

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

RAFAEL HENRIQUE DA ROCHA

Comparações citogenéticas e morfométricas em espécies de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) da bacia do rio Iguaçu

Toledo
2016

RAFAEL HENRIQUE DA ROCHA

Comparações citogenéticas e morfométricas em espécies de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) da bacia do rio Iguaçu

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Éder André Gubiani

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes

Toledo

2016

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

R672c Rocha, Rafael Henrique da
Comparações citogenéticas e morfométricas em espécies de
Corydoras (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) da bacia do rio
Iguaçu / Rafael Henrique da Rocha. -- Toledo, PR : [s. n.], 2016.
39 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Éder André Gubiani

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes

Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de
Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de
Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Engenharia de pesca - Dissertações 2. *Corydoras* (Siluroidei,
Callichthyidae) - Iguaçu, Rio (PR e Argentina) 3. Citogenética 4.
Morfometria 5. Peixe - Morfologia 6. Peixe - Genética I. Gubiani,
Éder André, orient. II. Fernandes, Carlos Alexandre, coorient. III. T.

CDD 20. ed. 597.49098162
639.313

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAEL HENRIQUE DA ROCHA

Comparações citogenéticas e morfométricas em espécies de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) da bacia do rio Iguaçu

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Éder André Gubiani
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Orientador)

Prof. Dr. Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em: 06 de abril de 2016.

Local de defesa: Auditório do GERPEL/*Campus* de Toledo.

Dedico este trabalho a Minha Mãe Iraci e ao meu Pai José pelo amor e dedicação, e por sempre acreditarem em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me permitir realizar este sonho com sabedoria, nunca deixando o cansaço e o desânimo fazer com que eu desistisse dos meus objetivos.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela estrutura para realização de todas as atividades necessárias, ao programa de pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, a coordenação e todos os professores.

A Fundação Araucária e ao FPTI pela bolsa concedida.

Ao Professor Dr. Éder André Gubiani, pela dedicação durante o curso, orientando, sugerindo melhorias para o trabalho, fazendo presente em todas as etapas, desde a coletas até análise e discussão dos resultados.

Ao Professor Dr. Carlos Alexandre Fernandes pela co-orientação, incentivando e ajudando desde o começo do trabalho.

Ao Professor Dr. Vladimir que abriu as portas do laboratório para desenvolvimento da pesquisa, e sempre se fez presente cobrando bons resultados.

Ao grupo de pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia, pela estrutura e material de coletas. A todos que ajudaram nas coletas.

Aos Colegas de laboratório em Cascavel, Leonardo, Lucas Mariane, Gisele que sempre ajudaram com as técnicas, aconselhando melhores caminhos para obter melhores resultados.

A uma grande Amiga, que embarcou junto neste sonho, esteve presente em todas as etapas durante estes 2 anos, segurando os pontos quando as coisas pareciam que não iriam dar certo, obrigado pelo ombro amigo, pelo abraço carinhoso, pelas palavras de incentivo, enfim por existir em minha vida. Poliana Obrigado por tudo, sem você não teria conseguido.

A Simone, uma grande amiga e parceira, que mesmo de longe sempre esteve presente, sempre me apoiou, me deu forças para continuar. Você sabe o quanto é importante para mim e o quanto essa vitória também é sua.

Aos meus Pais, pelo apoio ajuda, carinho, devo tudo a vocês, e é graças a vocês esta conquista, obrigado por tudo, Amo muito Vocês!

Ao meu irmão Rodrigo e cunhada Andressa, pela força! Obrigado.

Aos meus avós, pelas orações, carinho, dedicação, sem vocês também não seria possível esta conquista. E a todos da minha Família pelo apoio!

