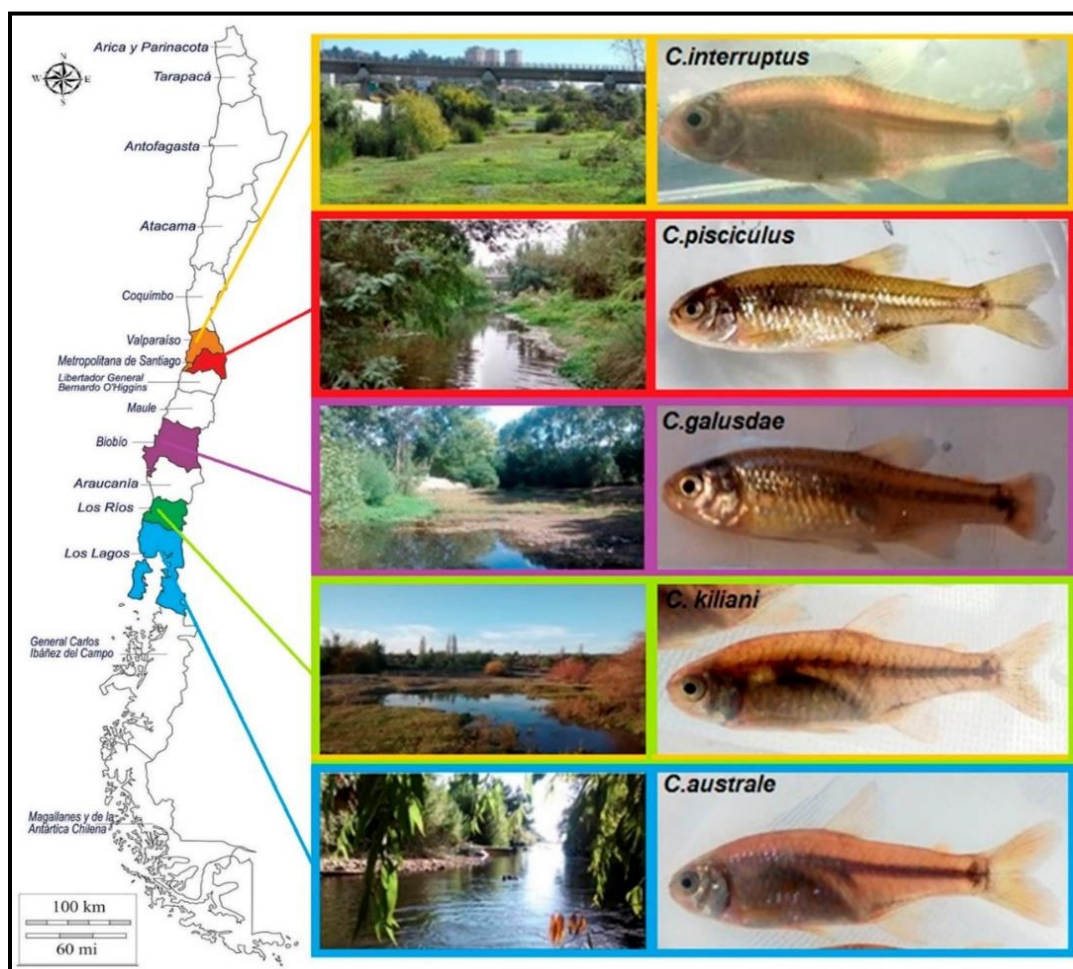


Figura 9 – Regiões de Chile e suas respectivas bacias e espécies de *Cheirodon* coletadas.

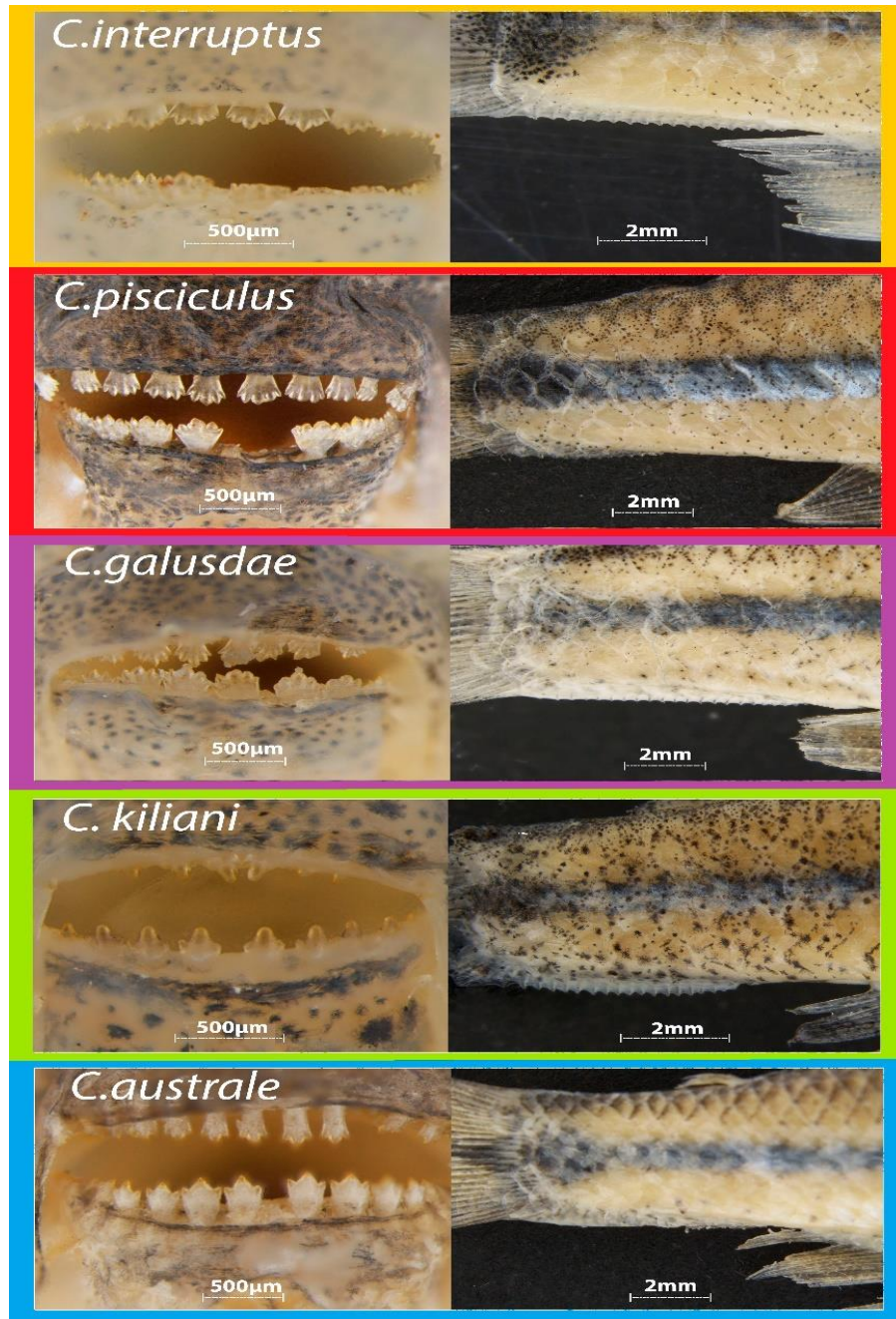


Figura 10 – Peixes do gênero *Cheirodon* e suas respectivas combinações de dois caracteres (morfologia dental, à esquerda e raios procurrentes ventrais, à direita).

4. 2. Estudos Citogenéticos

4. 2. 1. Citogenética Convencional

As preparações cromossômicas, foram obtidas de células de nadadeira em regeneração, segundo o protocolo de Kalous; Knytl e Krajáková (2010) (anexo 1).

As lâminas obtidas foram coradas com Giemsa (anexo 2.1.) para obtenção do número diplóide modal ($2n$) e as morfologias cromossômicas segundo critérios de Levan; Fredga e Sandberg (1964) (anexo 2.2.). As amostras cromossômicas obtidas foram analisadas no Laboratório de Citogenética Evolutiva da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile.

Posteriormente as amostras foram levadas ao Laboratorio de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa e utilizadas para a detecção das regiões organizadoras de nucléolos ativas (Ag-RONs) segundo as metodologias de Howell e Black (1980) (anexo 2.3) e para verificação do padrão de bandas C segundo Sumner (1972), adaptado por Lui et al. (2012) (anexo 2.4) e segundo tratamento com formamida e DAPI invertido obtidos do protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986) (anexo 3).

4. 2. 2. Citogenética Molecular: Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A partir de preparações de células mitóticas pré-fixadas, foi feita a hibridação *in situ* (FISH) para a localização cromossômica de sondas de DNAr 5S e 18S segundo Pinkel; Straume e Gray (1986) (anexo 3).

4. 2. 3. Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus® Bx41. As preparações com hibridação *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados. As imagens foram capturadas utilizando câmera CCD DP71 12mp com o software DP Controller (Olympus®). Um total de 30 metáfases para cada técnica foram analisadas por indivíduo e ao menos 10 exemplares (cinco machos e cinco fêmeas) de cada espécie amostrada foram analisados para caracterização do cariótipo padrão. Foi utilizado o programa Adobe Photoshop para montagem dos cariótipos e o programa Easy Idio 1.0 (DINIZ; MELO, 2006) para a construção de ideogramas.

5. Resultados

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico.

Capítulo I: Citogenética comparada em peixes do gênero *Cheirodon* (Ostariophysi: Characidae), com foco em espécies transandinas.

Resumo

Dentro da grande biodiversidade de peixes de água doce de América do Sul, a família Characidae tem sido um dos grupos mais controversos taxonomicamente. No país transandino Chile, a família é representada apenas pelos Cheirodontinae do gênero *Cheirodon* e suas cinco espécies, das quais, *C. pisciculus*, *C. galusdae*, *C. kiliani* e *C. australe* são endêmicas, enquanto *C. interruptus* é introduzida e originária das bacias de Argentina, Uruguai e Brasil. Neste estudo são descritos pela primeira vez os cariótipos destas cinco espécies e comparados segundo seu número diplóide, morfologia, bandas C, Regiões Organizadoras do Nucléolo (Ag-RON) e a localização cromossômica de DNAr 5S e 18S por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Todas as espécies analisadas apresentaram um $2n=50$, variando na fórmula cariotípica entre $8m+6sm+4st+32a$ em *C. australe* e *C. kiliani*; e $6m+6sm+4st+34a$ em *C. galusdae*, *C. pisciculus* e *C. interruptus*. A presença e distribuição da heterocromatina constitutiva foi similar nas cinco espécies, sendo observada em centrômeros e telômeros. Foi observada variação no número e distribuição das regiões de DNAr 5S e 18S, podendo esses dois clusters estar em cromossomos diferentes ou em sintonia. Também foi observada variação na atividade das RONS, sendo encontrado em *C. kiliani* e em *C. galusdae*, o maior nível de atividade relativa. Existe maior similaridade cariotípica entre as duas espécies ocorrentes mais ao sul do que destas com as mais centrais e ao norte, mostrando um reflexo da distribuição geográfica das espécies estudadas.

Palavras-Chaves: Chile, Cheirodontinae, Cariótipo, Cromossomos.

Abstract

Within the great biodiversity of freshwater fish of South America, the Characidae family has been one of the most controversial groups taxonomically. In the trans-Andean country of Chile, the family is represented only by the Cheirodontinae of genus *Cheirodon* and its five species, of which *C. pisciculus*, *C. galusdae*, *C. kiliani* and *C. australe* are endemic, and *C. interruptus* is exotic and would come from the basins of Argentina, Uruguay and Brazil. In this study the karyotypes of these five species are described for the first time and compared by their diploid number, morphology, C bands, Organizing Regions of the Nucleolus (Ag-RON) and the chromosomal location of 5S and 18S DNAr by fluorescence in situ hybridization (FISH). All species analyzed presented a $2n = 50$, varying in the karyotype formula between $8m + 6sm + 4st + 32a$ in *C. australe* and *C. kiliani*; And $6m + 6sm + 4st + 34a$ in *C. galusdae*, *C. pisciculus* and *C. interruptus*. The presence and distribution of constitutive heterochromatin was similar in the five species, being observed in centromeres and telomeres. Variation in the number and distribution of the 5S and 18S DNAr regions was observed, being those two clusters on different chromosomes or in syntenia. It was also observed a variation in the activity of RONS, with the highest level of relative activity found in *C. kiliani* and *C. galusdae*. There is a greater karyotype similarity between the two species occurring more in the south than those with the most central and to the north ones, showing a reflection of the geographic distribution of the species studied.

Key words: Chile, Cheirodontinae, Chromosomes, Karyotype.

Introdução

Dentro da grande biodiversidade de peixes de água doce de América do Sul, a família Characidae tem sido um dos grupos mais controversos taxonomicamente (MALABARBA, 1998). No país transandino Chile, a família é representada apenas pelo gênero *Cheirodon* (HABIT; DYER; VILA, 2006; VILA; HABIT, 2015), cujas espécies são morfologicamente semelhantes, constituindo um desafio para classificação em nível específico (SALAS; VÉLIZ; SCOTT, 2012). As características hidrogeográficas e o grande isolamento natural do Chile, influenciaram a história evolutiva de uma ictiofauna pouco diversa, mas altamente endêmica e críptica (VILA; PARDO, 2008).

No Chile, as cinco espécies do gênero *Cheirodon* presentes são distribuídas em um sentido longitudinal sendo *Cheirodon pisciculus*, *Cheirodon galusdae*, *Cheirodon kiliani* e *Cheirodon australe* endêmicas do Chile (CAMPOS, 1982); enquanto *Cheirodon interruptus* é originária das bacias atlânticas da Argentina, Uruguai e Brasil (MALABARBA, 2003). Estas cinco espécies já foram estudadas segundo análises morfológicas e moleculares. No entanto, essas análises tendem a agrupar espécies geograficamente distantes como *C. australe* e o introduzido *C. interruptus* (CAMPOS, 1982; SALAS; VÉLIZ; SCOTT, 2012; MARIGUELA et al., 2013). Além disso, alguns dos caracteres morfológicos usados, podem variar entre e dentro de cada espécie o que normalmente leva a erros na identificação de populações de *Cheirodon* (MALABARBA, 1998). Por outro lado, as análises de sequência de DNA feitos nos *Cheirodon* chilenos não incluíram *C. pisciculus* nem *C. galusdae* (MARIGUELA et al., 2013).

Uma outra ferramenta útil para gerar informação significativa das relações evolutivas da ictiofauna é a citogenética (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2014) que estuda o cariótipo e seus cromossomos, base física dos genes (CÓRDOVA, J.H.; LAMAS, 1997). Assim, o objetivo deste trabalho é estabelecer as relações carioevolutivas das espécies chilenas do gênero *Cheirodon* e inferir sua posição filogenética em relação a outros Cheirodontinae. Para isso, são descritos e comparados os cariótipos das cinco espécies do gênero *Cheirodon*, presentes no Chile.

Material e métodos

Material biológico e locais de coleta

Foram coletados 75 exemplares das espécies *C. interruptus* (Estero Marga-Marga, Viña del Mar, V região, Chile, coordenadas 19H 0263800.90 UTM E - 6342166.09 UTM S), *C. pisciculus* (Rio Angostura, Hospital, região Metropolitana, Chile, coordenadas 19H 0338122.17 UTM E - 6250729.69 UTM S), *C. galusdae* (Río Andalién, Concepción, VIII região, Chile, coordenadas 18H 0682055.00 UTM E - 5925386.00 UTM S), *C. kiliani* (Rio Calle-Calle, Antilhue, XIV região, Chile, coordenadas 18H 0674363.00 UTM E - 5592270.00 UTM S) e *C. australe* (Lagoa La Poza, desembocadura Lago Llanquihue, Puerto Varas, X região, Chile, coordenadas 18G 0679651.18 UTM E - 5428179.56 UTM S). O trabalho recebeu autorização da Subsecretaria de Pesca e Aquicultura do Governo do Chile (SUBPESCA) e Serviço Nacional de Pesca e Aquicultura do Governo do Chile (SERNAPESCA) parecer no. 740.

Exemplares representativos dos diferentes morfotipos foram anestesiados e posteriormente etiquetados e conservados em álcool 95% para identificação taxonômica. Os exemplares testemunhos foram fotografados em Estereomicroscópio Leica M205C para observação das cúspides dos dentes e espinhos procurrentes ventrais e depositados no Museu da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, com os Vouchers UFRGS 22295 (*C. interruptus*), UFRGS 22296 (*C. galusdae*), UFRGS 22297 (*C. pisciculus*), UFRGS 22298 (*C. kiliani*), UFRGS 22299 e UFRGS 22300 (*C. australe*).

Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas de células de nadadeira em regeneração segundo o protocolo de Kalous; Knytl e Krajáková (2010). Para a obtenção dos números, tamanhos e morfologias cromossômicas, as lâminas obtidas foram coradas com o método de coloração convencional de Giemsa. Para a obtenção das regiões organizadoras de nucléolos ativas (Ag-RONs) foi aplicado o protocolo de Howell e Black (1980). O padrão de bandas C foi obtido segundo

Sumner (1972), adaptado por Lui et al. (2012) e segundo tratamento com formamida e DAPI invertido, obtido do protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986).

A hibridação *in situ* (FISH) para a localização cromossômica de sondas de DNAr 5S e 18S foi feita segundo protocolo de Pinkel; Straume e Gray (1986) em alta estringência. Para a identificação das regiões de DNAr 18S e 5S, utilizou-se uma sonda marcada de 18S, obtida pelo DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2004), usando os primers NS1 5'-GTAGT CATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTC ACCTACGGA-3' (WHITE et al., 1990) e a sonda 5S, a partir de DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) obtida usando os primers A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (MARTINS; GALETTI, 1999). A marcação da sonda 18S foi feita pelo kit Biotin Nick Translation (Roche), e a de 5S pelo kit Dig Nick Translation (Roche) seguindo-se as informações do fabricante.

Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus® Bx41. As preparações com hibridação *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados. As imagens foram capturadas utilizando câmera CCD DP71 12mp com o software DP controler (Olympus®). Ao menos 10 exemplares (cinco machos e cinco fêmeas) de cada espécie amostrada foram analisados para caracterização do cariótipo padrão. Foi utilizado o programa Adobe Photoshop versão CC 2015 para montagem dos cariótipos e o programa Easy Idio 1.0 para a construção dos idiogramas.

Resultados

A aplicação da técnica de Kalous; Knytl; Krajáková (2010) permitiu obter metáfases de boa qualidade a partir de tecido de nadadeira em regeneração dos indivíduos estudados. Portanto, foi possível a primeira descrição citogenética das cinco espécies do gênero *Cheirodon* presentes no Chile através da aplicação

sucessiva das diferentes técnicas de coloração e bandeamento cromossômico. Para manter a qualidade dos cromossomos, os tratamentos foram aplicados nas preparações na seguinte ordem: primeiro coloração Giemsa, depois a Hibridação *in situ* Fluorescente, posteriormente o bandamento C e finalmente o bandamento AgNOR (Figura 1).

Para todas as espécies do gênero *Cheirodon* analisadas, o número diplóide foi de 50 cromossomos variando de forma sutil na fórmula cariotípica entre os tipos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelo-cêntricos (ST) e acrocêntricos (A) segundo Levan; Fredga e Sandberg (1964), e organizados no cariótipo em escala decrescente de tamanho (Tabela1, Figura 2).

Foi observada variação interespecífica no padrão das marcações FISH para DNAr 18S e 5S, podendo estar em cromossomos diferentes ou em sintenia. Ambas marcações foram observadas apenas nos cromossomos acrocêntricos, sendo localizadas as marcações 18S na região terminal (telomérica) dos braços largos (*q*) e as 5S na região pericentromérica, nos braços curtos (*p*), exceto no par 16, 21 e 25 em *C. australe* onde as marcações 5S também foram localizadas na região terminal dos braços largos (*q*) (Figuras 3A, 4A, 5A, 6A e 7A). Também foi observada variação intraespecífica relacionada com a presença ou ausência destas marcações em um ou nos dois cromossomos do mesmo par, especialmente na espécie *C. australe* onde foi observada a maior diferença intraespecífica na marcação de ambas regiões de DNAr. Por outro lado, as bandas NOR permitiram revelar o nível de atividade das regiões 18S, sendo encontrado em *C. galusdae* e *C. kiliani*, o maior nível de atividade relativa.

O padrão de bandas C também foi similar em quantidade e distribuição nas diferentes espécies, sendo detectada principalmente nos centrômeros e telômeros (Figuras 3B, 4B, 5B, 6B e 7B). Não foram reconhecidos cromossomos heteromórficos ligados ao sexo nas espécies estudadas.

A construção de ideogramas permitiu resumir as semelhanças e diferenças gerais nos cariótipos das cinco espécies em comparação (Figura 8).

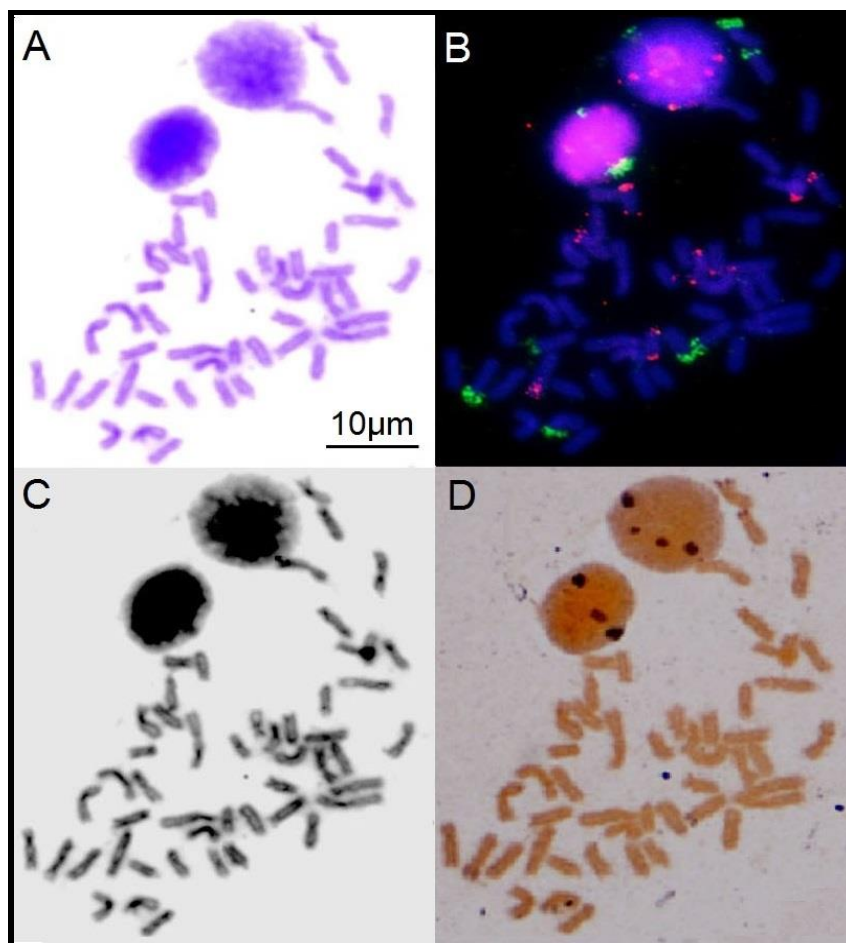


Figura 1 - Metáfase do exemplar macho de *Cheirodon australe* submetida a diferentes tratamentos. **A:** Coloração Giemsa, **B:** Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para regiões 18S (verdes) e 5S (vermelhas).; **C:** Bandas C; **D:** AgNOR.