Enfim, a todos que de alguma forma fizeram parte desta conquista. **Obrigado!**

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo que o cerca – uma espécie de ilusão de ótica de sua consciência, moldado pela cultura. E essa ilusão é um tipo de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Poderá ser que ninguém consiga atingir plenamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

Comparações citogenéticas e morfométricas em espécies de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) da bacia do rio Iguaçu

RESUMO

Siluriformes é uma das ordens mais representativas e com maior diversidade de espécies da região Neotropical, sendo *Corydoras* o gênero com o maior número de espécies. Esse grupo apresenta padrões de coloração e morfologia externa muito semelhantes entre as espécies. Nesse contexto, o presente estudo utilizou a citogenética e a morfometria para caracterizar e diferenciar as espécies *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B da bacia do rio Iguaçu. O número diplóide encontrado foi de 46 cromossomos, com fórmula cariotípica de $22m+22sm+2st$ e NF igual a 92 para ambas as espécies. A impregnação com o nitrato de prata revelou dois cromossomos portadores de RONS e a hibridização *in situ* fluorescente com sonda ribossomal 18S confirmou este resultado, caracterizando sistema de RONS simples para as espécies. Além disso, o DNAr 5S foi co-localizado com o DNAr 18S para *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B. No entanto, *Corydoras* sp. B tem uma marcação extra de DNAr 5S, localizada em posição intersticial no braço curto de um cromossomo submetacêntrico. A heterocromatina constitutiva foi evidenciada em regiões centroméricas e pericentoméricas para ambas espécies, porém com diferenças nos cromossomos portadores. Os caracteres morfométricos avaliados demonstraram diferenças morfológicas entre as duas espécies, proporcionada pelos índices: altura do corpo/comprimento padrão; distância interorbital/comprimento da cabeça; diâmetro horizontal da órbita/comprimento da cabeça. Os resultados demonstram que, apesar das espécies apresentarem o mesmo número diplóide, mesma fórmula cariotípica e sistema de RONS simples, *C. carlae* e *Corydoras* sp. B são diferentes quanto a localização da heterocromatina constitutiva e o número de cromossomos portadores de DNAr 5S, além de apresentarem diferenças morfológicas que separam as duas espécies.

Palavras-chave: DNAr 18S, DNAr 5S, Co-localização, Evolução cariotípica, Especiação.

Cytogenetic and morphometric comparisons *Corydoras* species (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) of the Iguassu River basin

ABSTRACT

Siluriforms is one of the most significant orders and greater diversity of species in the Neotropics, being *Corydoras* genus with the highest number of species. This group has color patterns and external morphology very similar among species. In this context, the present study used the cytogenetics and morphometry to characterize and differentiate *Corydoras carlae* and *Corydoras* sp. B of the Iguassu River basin. The diploid number found was 46 chromosomes, with karyotype formula of $22m + 22sm + 2st$, and NF equal to 92. The impregnation with silver nitrate showed two bearing-NORs chromosomes and fluorescent hybridization with 18S ribosomal probe confirmed this result, charactering simple NORs system for species. Furthermore, the 5S rDNA was co-located with the 18S rDNA for *Corydoras carlae* and *Corydoras* sp. B. However, *Corydoras* sp. B have an extra marking 5S rDNA, located in interstitial position on the short arm of one submetacentric chromosome. The heterochromatin constitutive was found in centromeric and pericentromeric regions for both species, but with differences in the bearing chromosomes. The morphometric traits showed morphological differences between the two species, provided by indices: body height / standard length; interorbital distance / length of the head; horizontal diameter of orbit / length of the head. The results demonstrate that although both species have the same diploid number, the same karyotype formula and simple NORs system, *C. carlae* e *Corydoras* sp. B are different how much the location of the heterochromatin constitutive and in the 5S rDNA number bearing chromosomes, and present morphological differences which distinguish the two species.

Keywords: rDNA 18S, rDNA 5S, Co-localization, Karyotype evolution, Speciation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Espécime de *Corydoras carlae*, rio Florido, bacia do rio Iguaçu (A), *Corydoras* sp. B, riacho Poço Preto, bacia do rio Iguaçu (B)15
- Figura 2:** Localização dos pontos de coleta de *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B: A - riacho Poço Preto, bacia do rio Iguaçu (Losango branco), Rio Florido, bacia do rio Iguaçu (Triangulo vermelho). B e C - pontos de coleta no rio Florido. D e E - pontos de coleta no riacho Poço Preto.....16
- Figura 3:** Cariótipos de *Corydoras carlae* (coluna da esquerda) e *Corydoras* sp. B (coluna da direita). Corados com Giemsa (A) e (D), C-bandados (B) e (E) e Duplo Fish com sondas DNAr 5S (vermelho) e DNAr 18S (verde) (C) e (F). Nos boxes os pares portadores das Ag-RONs. A barra representa 10 μ m.....20
- Figura 4:** Ideograma das duas espécies de *Corydoras*, demonstrando a AgNOR, DNAr 18s, DNAr 5S e Banda- C. Em A) *Corydoras carlae* e B) *Corydoras* sp. B.....21
- Figura 5:** Análise de ordenação de Componente Principais (ACP) média e valores máximos e mínimos de *C. carlae* coletados no rio Florido, bacia do rio Iguaçu e *Corydoras* sp. B do riacho Poço Preto, bacia do rio Iguaçu. Proporções que apresentaram diferença significativa entre as espécies: (A) altura do corpo/ comprimento padrão; (B) distância interorbital/ comprimento da cabeça; (C) diâmetro horizontal da orbita.....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Medidas morfométricas dos exemplares de *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B da bacia do rio Iguaçu, e proporções morfométricas em relação ao Comprimento Padrão (CP) e ao Comprimento da Cabeça (CC).22
- Tabela 2:** Resultados da Análise de Componentes Principais (ACP). É dado, para cada eixo, os autovalores, a porcentagem de variância explicada e os autorvalores de Broken-stick. Para cada variável (índice) é listado o autovetor. O número de espécimes analisados foi de 17 para *Corydoras carlae* e de 24 para *Corydoras* sp. B. *diferenças significativas foram observadas para essas variáveis entre as espécies analisadas (Permanova; $p < 0,05$).23
- Tabela 3:** Distribuição do gene ribossomal maior e menor em Callichthyidae. As colunas 45S e 5S reportam o número de cromossomos portadores dos cístrons e sua localização.....26

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica Cytogenetic and Genome Research. Disponível em: <https://www.karger.com/Journal/Guidelines/224037>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Coleta dos Espécimes	15
2.2 Análises Citogenéticas	17
2.1 Análises Morfométricas	17
3 RESULTADOS	19
3.1 Análises Citogenéticas	19
3.2 Análises Morfométricas	21
4 DISCUSSÃO	25
4.1 Citogenética em <i>Corydoras</i>	25
4.2 Morfometria em <i>Corydoras</i>	28
4.2 Isolamento Geográfico como causa de diferenciação de espécies	29
5 Considerações Finais	29
6. REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A região Neotropical abriga os grupos mais representativos de peixes de água doce do mundo, podendo chegar a aproximadamente 8.000 das 28.000 espécies descritas (Nelson, 2006). Muitas espécies de peixes, além de desconhecidas pela ciência, são endêmicas e/ou estão em perigo de extinção (IUCN, 2016). O rio Iguazu, tributário da margem esquerda do rio Paraná, é um bom exemplo disso. Esse rio é considerado uma ecoregião de água doce (Abell et al., 2008). A bacia do rio Iguazu é caracterizada por apresentar elevado grau de endemismo em sua ictiofauna, o qual foi estimado em 75%, ausência de inúmeras famílias de peixes e o menor número de espécies quando comparado com outros rios da bacia do rio Paraná (Zawadzki, et al., 1999; Júlio Jr. et al., 1997; Shibata et al., 2002; Gubiani et al, 2006; 2010; Delariva e Silva, 2013). Apesar disso, 106 espécies de peixes são registradas para a bacia, sendo 46 Siluriformes, 35 Characiformes e 11 Perciformes (Baumgartner et al., 2012).