Tabela 1 - Marcadores cromossômicos em espécies do gênero *Cheirodon*.

Espécie	2n, NF e Fórmula cariotípica	18S	5S	Sintenia <i>p</i> : 5S/ <i>q</i> : 18S	Ag-NORs ⁺
<i>C. interruptus</i>	2n=50, NF=66 6m+6sm+4st+34a	<i>q</i> :13, 17, 21	<i>p</i> : 13, 14, 18, 19, 24	13	<i>q</i> :13, 17, 21
<i>C. pisciculus</i>	2n=50, NF=66 6m+6sm+4st+34a	<i>q</i> :10, 11, 13, 15	<i>p</i> : 11, 17, 19, 21	11	<i>q</i> :11, 13, 15
<i>C. galusdae</i>	2n=50, NF=66 6m+6sm+4st+34a	<i>q</i> :11, 13	<i>p</i> : 11, 15, 16, 17, 21	11	<i>q</i> :11, 13
<i>C. kiliani</i>	2n=50, NF=68 8m+6sm+4st+32a	<i>q</i> :12, 14	<i>p</i> : 13, 14, 17, 20, 21, 22	14	<i>q</i> :12, 14
<i>C. australe</i>	2n=50, NF=68 8m+6sm+4st+32a	<i>q</i> :12, 13, 14, 15, 18	<i>p</i> : 10, 11, 13, 14, 15, 17, 21, 25 y <i>q</i> : 16, 21 e 25	13	<i>q</i> :10,12, 13, 14

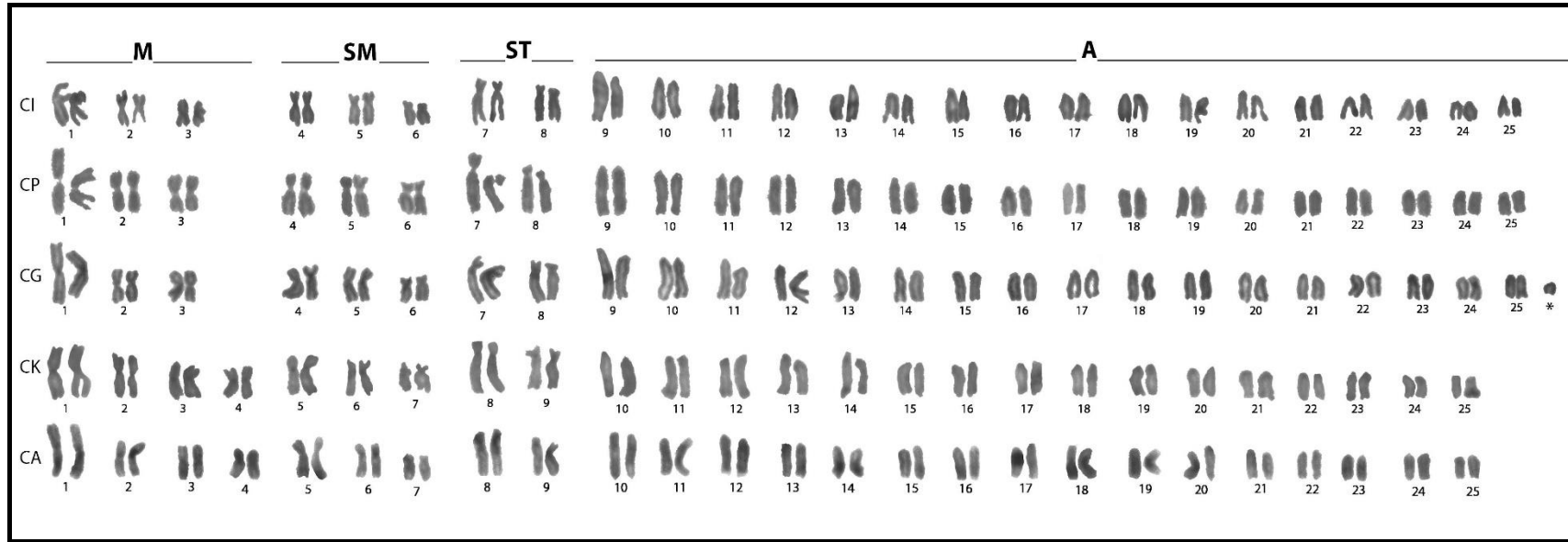


Figura 2 - Cariótipos das espécies do gênero *Cheirodon* presentes no Chile, *C. interruptus* (CI), *C. pisciculus* (CP), *C. galusdae* (CG), *C. kiliani* (CK), *C. australe* (CA) e seus respectivos cromossomos agrupados em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A).

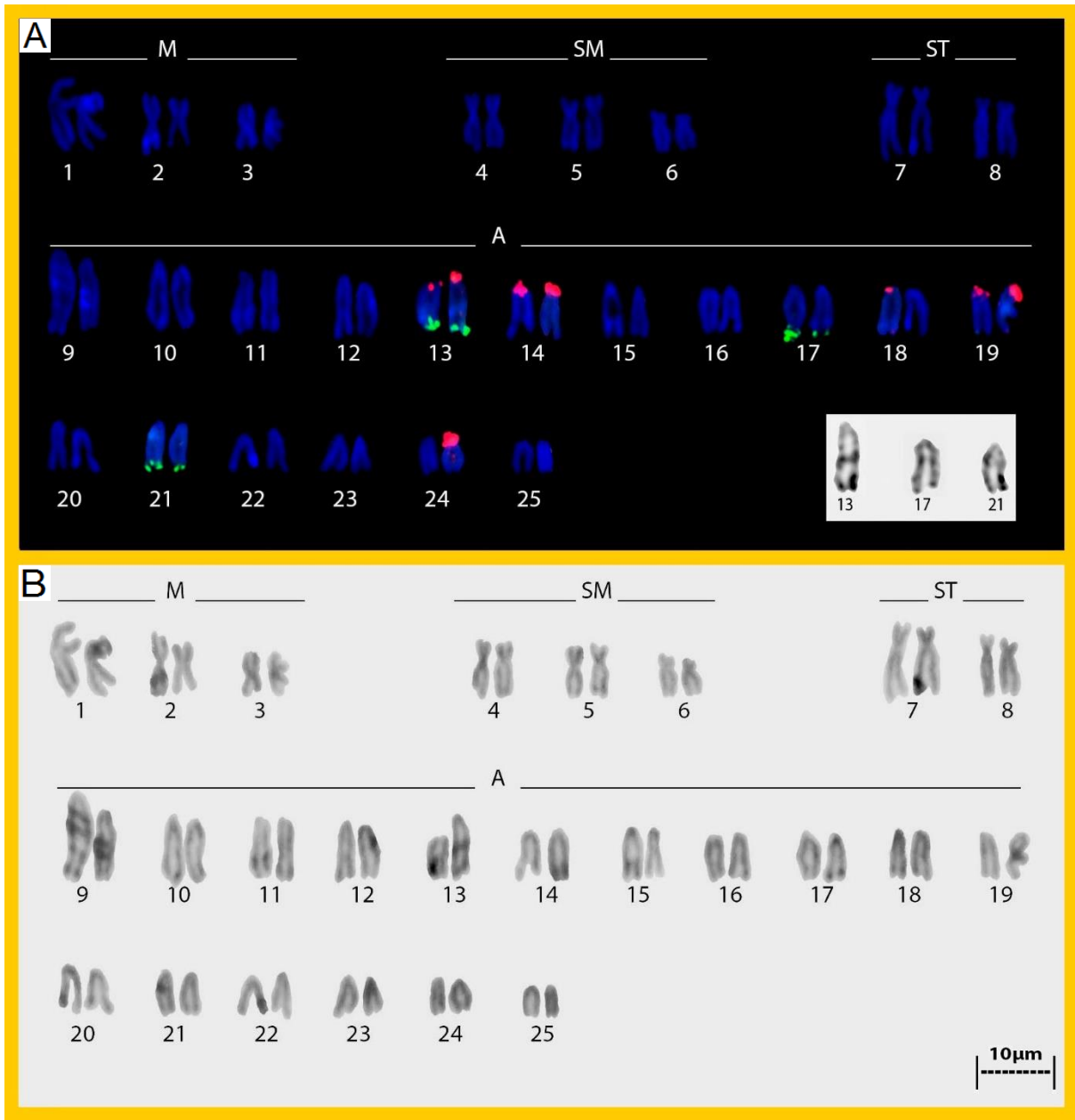


Figura 3 – Cariótipo de um exemplar de *C. interruptus* submetido a diferentes tratamentos. **A:** FISH para regiões 18S (verdes) e 5S (vermelho), com cromossomos Ag-NOR⁺ em destaque no quadro branco. **B:** bandas C⁺.