Siluriformes é uma das ordens mais diversificadas da região Neotropical, compreendendo 36 famílias, das quais Callichthyidae apresenta 205 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016), agrupadas em nove gêneros (Froese e Pauly, 2016). Dentre esses, *Corydoras* é o que abriga o maior número de espécies, com cerca de 214 conhecidas, distribuídas pelos principais rios da América do Sul (Eschmeyer e Fong, 2016). Os primeiros estudos com *Corydoras* resultaram na formação de pequenos grupos de espécies caracterizados, basicamente, pelo padrão de coloração e morfologia. Contudo, como o ambiente tem influência muitas vezes no padrão de pigmentação, muitos autores consideram que a morfologia externa, principalmente a coloração, pode resultar em erros de classificação, como acontece em outros grupos de peixes (Nijssen e Isbrucker, 1980; Silva et al., 2010; Frana et al., 2011).

A fim de diminuir os problemas taxonômicos advindos do uso de padrões de coloração na identificação de espécies de *Corydoras*, a citogenética tem sido utilizada como uma ferramenta auxiliar. Entretanto, a maioria dos estudos em *Corydoras* é restrito a análise convencional e demonstra a existência de diferentes números diplóides, que podem variar de $2n=40$ cromossomos em *C. nattereri* à $2n=134$ cromossomos em *C. aeneus* (Oliveira et al., 1990, 1992, 1993). Estes dados sugerem um processo de poliploidia intensa na diversificação e história evolutiva de *Corydoras* (Oliveira et al., 1988; Turner et al., 1992; Oliveira et al., 1993). O padrão de distribuição da heterocromatina, bem como a localização e a quantidade de cromossomos portadores das AgRONS são características citogenéticas bastante variáveis no gênero. Contudo, pouco se conhece em relação a localização dos diferentes tipos de DNAr,

tornando estudos como estes imprescindíveis para melhor compreender as relações entre espécies de *Corydoras* (Pazza et al., 2005; Artoni et al., 2006; Almeida et al., 2013).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero, *C. carlae* apresenta distribuição geográfica restrita a bacia do rio Iguaçu (Britto, 2007), e é caracterizada por apresentar o corpo amarelado com manchas castanho-escuro irregulares, distribuídas por todo o corpo, mancha escura evidente na origem da nadadeira dorsal e adiposa, nadadeiras com pequenas pintas castanhas, o corpo curto, coberto por duas séries de placas laterais e nadadeira caudal bifurcada (Baumgartner et al., 2012). Por outro lado, *Corydoras* sp. B, espécie conhecida do riacho Poço Preto, bacia do Baixo rio Iguaçu à jusante das cataratas do rio Iguaçu, é caracterizada por apresentar corpo amarelado, membrana da nadadeira dorsal enegrecida, manchas pretas grandes na linha mediana do flanco, nadadeira peitoral com pequenas pintas pretas e nadadeira anal com mancha preta difusa (Tencatt, 2013). Por terem características morfológicas muito semelhantes, apresentam problemas taxonômicos para identificação. Assim, a utilização da citogenética pode contribuir para correta identificação dessas espécies, além de colaborar no entendimento do processo evolutivo desse grupo de peixes.

A morfometria também pode auxiliar a elucidar as relações sistemáticas dentro do grupo, que propicia a interpretação e comparação precisa dos padrões de variação de caracteres quantitativos (Blackith e Reyment, 1971; Cavalcanti e Lopes, 1990). Essa técnica tem sido empregada para evidenciar as diferenças da forma do corpo em relação ao tamanho dos peixes, o que permite que as relações entre indivíduos possam ser detectadas e interpretadas (Bemvenuti, 2002; Shibatta e Hoffman, 2005; Almeida et al., 2012). Nesse contexto, as populações de peixes isoladas nos riachos de cabeceiras por alguma barreira geográfica podem apresentar divergências morfológicas como resultado da mudança na frequência gênica, levando a especiação por meio da incompatibilidade reprodutiva (Castro, 1999).

Dessa forma, com a problemática em estudos filogenéticos que envolvem espécies semelhantes em relação à coloração e morfologia externa em *Corydoras*, o presente estudo fez a comparação dos dados citogenéticos e morfométricos entre *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B, a fim de auxiliar na identificação e no entendimento do processo evolutivo no gênero. Além disso, são relatados os primeiros dados citogenéticos básicos e moleculares para ambas as espécies.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos Espécimes

Para a realização das análises foram coletados 17 exemplares de *C. carlae* (Fig. 1A) no rio Florido (Fig. 2A, B, C; 26°00'32.60"S; 53°25'50.7"O), sub-tributário do rio Iguaçu, tributário do rio Capanema, o qual deságua no rio Iguaçu, acima das cataratas do Iguaçu, e 24 exemplares de *Corydoras* sp. B (Fig. 1B) em dois pontos do riacho Poço Preto, tributário do rio Iguaçu (Fig. 2A, D, E; 25° 36'45,5"S; 54° 25'50,7"O e 25°37'19,7"S;54°26'53,1"O) que deságua abaixo das Cataratas do Iguaçu.

Para a coleta dos espécimes foi utilizado pesca elétrica, um método eficiente para amostrar pequenas espécies (Severi et al., 1995). Após coletados, os exemplares foram transportados vivos com oxigenação adequada até o laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* Cascavel, onde foram mantidos em aquários com aeração até a realização das técnicas citogenéticas. Antes da evisceração, os espécimes foram anestesiados com overdose de óleo de cravo (Griffiths, 2000).



Figura 1: Espécime de *Corydoras carlae*, rio Florido, bacia do rio Iguaçu (A), *Corydoras* sp. B, riacho Poço Preto, bacia do rio Iguaçu (B)