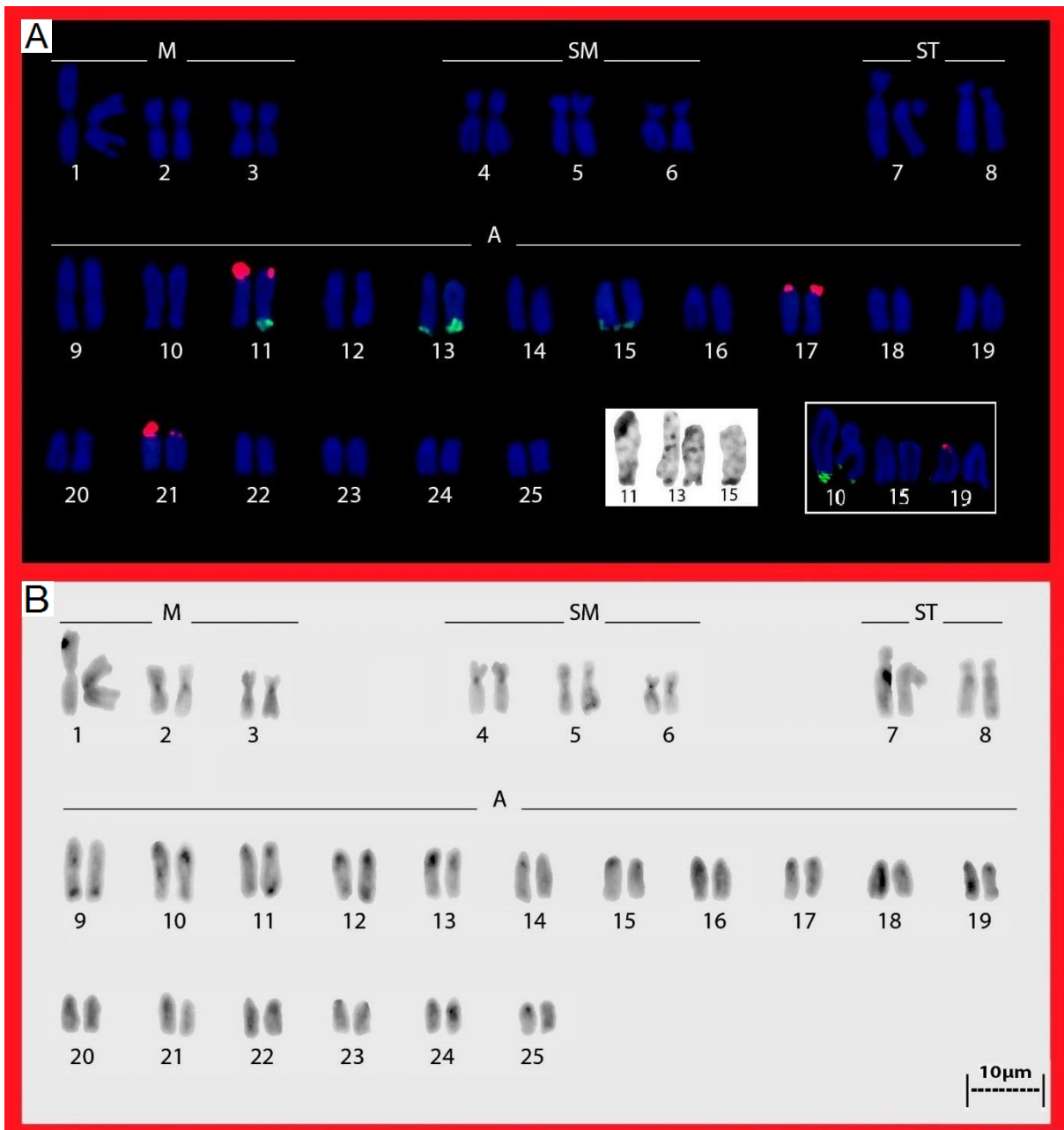


Figura 4 – Cariótipo de um exemplar de *C. pisciculus* submetido a diferentes tratamentos. **A:** FISH para regiões 5S (vermelho) e 18S (verdes), com seus cromossomos Ag-NOR⁺ em destaque no quadro branco. No quadro preto são mostrados os pares cromossômicos de outro indivíduo da mesma espécie que evidenciaram marcações DNAr variantes. **B:** bandas C⁺.

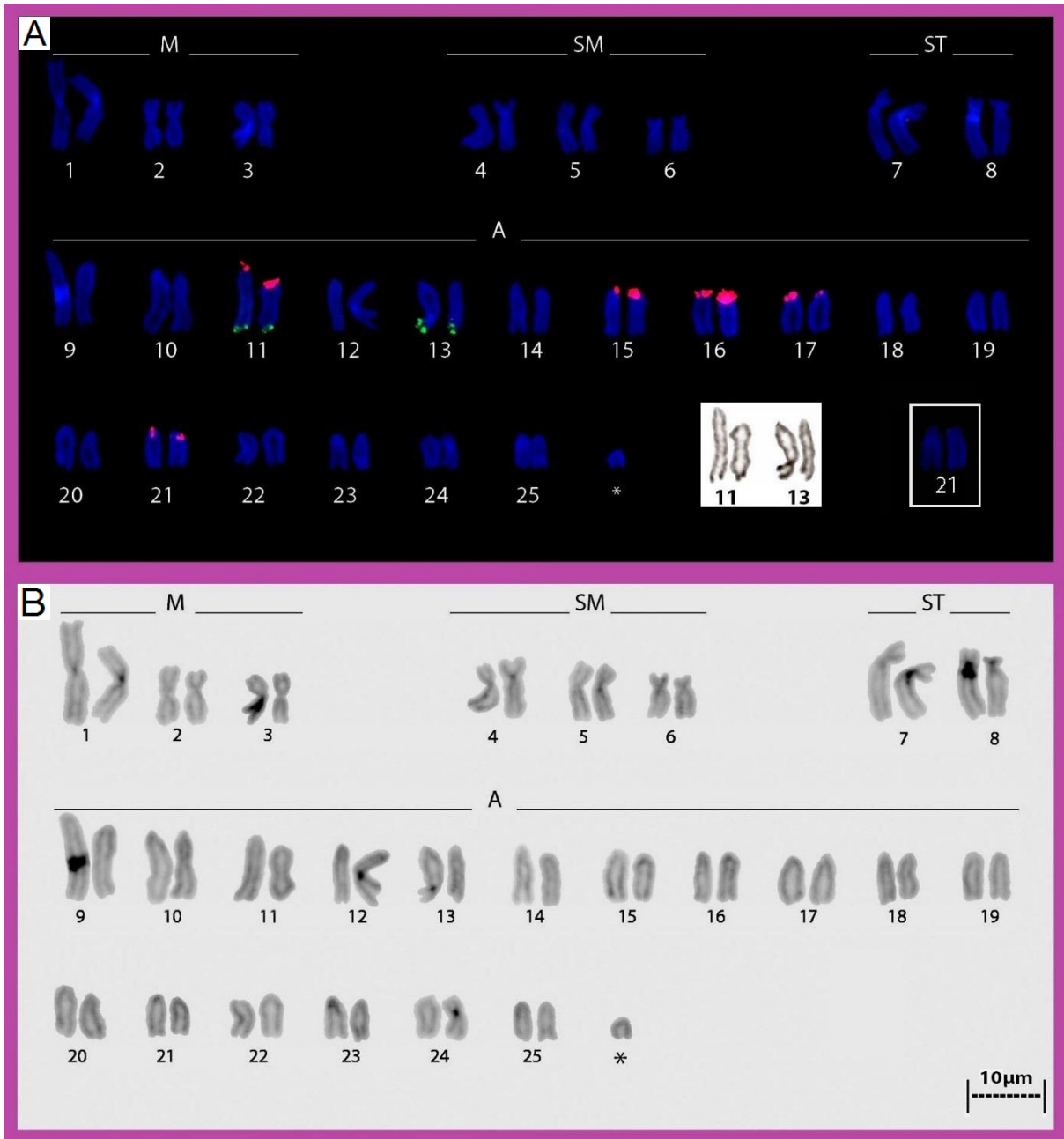


Figura 5 – Cariótipo de um exemplar de *C. galusdae* submetido a diferentes tratamentos. **A:** FISH para regiões 5S (vermelho) e 18S (verdes), com seus cromossomos Ag-NOR⁺ em destaque no quadro branco. No quadro preto é mostrado o par cromossômico 21 de outro indivíduo da mesma espécie que não evidenciou marcação 5S. **B:** bandas C⁺.

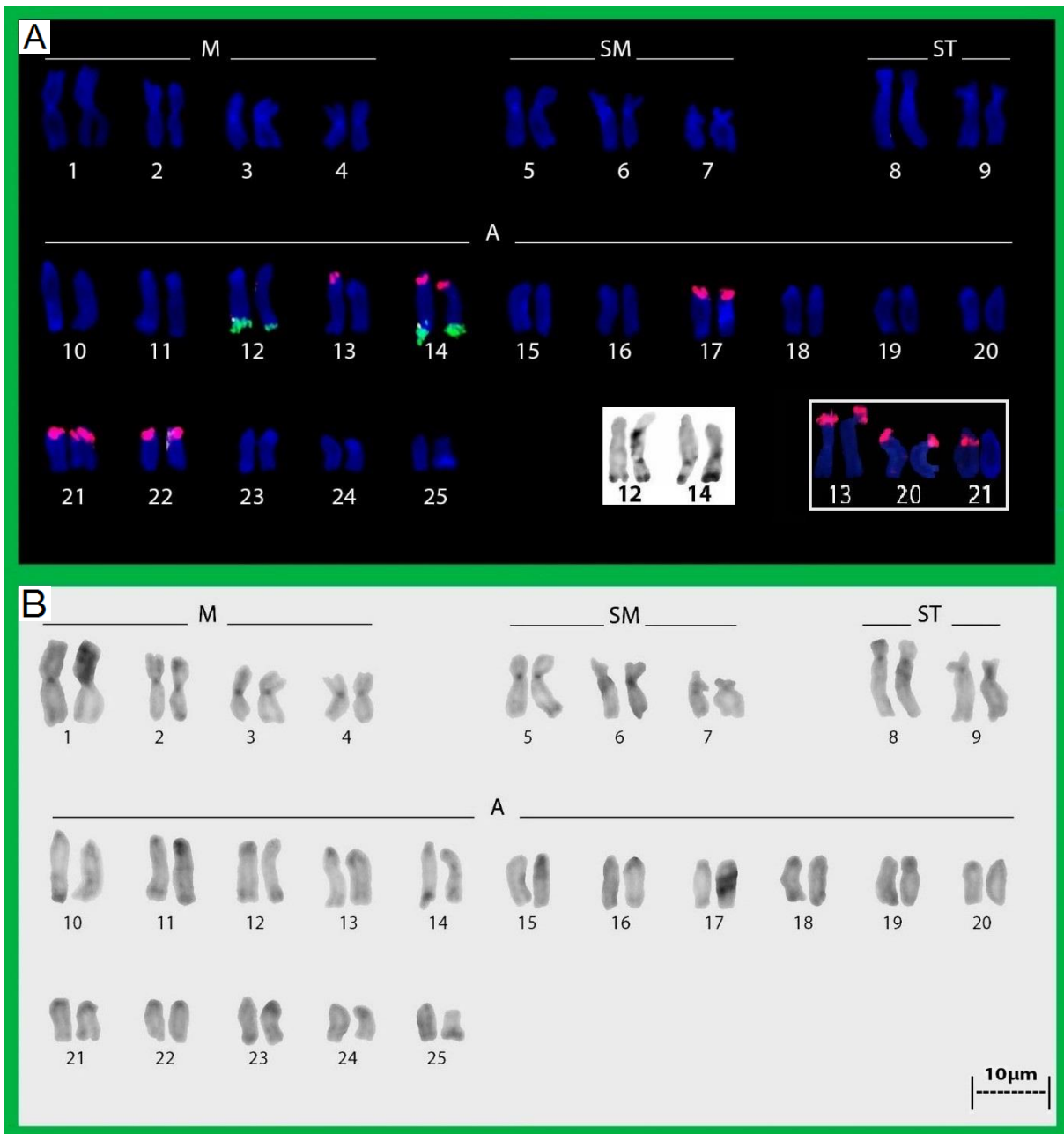


Figura 6 – Cariótipo de um exemplar de *C. kiliani* submetido a diferentes tratamentos. **A:** FISH para regiões 5S (vermelho) e 18S (verdes), com seus cromossomos Ag-NOR⁺ em destaque no quadro branco. No quadro preto são mostrados os pares cromossômicos de outro indivíduo da mesma espécie que evidenciaram marcações 5S variantes. **B:** bandas C⁺.