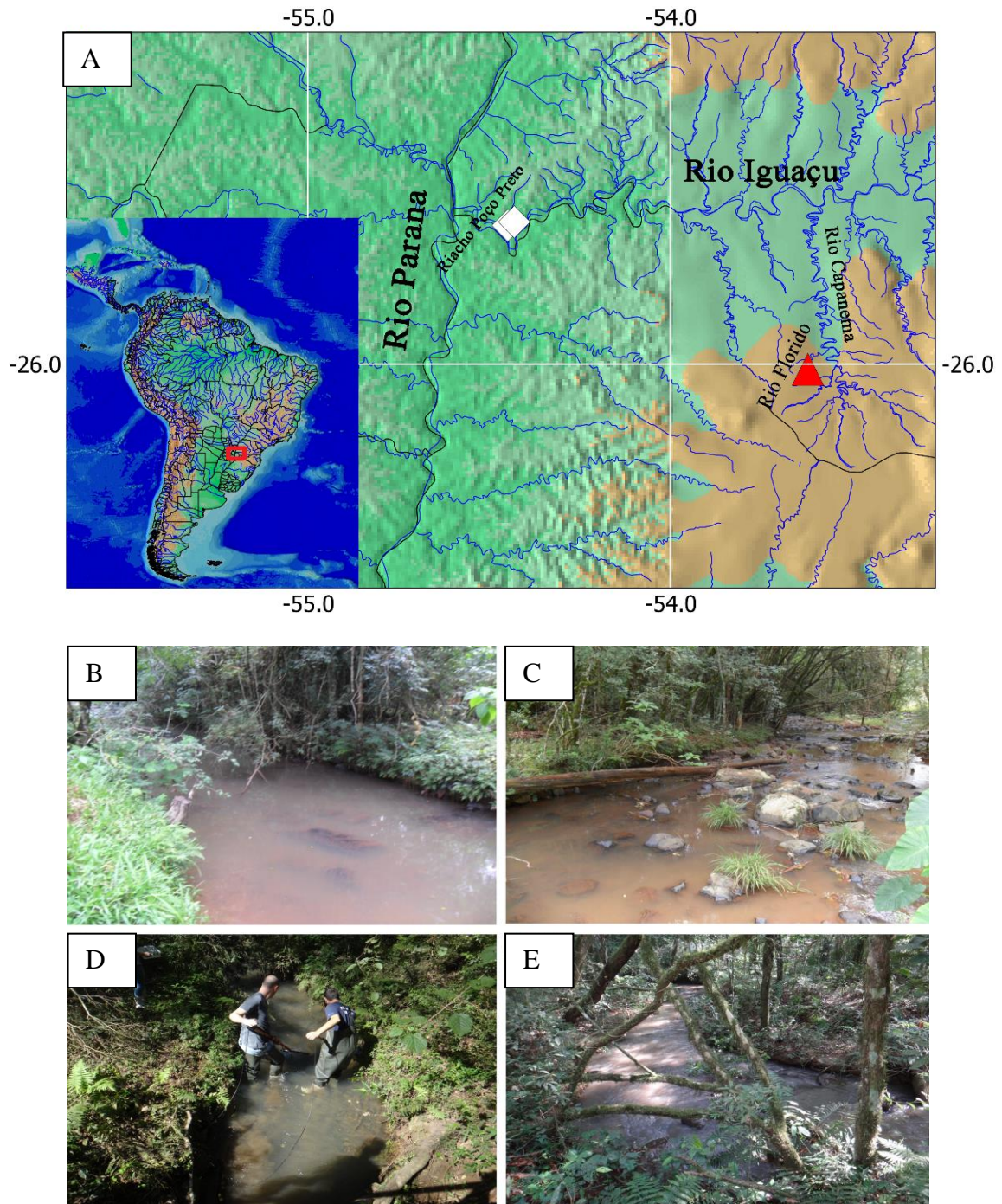


Figura 2: Localização dos pontos de coleta de *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B: A - riacho Poço Preto, bacia do rio Iguaçu (Losango branco), Rio Florido, bacia do rio Iguaçu (Triângulo vermelho). B e C - pontos de coleta no rio Florido. D e E - pontos de coleta no riacho Poço Preto.

2.2 Análises Citogenéticas

As análises citogenéticas foram realizadas em 10 indivíduos de *Corydoras carlae* (quatro fêmeas e seis machos) e 15 indivíduos de *Corydoras* sp. B (oito fêmeas e sete machos). Para a obtenção dos cromossomos metafásicos, a partir de células extraídas do rim, foi seguido a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram evidenciadas por meio da técnica de coloração por nitrato de prata descrita por Howell e Black (1980), e para determinar o padrão de distribuição das heterocromatinas foi seguida a técnica de Sumner (1972) modificado por Lui et al. (2012). A hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) foi realizada seguindo a técnica descrita por Pinkel et al. (1986) com modificações propostas por Margarido e Moreira-Filho (2008). As sondas foram marcadas através de kit *nick translation*, com digoxigenina-11-dUTP (DNAr 5S) e biotina-16-dUTP (DNAr 18S) (Roche®). A detecção dos sinais foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche®) para sonda de DNAr 5S e avidina-FITC amplificado com anti-avidina biotilada (Sigma) para sonda de DNAr 18S, sendo os cromossomos posteriormente contra-corados com DAPI (50 µg/mL).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e as contagens cromossômicas e observações mais detalhadas das metáfases foram feitas com objetiva de 100x, sendo as melhores metáfases capturadas com câmera digital DP 71 acoplada ao microscópio de epifluorescência BX 61, utilizando o *software* DP Controller, versão 3.2.1.276. Após a captura das imagens, os cromossomos homólogos foram pareados e classificados segundo Levan et al. (1964)

O cálculo do número fundamental de braços (NF) foi realizado considerando os cromossomos do tipo metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos com dois braços e acrocêntricos com um braço.