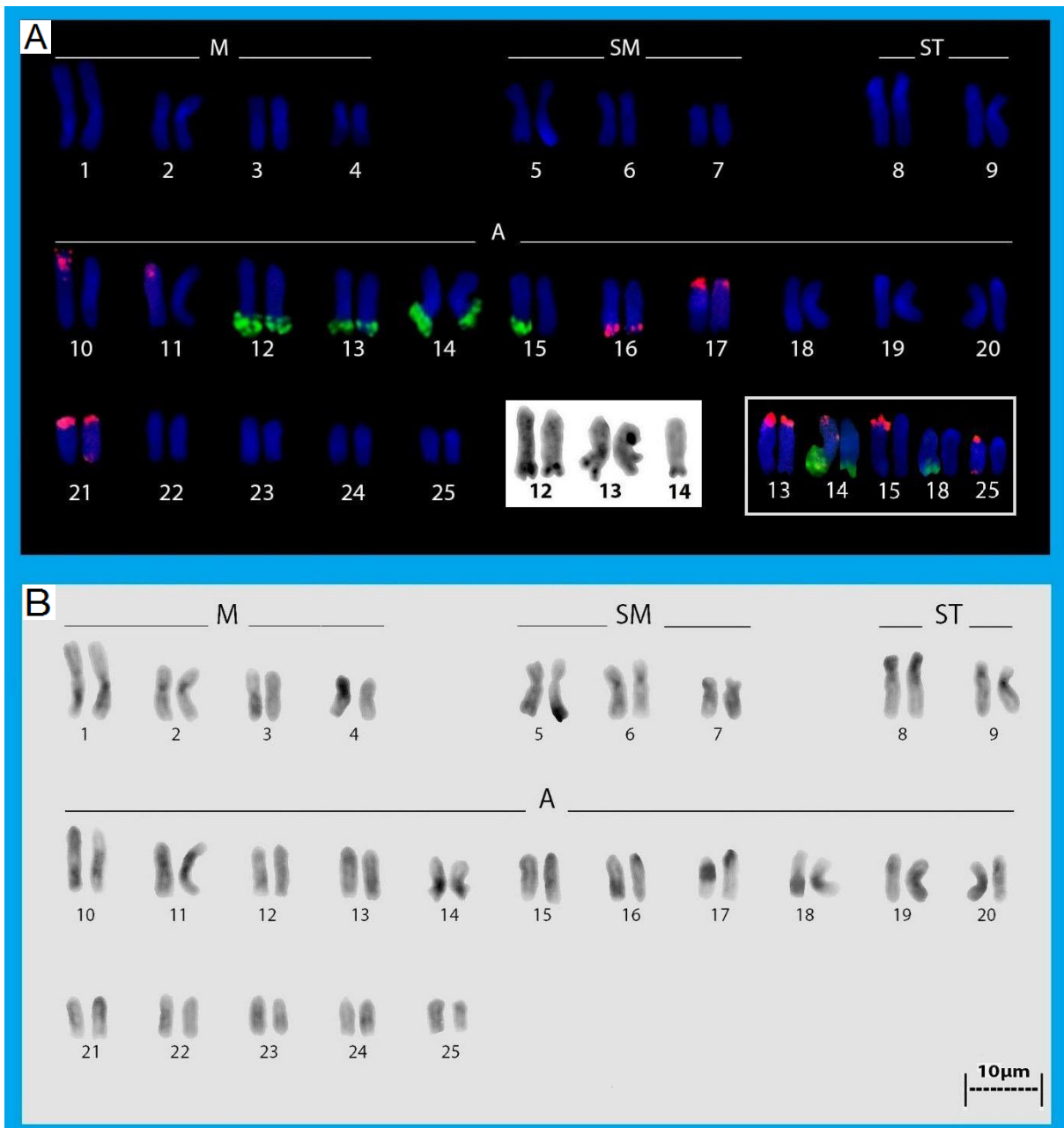


Figura 7 – Cariótipo de um exemplar de *C. australe* submetido a diferentes tratamentos. **A:** FISH para regiões 5S (vermelho) e 18S (verdes), com seus cromossomos Ag-NOR⁺ em destaque no quadro branco. No quadro preto são mostrados os pares cromossômicos de outro indivíduo da mesma espécie que evidenciaram marcações DNAr variantes. **B:** bandas C⁺.

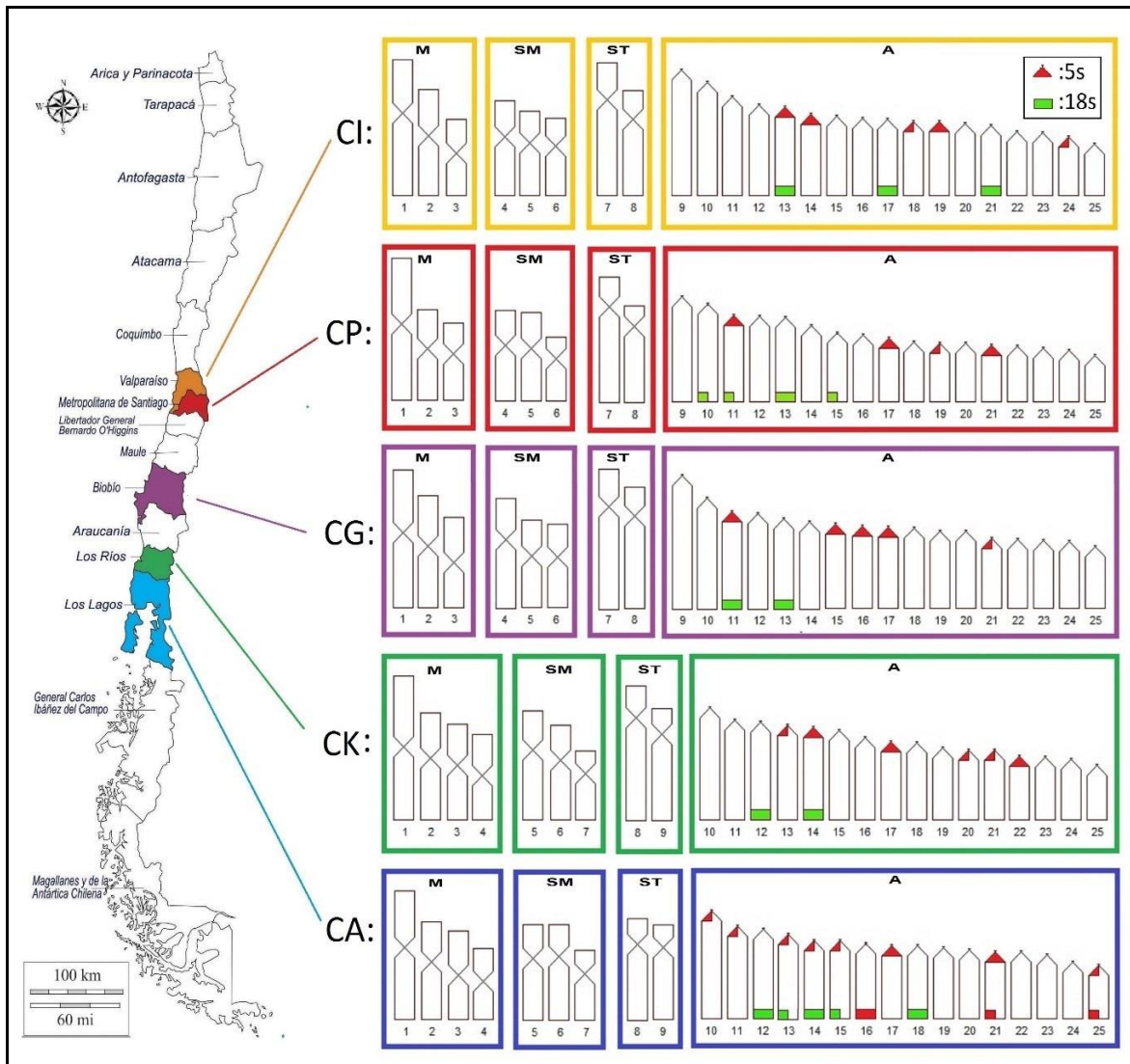


Figura 8 - Idiogramas das espécies do gênero *Cheirodon* presentes no Chile, *C. interruptus* (CI), *C. pisciculus* (CP), *C. galusdae* (CG), *C. kiliani* (CK), *C. australe* (CA) e seus respectivas regiões 18S (verdes) e 5S (vermelho). Os elementos dos idiogramas com meia marca simbolizam aqueles pares cromossômicos onde os DNAr podem estar ausentes ou presentes, tanto no mesmo indivíduo (heteromorfismo) como em indivíduos diferentes (polimorfismo).

Discussão

As análises feitas mostraram um alto grau de conservação dos cariótipos das cinco espécies, apresentando o mesmo número diplóide com $2n=50$ cromossomos, além de um padrão de bandas C, NOR e marcação 18S e 5S similares. Assim, o acesso ao cariótipo destas espécies pela primeira vez evidenciou um estado de conservação da macroestrutura cariotípica entre as espécies chilenas de *Cheirodon* bem como da espécie introduzida *C. interruptus*, sendo esta similaridade coerente com o monofiletismo do gênero (CAMPOS, 1982; EIGENMANN, 1928; MALABARBA, 1998; MARIGUELA et al., 2013)

Contudo, foi observada uma pequena variação na fórmula cariotípica relacionada com a presença ou ausência de braços curtos em um dos pares de cromossomos menores. De fato, *C. australe* e *C. kiliani*, com ocorrência mais ao Sul, tiveram a mesma fórmula cariotípica $8m+6sm+4st+32a$ e um $NF=68$. No entanto, *C. galusdae*, *C. pisciculus* e o introduzido *C. interruptus*, com ocorrência mais ao Norte, evidenciaram uma fórmula cariotípica de $6m+6sm+4st+34a$ e um $NF=66$, provavelmente devido a inversões pericêntricas. Além disso, o cromossomo extra encontrado em um exemplar de *C. galusdae*, sugere a presença de cromossomos B no gênero *Cheirodon*.

Comparativamente, estudos morfológicos (CAMPOS, 1982; SALAS; VÉLIZ; SCOTT, 2012) e moleculares (MARIGUELA et al., 2013) já realizados em espécies do gênero *Cheirodon* tendem a agrupar espécies como *C. australe* e *C. interruptus* que são encontradas em regiões geográficas distintas. No entanto, a maior similaridade entre os cariótipos das espécies do Sul e diferenças em relação às espécies do Centro-Norte chileno levantam a hipótese de uma possível correlação entre biogeografia e evolução cariotípica.

Com respeito às bandas C dos *Cheirodon* analisados, elas revelaram um padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva muito similar sendo detectada principalmente nos centrômeros e telômeros em uma quantidade relativamente pequena. Segundo alguns autores, baixa quantidade de heterocromatina constitutiva dentro de um grupo de espécies taxonomicamente

próximas é correlacionada com um genoma menor e poderia ser uma característica plesiomórfica (GALLARDO et al., 2003; GREGORY, 2004; SVARTMAN; STONE; STANYON, 2005; WALKER; SPOTORNO; SANS, 1991). No entanto, nas cinco espécies estudadas não foram encontradas diferenças segunda esta característica.

Por outro lado, embora já foi descrito um sistema de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados do tipo ZZ/ZW para as espécies de gêneros próximos *Odontostilbe paranensis* e *Serrapinnus notomelas* (SANTI-RAMPAZZO et al., 2007; WASKO et al., 2001), as análises de morfologia cromossômica e de bandas C não permitiram reconhecer cromossomos heteromórficos ligados ao sexo nos *Cheirodon* estudados.

As regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) se mostraram variáveis ao nível inter e intraespecífico em relação a atividade transcricional. As análises comparativas das marcações 18S e 5S por dupla FISH confirmaram a presença destas duas regiões de DNAr em vários cromossomos (marcações múltiplas) nas espécies estudadas. Simultaneamente, foi confirmada variabilidade interespecífica em número e posição das regiões 18S e 5S nos cromossomos, sendo informativo do ponto de vista citotaxonômico. Em adição, foi observada maior similaridade entre as espécies mais próximas geograficamente, sendo o introduzido *C. interruptus* o mais distinto na distribuição destas regiões. Assim, as análises das regiões DNAr corroboram a hipótese aqui postulada de relação biogeográfica e evolução cariotípica. Por outro lado, a variabilidade intraespecífica em número e posição de algumas regiões 18S e 5S pode ser a causa de polimorfismos cromossômicos, eventos já documentados em outros Characidae como o acentuado polimorfismo de heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolos evidenciado por Mantovani et al. (2000) em *Astyanax scabripinnis*. Igualmente, em *A. scabripinnis*, (MANTOVANI et al., 2005) verificaram grande variação na localização do DNAr 18S. Também outras espécies de *Astyanax* evidenciam polimorfismos das regiões ribossomais como *A. fasciatus* (PAZZA; FREHNER KAVALCO; BERTOLLO, 2008) e *A. bockmanni* (HASHIMOTO; PORTO-FORESTI, 2010).

Com estes dados de localização dos DNAr 18S e 5S, sempre teloméricos e/ou centroméricos, é possível sugerir que a diversificação cariotípica nestas

espécies não se deu somente por inversões pericêntricas, mas a transposição entre cromossomos não homólogos não pode ser descartada. Igualmente, tanto inversões como translocações mudam a ordem dos loci nos cromossomos, tendo o potencial de reduzir o fluxo gênico entre populações ao reduzir a fertilidade dos híbridos heterozigotos para esses rearranjos pois um só rearranjo na ordem dos loci pode diminuir a fertilidade em 50% dos gametas (KING, 1993).

Em relação a *Serrapinnus* e *Odontostilbe*, gêneros próximos a *Cheirodon* (MALABARBA, 1998), foram verificadas fórmulas cariotípicas semelhantes e cromossomos provavelmente homeólogos. Por exemplo, o primeiro par de cromossomos metacêntricos grandes localizados nas cinco espécies de *Cheirodon* chilenos parece ser uma característica bastante conservada nos Characidae (MORELLI et al., 1983) e apoia a inclusão dos *Cheirodon* naquela família.

As maiores diferenças cariotípicas entre os *Cheirodon* estudados e os gêneros próximos *Serrapinnus* e *Odontostilbe* tem relação com o número e tamanho dos cromossomos acrocêntricos, além do número diplóide. De fato, os cariótipos dos *Cheirodon* aqui analisados têm um $2n$ de 50 cromossomos, e um NF de 66 até 68. Por outro lado, *Odontostilbe* e *Serrapinnus* tem um número diplóide de 52 cromossomos e um NF de 79 até 104 para *Serrapinnus* e de 89 até 101 para *Odontostilbe* (WASKO et al., 2001; PERES et al., 2007; SANTI-RAMPAZZO et al., 2007; TROY et al., 2011). Assim, a fórmula cariotípica apresentada neste estudo, com um grande número de cromossomos acrocêntricos variando em tamanho relativo, parece ser uma configuração particular de *Cheirodon* e provavelmente diferenciada de outros grupos, por múltiplas inversões e/ou translocações cromossômicas. No entanto, as espécies *C. australe* e *C. kiliani* tem um par de cromossomos metacêntricos a mais e um menor número de acrocêntricos, em relação aos demais *Cheirodon* chilenos, o que faz suas fórmulas cariotípicas mais semelhantes às dos gêneros próximos *Serrapinnus* e *Odontostilbe*. Esta evidência levanta a hipótese de que os *Cheirodon* ocorrentes mais ao Norte poderiam ser formas derivadas das espécies do Sul por meio de inversão pericêntrica em um par de cromossomos metacêntricos menor (provavelmente o número quatro), gerando um par acrocêntrico pequeno (Figura 9). Isto é coerente com as observações de

Campos (1982) que também propõe que os *Cheirodon* do Norte são derivados dos do Sul, com base na comparação das cúspides dentais.

Assim, as análises aqui feitas apresentam pela primeira vez, uma descrição e comparação citogenética das espécies do gênero *Cheirodon* contribuindo ao incompleto estado do conhecimento da ordem dos Characiformes (MOTA, T. F. M.; PRIOLI, S. M.; PRIOLI, 2014). Além disso, mesmo sem ter registros recentes de *C. kiliani* (SALAS; VÉLIZ; SCOTT, 2012), a coleta bem-sucedida de exemplares desta espécie permitiu fazer deste trabalho o segundo em incluir a todas as espécies chilenas do gênero *Cheirodon* depois do trabalho morfológico de Campos (1982).

As cinco espécies aqui estudadas, têm cariótipos muito similares incluindo a espécie introduzida *C. interruptus*. Isto é coerente com novas teorias sobre o recente e rápido surgimento da Cordilheira dos Andes que, depois de um crescimento progressivo inicial de dezenas de milhões de anos, teve mudanças rápidas (em períodos de um a quatro milhões de anos) de 1,5 km ou mais de soerguimento *de novo* (GARZIONE et al., 2008). Assim, o isolamento pela Cordilheira dos Andes poderia ser relativamente recente, além de incompleto em relação a algumas bacias hidrográficas, especialmente na região Sul-Patagônica, permitindo propor que os *Cheirodon* chilenos mantem ou mantiveram um fluxo gênico mais recente com os *Cheirodon* do lado oriental dos Andes.

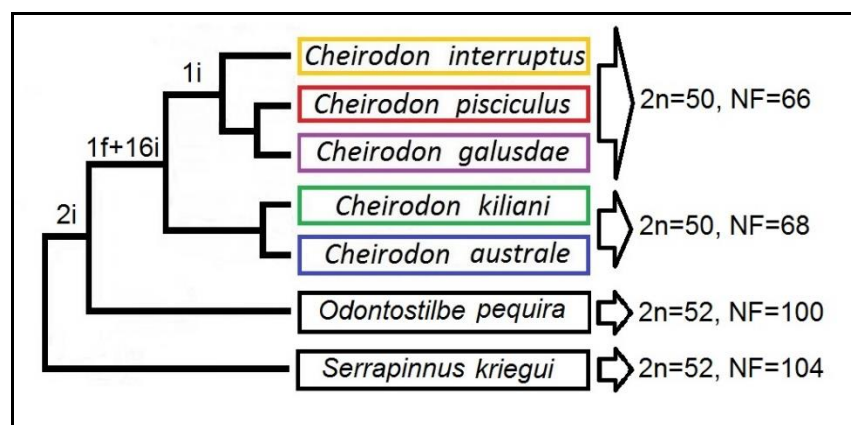


Figura 9 – Hipótese filogenética para as cinco espécies de *Cheirodon* presentes no Chile, tendo como grupos externos, duas espécies dos gêneros *Odontostilbe* e *Serrapinnus* (dados citogenéticos obtidos de Troy et al., 2010). São sinalizados o número de inversões pericêntricas (**i**) e as fusões robertsonianas (**f**) implicadas na divergência dos clados.

6. Conclusões

As cinco espécies do gênero *Cheirodon* estudadas, apresentam praticamente a mesma fórmula cariotípica. A única diferença detectada sugere a ocorrência de uma inversão pericêntrica em um par de cromossomos menores permitindo agrupar as espécies em um grupo Sul conformado por *C. australe* e *C. kiliani*, com 9 pares de 2 braços e um grupo Centro-Norte conformado por *C. galusdae*, *C. pisciculus* e *C. interruptus*, com 8 pares de 2 braços

A fórmula cariotípica com um grande número de cromossomos acrocêntricos parece ser uma configuração particular do gênero *Cheirodon* e provavelmente uma apomorfia derivada de múltiplas inversões pericêntricas a partir de algum ancestral em comum com as espécies cis-andinas como as dos gêneros *Serrapinnus* e *Odontostilbe*.

Os *Cheirodon* ocorrentes mais ao Norte em Chile (*C. galusdae*, *C. pisciculus* e *C. interruptus*) poderiam ser considerados derivados das espécies do Sul (*C. kiliani* e *C. australe*) cujos cariótipos são mais semelhantes aos dos gêneros cis-andinos *Serrapinnus* e *Odontostilbe*. Isto é coerente com as observações de (Campos, 1982) que também propõe que os *Cheirodon* do Norte são derivados dos do Sul, com base na comparação das cúspides dentais.

As bandas C mostraram um nível e distribuição de heterocromatina similar nas cinco espécies estudadas, sendo localizada principalmente nos centrômeros e telômeros. A presença de cromossomos sexuais não foi confirmada.

A variabilidade interespecífica das regiões DNAr 18S e 5S foi correspondente com a distribuição geográfica das cinco espécies. Por outro lado, também foi observada variabilidade intraespecífica para estas marcações especialmente em *C. australe*.

Apesar da variabilidade encontrada na posição das regiões DNAr 18S e 5S, elas sempre foram observadas nas regiões terminais dos cromossomos acrocêntricos, permitindo sugerir que a diversificação cariotípica nestas espécies não se deu somente por inversões pericêntricas senão também por eventos de transposição.

Tanto as inversões como as transposições sugeridas nas espécies estudadas, podem mudar a ordem dos loci tendo o potencial de reduzir o fluxo gênico entre populações ao reduzir a fertilidade dos híbridos heterozigotos. No entanto, as regiões 18S e 5S, foram observadas só em regiões terminais nos cromossomos acrocêntricos, diminuindo a possibilidade de que seus reposicionamentos por transposição podam provocar uma alteração na ordem dos loci. Evidencia disso são os polimorfismos intraespecíficos observados para essas regiões DNAr nos *Cheirodon* chilenos.

A grande similaridade entre os cariótipos dos *Cheirodon* nativos de Chile e o cariótipo do introduzido *C. interruptus* permite propor que os *Cheirodon* chilenos mantem ou mantiveram um fluxo gênico mais recente com os *Cheirodon* do lado oriental dos Andes.

A técnica de obtenção de cromossomos metafásicos a partir de tecido de nadadeira em regeneração resultou satisfatória em quanto à qualidade e quantidade do material obtido em peixes pequenos. Além disso, ao ser uma técnica pouco invasiva e que não necessita de instrumentação sofisticada, oferece a possibilidade de ser feita várias vezes, sem comprometer a integridade dos indivíduos em estudo.

7. Referências Bibliográficas

BRAASCH, I. et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. **Nature Genetics**, v. 48, n. 4, p. 427–437, 2016.

CAMPOS, H. Sistemática del género *Cheirodon* (Pisces: Characidae) en Chile con descripción de una nueva especie. Análisis de multivarianza. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 17, n. 758467791, p. 129–162, 1982.

CAMPOS, H. et al. Categorías de conservación de peces nativos de aguas continentales de Chile. **Boletín del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)**, v. 47, p. 101–122, 1998.

CHILE. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Ley N° 18.892, 22 de noviembre 1989. Ley General de Pesca y Acuicultura. **Diario Oficial [De La República de Chile]**, Santiago, 23 dic. . 1989.

CHILE. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Decreto Supremo N° 461, 31 de julio 1995. Establece requisitos que deben cumplir las solicitudes de pesca de investigación. **Diario Oficial [De La República de Chile]**, Santiago, 03 nov. . 1995.

CHILE. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Resolución N°740, 10 de marzo 2016. Autoriza a Miguel Angel Soto Ortiz para realizar pesca de investigación que indica. **Diario Oficial [De La República de Chile]**, Santiago, 21 mar. . 2016.

CÓRDOVA, J.H.; LAMAS, G. Citogenética, filogenia, clasificaciones naturales y evolución de las especies. **Alma Mater**, v. (13-14), p. 95–112, 1997.

DE SOUZA PAIVA, L. R. **Citogenética de populações de *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontinae) da bacia do rio Tietê. Tese de Metrado.** [s.l: s.n.].

DINIZ, D.; MELO, P. X. **Easy Idio**, 2006.

EIGENMANN, C. H. The freshwater fishes of Chile. **Mem. Nat. Acad. Sci.**, v. 22, n.

2, p. 1–63, 1928.

GALLARDO, M. H. et al. Gradual and quantum genome size shifts in the hystricognath rodents. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 163–169, 2003.

GARZIONE, C. N. et al. Rise of the Andes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5881, p. 1304–1307, 2008.

GREGORY, T. R. Insertion-deletion biases and the evolution of genome size. **Gene**, v. 324, n. 1–2, p. 15–34, 2004.

HABIT, E.; DYER, B.; VILA, I. Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. **Gayana**, v. 70, n. 1, p. 100–113, 2006.

HASHIMOTO, D. T.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 4, p. 861–866, 2010.

HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, n. 3, p. 239–244, 2004.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014–1015, 1980.

JIANXUN, C.; XIUHAI, R.; QIXING, Y. Nuclear ADN content variation in fishes. **Cytologia**, v. 56, p. 425–429, 1991.

KALOUS, L.; KNYTL, M.; KRAJÁKOVÁ, L. Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: KUBÍK, S.; BARTÁK, M. (Eds.). . **Proceedings of the Workshop on Animal Biodiversity**. Javany: [s.n.]. p. 57–60.

KING, M. Chromosomal rearrangements as post-mating isolating mechanisms. In: **Species evolution. The role of chromosome change**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p. 72–91.

KLINKHARDT, M.; TESCHE, M.; GREVEN, H. Database of Fish Chromosomes. **Westarp Wissenschaften**, v. 49, n. 1, p. 1–237, 1995.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201–220, 1964.

LUI, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission**, v. 87, n. 7, p. 433–8, out. 2012.

MALABARBA, L. Monophyly of the Cheirodontinae, Characters and Major Clades (Ostariophysi: Characidae). In: MALABARBA, L. R. et al. (Eds.). . **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 193–234.

MALABARBA, L. R. Subfamily Cheirodontinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. J. (Eds.). . **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 729.

MANTOVANI, M. et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, n. 3, p. 161–8, 2000.

MANTOVANI, M. et al. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 123, n. 3, p. 211–216, mar. 2005.

MARIGUELA, T. C. et al. Composition and interrelationships of a large Neotropical freshwater fish group, the subfamily Cheirodontinae (Characiformes: Characidae): a case study based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 68, n. 1, p. 23–34, jul. 2013.

MARTINS, C.; GALETTI, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in

Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 7, n. 5, p. 363–7, 1999.

MORELLI, S. et al. Cytogenetic Considerations on the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235–244, jan. 1983.

MOTA, T. F. M.; PRIOLI, S. M.; PRIOLI, A. J. Estudos filogenéticos da ordem Characiformes: tendências e carências. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 20, p. 21–36, 2014.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. **Citogenética de Peces**. Nueva Esparta: Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente, 2006.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. Citogenética como herramienta taxonómica en peces. **Saber**, v. 26, n. 4, p. 5–9, 2014.

NISHIYAMA, P.B.; MARTINS-SANTOS, I. C. **Provável mecanismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW em duas espécies do gênero *Cheirodon* (Pisces, Cheirodontinae) do rio Paraná**. VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. **Anais...São Carlos**: 1996

OLIVEIRA, C. et al. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, n. 3, p. 577--624, 1988.

PAZZA, R.; FREHNER KAVALCO, K.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 – Chromosomal location of a satellite DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 1, p. 61–66, 2008.

PERES, M. et al. Karyotypic characterization of two species of the genus *Serrapinnus* (Characiformes, Characidae), with the description of a structural polymorphism in *S. heterodon*. **Caryologia**, v. 60, n. 4, p. 319–324, jan. 2007.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-Sensitivity, Fluorescence Hybridization. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986.

POST, A. Ergebnisse der Forschungsreisen des FRV "Walter Hertwig" nach Südamerika. XXXIV. Die Chromosomen von drei Arten aus der Familie Gonostomatidae (Osteichthyes, Stomiatoidei). **Arch. Fischereiwiss**, v. 25, n. 1, p. 51–55, 1974.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. 3. ed. São Paulo: [s.n.].

SALAS, D.; VÉLIZ, D.; SCOTT, S. Diferenciación morfológica en especies del género *Cheirodon* (Ostariophysi: Characidae) mediante morfometría tradicional y geométrica. **Gayana**, v. 76, n. 2, p. 142–152, 2012.

SANTI-RAMPAZZO, A. P. et al. Cytogenetic analysis and description of the sexual chromosome determination system ZZ/ZW of species of the fish genus *Serrapinnus* (Characidae, Cheirodontinae). **Genetics and molecular research : GMR**, v. 6, n. 3, p. 504–9, 30 ago. 2007.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304–6, nov. 1972.

SVARTMAN, M.; STONE, G.; STANYON, R. Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. **Genomics**, v. 85, n. 4, p. 425–430, 2005.

TROY, W. P. et al. Caracterização do número cromossômico em espécies de *Odontostilbe* e *Serrapinnus* (Characidae: Cheirodontinae) da Bacia do Rio Paraguai, Brasil. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 1, p. 57–61, 2011.

VILA, I.; HABIT, E. Current situation of the fish fauna in the Mediterranean region of Andean rivers systems in Chile. **FISHMED Fishes in Mediterranean Environments**, v. 2, p. 19, 2015.

VILA, I.; PARDO, R. Diversidad de Especies. Peces Límnicos. In: CONAMA (Ed.). .

Biodiversidad de Chile: Patrimonio y desafíos. [s.l.] Ocho Libros Editores, 2008. p. 302–307.

WALKER, L. I. Citogenética general: cromosomas y cariotipos. In: SPOTORNO, A. E.; HOECKER, G. (Eds.). . **Elementos de biología celular y genética.** [s.l: s.n.]. p. 313–327.

WALKER, L. I.; SPOTORNO, A. E.; SANS, J. Genome size variation and its phenotypic consequences in *Phyllotis rodents*. **Hereditas**, v. 115, n. 2, p. 99–107, 1991.

WASKO, A. P. et al. A ZZ/ZW sex chromosome system in Cheirodontinae fish. **Chromosome Science**, v. 5, n. 3, p. 145–148, 2001.

WHITE, T. J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics** **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, 1990.

Anexos

Anexo 1. Preparações de cromossomos a partir da nadadeira (KALOUS; KNYTL; KRAJÁKOVÁ, 2010)

Solução 1 (Stock): 7,48g NaCl + 0,18g KCl + 0,2g CaCl₂ + 0,016g NaHCO₃ em 1 lt de H₂O

Solução 2: 14,3 ml de solução 1 + 85,7ml of H₂O + 0,025g de colchicina

- 1.- Corte o nadadeira (tentar fazer um corte reto). Manter o peixe em aquário por dias até que você perceba a regeneração desta parte, mas não completamente, porque é necesario células em divisão. Dependem de cada espécie, 4 dias, 7 dias, 15 dias, você tem que seguir o experimento.
- 2.- Depois de uma regeneração incompleta, cortar a nadadeira novamente para obter cromossomos.
- 3.- Coloque a nadadeira em placa de Petri e adicione 5 ml ou mais da solução 2 (a nadadeira deve ser completamente coberta); e mantenha por 2 h em temperatura ambiente (20° aprox.).
- 4.- Após 2 h, adicionar 5 ml de fixador (Metanol 3: 1 de ácido acético) e deixe na geladeira por 25 min a 4° C.
- 5.- Remover a solução com pipeta Pasteur de vidro e adicionar 5 ml de fixador e deixar na geladeira por 25 min a 4° C. Repetir o paso 5 por 3 veces.
- 6.- A última fixação (5 ml de fixador) pode ser armazenada na geladeira a 4° C por 25 minutos ou durante a noite, se necessário, e depois iniciar o próximo passo.
- 7.- Preparar a 50% de ácido acético/água e colocar a nadadeira na placa de Petri. Colocar 40 ul de ácido acético sobre a nadadeira e dissolver o tecido com uma pinça. Depois remover o líquido com uma pipeta e colocar em tubos tipo Eppendorf. Mantenha os tubos em gelo a 0 ° C, e fazer gotejamento no mesmo dia.
- 8.- Pegar 50 ul para fazer gotejamento. Colocar o volume sobre uma lâmina aquecida em placa a 37° C, aspirar o material a assim proceder varias veces sobre diferentes pontos da lâmina.

Anexo 2. Técnicas de citogenética convencional

Anexo 2.1. Método de coloração convencional Giemsa

Para analisar o número e morfologia dos cromossomos, as lâminas preparadas com a suspensão celular são coradas com solução do corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) a 5% durante aproximadamente 10 minutos e em seguida são lavadas em água corrente e secas ao ar.

Anexo 2.2. Identificação cromossômica

Segundo critérios da relação de braços (RB) proposta por LEVAN; FREDGA; SANDBERG (1964), os cromossomos podem ser classificados como metacêntricos (m) (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB= 1,71 a 3,00); subtlocêntricos (st) (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB>7,00).

Anexo 2.3. Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-RONs (HOWELL; BLACK, 1980)

Em lâminas previamente preparadas para a obtenção de cromossomos mitóticos pingar uma gota da solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas da solução de nitrato de prata (1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina; Cobrir a lâmina com lamínula; Levar a lâmina á estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada; Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar; Se necessário, corar com Giemsa diluída a 1% em tampão fosfato pH 6,8 por 30 segundos.

Anexo 2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva segundo SUMNER (1972), com adaptações segundo LUI et al. (2012)

- Tratar as lâminas contendo o material celular com ácidoclorídrico (HCl) 0,2 N, a 37°C, durante 10 minutos
- Lavar com água destilada e incubar a 28°C em solução de Bário Ba(OH)₂ 5% saturada durante 1 a 2 minutos.
- Submergir as lâminas em solução de ácido clorídrico 0,2 N a 37°C durante 30 segundos e lavar com água destilada.
- Submergir o material em solução salina 2x SSC, a 60°C, durante 40 minutos, lavar em água destilada e secar ao ar.
- Corar as lâminas em uma solução contendo 20 µL de *anti-fading* (1,4-fenilenodiamino em tampão glicerol) e 0,7 µL (50 µg/mL) de iodeto de propídio.

Anexo 3. Citogenética Molecular: Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986)

Preparações das sondas

A obtenção da sonda de DNA ribossômico 18S será feita a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (Prochilodontidae) (Hatanaka e Galetti, 2004) usando os primers NS1 5'-GTAGT CATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTT ACCTACGGA-3' (White et al., 1990) e a sonda de DNAr 5S a partir de DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) usando os primers A 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (Martins e Galetti, 1999). Para a marcação da sonda DNAr 18S foi utilizado biotina-16-dUTP (*kit nick translation Biotin-Nick Translation Mix*) e para a sonda do DNAr 5S, digoxigenina -11-dUTP (*kit DIG-Nick Translation Mix*), segundo as orientações do fabricante (Roche Applied Science). As misturas de hibridização tiveram a estrigência de 77% (2,5 ng/ μ L sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 horas). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos streptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contra corados com DAPI (0,2 μ g/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector).

Tratamento com RNase

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

Tratamento com Pepsina

6- Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCL) em temperatura ambiente.

7- Lavar em PBS 1x durante 5 minutos com agitação, em temperatura ambiente.

Fixação

8- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1X / 50mM MgCl₂ 50mM durante 10 minutos a temperatura ambiente.

9- Lavar em PBS 1X por 5 minutos, com agitação.

10- Desidratar das lâminas em série de alcoólica (70%, 85% e 100%) por 3 minutos e secá-las ao ar livre.

Pré-hibridação

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

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

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

Hibridação

14- Preparar a câmara úmida 37°C.

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

Lavagens (Segundo dia)

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

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

Bloqueio

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

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

Detecção de duas sondas DOUBLE FISH

20- Incubar as lâminas com 100 µL cada do mix de anticorpos (streptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science) durante 1 hora em câmara úmida e escura em temperatura ambiente.

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

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

Montagem das lâminas com DAPI

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

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

Anexo 4. Autorización para pesca de investigación

MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y TURISMO
SUBSECRETARIA DE PESCA Y ACUICULTURA
PINV 035-2016 CITOGENICA COMPARADA
CHEIRODON (OSTARIOPHYSI CHARACIDAE)



AUTORIZA A MIGUEL ANGEL SOTO ORTIZ PARA
REALIZAR PESCA DE INVESTIGACIÓN QUE INDICA.

VALPARAISO, 10 MAR. 2016

R. EX. N° 740

VISTO: Lo solicitado por Miguel Angel Soto Ortiz, mediante carta, C.I. SUBPESCA N° 573, de fecha 13 de enero de 2016; lo informado por la División de Administración Pesquera de esta Subsecretaría en Informe Técnico N° 035/2016, contenido en Memorándum Técnico (P.INV.) N° 35/2016, de fecha 27 de enero de 2016; los Términos Técnicos de Referencia del Proyecto **"Citogenica comparada en peces del género Cheirodon (Ostariophysi characidae) con foco en especies trasandinas"**, elaborados por el peticionario y aprobados por esta Subsecretaría; la Ley N° 19.880; la Ley General de Pesca y Acuicultura N° 18.892 y sus modificaciones cuyo texto refundido fue fijado por el D.S. N° 430 de 1991, lo dispuesto en el D.F.L. N° 5 de 1983 y el D.S. N° 461 de 1995 y el Decreto Exento N° 878 de 2011, todos del actual Ministerio de Economía, Fomento y Turismo; la Resolución Exenta N° 332 de 2011, del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

CONSIDERANDO:

Que Miguel Angel Soto Ortiz, ingresó mediante carta citada en Visto, una solicitud para desarrollar la pesca de investigación conforme los Términos Técnicos de Referencia del Proyecto denominado **"Citogenica comparada en peces del género Cheirodon (Ostariophysi characidae) con foco en especies trasandinas"**.

Que mediante Memorándum Técnico (P.INV.) N° 035/2016, la División de Administración Pesquera de esta Subsecretaría, informa que las actividades planteadas en la solicitud califican como pesca de investigación de acuerdo a lo definido en el artículo 2° de la Ley General de Pesca y Acuicultura, por cuanto es una actividad extractiva sin fines de lucro, cuya finalidad es obtener datos e información para generar conocimiento científico, para proteger la biodiversidad y el patrimonio natural del país.

Que la evidencia científica apunta a que los problemas de conservación de las especies ícticas de aguas continentales chilenas van en aumento. Esta situación se asocia a múltiples factores, donde el más relevante es el deterioro y fragmentación de su hábitat y competencias con otras especies.

Que por lo anterior, es de especial interés para la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura contar con el mayor número de antecedentes que permitan diseñar medidas de administración que promuevan objetivos de conservación de peces nativos y asilvestrados de importancia para la pesca recreativa.

Que dicha solicitud cumple con las exigencias dispuestas en el D.S. N° 461 de 1995, del actual Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, que establece los requisitos que deben cumplir las solicitudes de pesca de investigación.

Que de acuerdo a lo anterior y de conformidad a lo dispuesto en los artículos 98 a 102 de la Ley General de Pesca y Acuicultura, corresponde autorizar la pesca de investigación solicitada.

RESUELVO:

1.- Autorízase a Miguel Angel Soto Ortiz, R.U.T. N° 13.922.546-5, con domicilio en Valentina Leppe N° 9862, La Florida, Región Metropolitana, para efectuar una pesca de investigación, de conformidad con los Términos Técnicos de Referencia del Proyecto "**Citogenica comparada en peces del género Cheirodon (Ostariophysi characidae) con foco en especies trasandinas**", elaborados por el peticionario y aprobados por esta Subsecretaría, y el informe técnico citado en Visto, los que se consideran parte integrante de la presente resolución.

2.- El objetivo de la pesca de investigación que por la presente resolución se autoriza, consiste en establecer relaciones carioevolutivas entre especies chilenas del género Cheirodon e inferir su estado en relación a otros Cheirodontinae.

3.- La pesca de investigación se efectuará por el término de 12 meses contados desde la fecha de publicación de la presente resolución, cuya área de estudio podrá desarrollarse en cursos y cuerpos de agua de la V Región de Valparaíso, Región Metropolitana, VII Región del Maule, Río Biobío, VIII Región, IX Región de la Araucanía y X Región de Los Lagos.

4.- En cumplimiento de los objetivos de la presente pesca de investigación, la peticionaria podrá realizar la captura y retención de un máximo de 15 ejemplares por sitio y campaña de las siguientes especies:

Especie nativas	Nombre común
<i>Cheirodon interruptus</i>	Pocha
<i>Cheirodon pisciculus</i>	Pocha
<i>Cheirodon galusdae</i>	Pocha de Los Lagos
<i>Cheirodon kiliani</i>	Pocha
<i>Cheirodon australe</i>	Pocha del Sur

Todas las otras especies capturadas deberán ser liberadas en buenas condiciones para su adecuada sobrevivencia. Sin perjuicio de lo anterior, las especies de *Australoheros facetum* ("chanchito"), *Gambusia spp* ("gambusia"), *Carassius carassius* ("doradito"), *Cnesterodon decemmaculatus* ("10 manchas"), *Ameiurus nebulosus* ("pez gato"), *Jenynsia multidentata* (overito o morraja) y *Cheirodon interruptus* (pocha o morrajita) *Ctenopharyngodon idella* (carpa china) y *Cyprinus carpio* (carpa), podrán ser sacrificados en su totalidad, en consideración a su potencial invasividad y riesgo para la conservación de las especies nativas amenazadas.

Para la captura de peces se podrá utilizar redes y trampas a escala de régimen de pesca con fines de investigación.

5.- El peticionario deberá informar a la oficina del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura correspondiente, con a lo menos 2 días hábiles de anticipación, las fechas y lugares específicos en que se realizarán las jornadas de muestro, para su control y fiscalización.

6.- Para efectos de la pesca de investigación que se autoriza por la presente resolución, se exceptúa del cumplimiento de las normas de administración establecidas mediante Decreto Exento N° 878 de 2011, del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

7.- Para efectos de dar cumplimiento a las medidas establecidas en el programa de vigilancia, detección y control establecido por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura para la plaga *Didymosphenia geminata* (Didymo), el peticionario deberá:

a) Desinfectar los equipos, artes, implementos, aparejos de pesca y demás fómites que entren en contacto directo con el agua; tanto al comienzo y término de cada muestreo, debiendo utilizar los protocolos descritos en la Resolución Exenta 332 de 2011 del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura y el Manual para el Monitoreo e Identificación de la microalga bentónica *Didymosphenia geminata* de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

b) Dar aviso a más tardar dentro de las primeras 24 horas, una vez terminadas las campañas de muestreo en terreno, a la Dirección Regional del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura correspondiente, en caso que durante la ejecución de las actividades en terreno se sospeche de la aparición de dicha plaga en el área de estudio. De la misma forma, en caso de encontrar células de la plaga en los análisis posteriores, se deberá dar aviso al Servicio dentro del mismo tiempo indicado en el párrafo precedente.

8.- El solicitante deberá entregar informes semestrales a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, adjuntando la base de datos, en formato MS-EXCEL o MS-ACCES, quedando esto último como condición para poder mantener la continuidad del presente permiso de pesca. Lo anterior independiente de los resultados que puedan ser requeridos adicionalmente por esta Subsecretaría en otros procesos de control.

El incumplimiento de la obligación antes señalada se considerará como causal suficiente para denegar cualquier nueva solicitud de pesca de investigación.

9.- Designase a la Jefa de la División de Administración Pesquera de esta Subsecretaría, como funcionaria encargada de velar por el oportuno y debido cumplimiento de la obligación establecida en el numeral anterior.

10.- El peticionario será responsable de realizar una adecuada actividad de difusión en la cuenca.

11.- Esta autorización es intransferible y no podrá ser objeto o instrumento de negociación o situación de privilegio alguno.

12.- Se designa al peticionario como persona responsable de esta pesca de investigación.

13.- El peticionario deberá dar cumplimiento a las obligaciones que se establecen en la presente Resolución, y a las establecidas en la Ley General de Pesca y Acuicultura y en el D.S. N° 461 de 1995, citado en Visto. El incumplimiento hará incurrir a la titular en el término inmediato de la pesca de investigación sin que sea necesario formalizarlo, y sin perjuicio de las sanciones que correspondan de acuerdo a lo dispuesto en la Ley General de Pesca y Acuicultura, ya citada.

14.- La presente resolución es sin perjuicio de las que correspondan conferir a otras autoridades, de acuerdo a las disposiciones legales y reglamentarias vigentes o que se establezcan.

15.- El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura deberá adoptar las medidas y efectuar los controles que sean necesarios para lograr un efectivo cumplimiento de las disposiciones de la presente resolución.

16.- La presente resolución podrá ser impugnada por la interposición del recurso de reposición contemplado en el artículo 59 de la Ley N° 19.880, ante esta misma Subsecretaría y dentro del plazo de 5 días hábiles contados desde la respectiva notificación, sin perjuicio de la aclaración del acto dispuesta en el artículo 62 del citado cuerpo legal y de las demás acciones y recursos que procedan de conformidad con la normativa vigente.

17.- Transcribese copia de esta resolución a la Dirección General del Territorio Marítimo y Marina Mercante, al Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura y a la División Jurídica de esta Subsecretaría.

ANÓTESE, NOTIFÍQUESE POR CARTA CERTIFICADA Y PUBLÍQUESE EN EXTRACTO EN EL DIARIO OFICIAL POR CUENTA DE LA INTERESADA Y A TEXTO INTEGRO EN EL SITIO DE DOMINIO ELECTRÓNICO DE LA SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA


RAÚL SÓNICO GALDAMES
 Subsecretario de Pesca y Acuicultura


 MINISTERIO DE ECONOMÍA, FINANZAS Y DESARROLLO
 SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA
 DIVISION JURIDICA

cop #66
 CGS/MGG/MSA