2.3 Análises Morfométricas

As medidas dos caracteres morfométricos foram realizadas utilizando um paquímetro universal, sendo 17 indivíduos de *C. carlae* e 24 *Corydoras* ep. B, e para cada exemplar foram tomadas medidas conforme proposto por Reis (1997), sendo elas: comprimento padrão (CP), comprimento do tórax (CT), comprimento do abdome (CA), Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal (AC), distância pré-dorsal (D. PRÉ-DORSAL), distância pré-pélvica (D. PRÉ-PÉLVICA), distância pré-anal (D. PRÉ-ANAL), distância pré-adiposa (D. PRÉ-ADPOSA), comprimento do espinho da nadadeira dorsal (CEND), comprimento do espinho

da nadadeira peitoral (CENP), altura do pedúnculo caudal (APC), comprimento do espinho da nadadeira adiposa (CENA), distância entre o final da base da nadadeira dorsal e a origem do espinho da nadadeira adiposa (DBNDOENA), comprimento da base da nadadeira dorsal (CBND), comprimento da base da nadadeira anal (CBNA), largura máxima do cleitro (LMC), comprimento da cabeça (CC), comprimento do barbilhão maxilar (CBM), altura da cabeça (A. CABEÇA), distância interorbital (DI), diâmetro horizontal da orbita (DHO), comprimento do focinho (CF), distância internareal (D. INTERNAREAL. Para contornar o efeito do tamanho dos espécimes medidos, foram calculadas proporções utilizando a medida de cada variável (mm) em relação ao comprimento padrão (para medidas referente ao corpo) e em relação ao comprimento da cabeça (medidas referentes a cabeça).

Para avaliar se houve distinção morfométrica entre as duas espécies estudadas, a matriz de variáveis morfométricas foi sumarizada através de uma análise de Componentes Principais (ACP) utilizando o programa PC-ORD 5.0 (McCune e Mefford, 2007). Os eixos retidos para interpretação foram selecionados de acordo com o modelo de Broken-Stick (Jackson, 1993). Para testar a hipótese nula que ambas as espécies não apresentaram distinção morfológica foi utilizada uma Análise de Variância Permutacional não Paramétrica (PERMANOVA). O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análises Citogenéticas

O número diplóide, a fórmula cariotípica e o NF foram iguais para *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B, com $2n= 46$ cromossomos, distribuídos em 22 cromossomos metacêntricos, 22 submetacêntricos e 2 subtelocêntricos para ambos os sexos e NF igual a 92 (Fig. 3A e Fig. 3D).

A impregnação com nitrato de prata na região organizadora do nucléolo demonstrou marcações em posição terminal no braço longo do par seis nas duas espécies (Box Fig. 3A e Box Fig. 3D). O FISH com DNAr 18S foi coincidente com a marcação do nitrato de prata em *C. carlae* e *Corydoras* sp. B, caracterizando sistema de NOR simples (Fig. 3C e Fig. 3F). Além disso, sinais *in situ* para o DNAr 5S co-localizado com o DNAr maior (18S) foram observados para *C. carlae* e *Corydoras* sp. B (Fig. 3C e Fig. 3F). No entanto, *Corydoras* sp. B apresentou uma marcação extra de DNAr 5S, localizada em posição intersticial no braço curto de um dos cromossomos do par 15 (Fig. 3F).

Heterocromatinas foram observadas na maioria dos cromossomos do complemento, em região centromérica nos pares de cromossomos 4, 8, 9, 10, 14, 15, 20, 21 e 22, em região pericentromérica no braço curto dos pares de cromossomos 2, 12, 13, 19 e 23, e em região pericentromérica no braço longo nos pares de cromossomos 5, 7 e 16, além de associadas às RONS em *Corydoras carlae* (Fig. 3B). Para *Corydoras* sp. B, as heterocromatinas foram evidenciadas em grande parte do complemento cromossômico, em região centromérica nos pares de cromossomos 1, 2, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22 e 23, em região pericentromérica no braço curto do par de cromossomos 3 e em região pericentromérica no braço longo dos pares de cromossomos 7, 9, 18, e 19, além de associadas às RONS (Fig. 3E). O ideograma sumariza os marcadores cromossômicos das duas espécies de *Corydoras* analisadas aqui (Fig. 4).

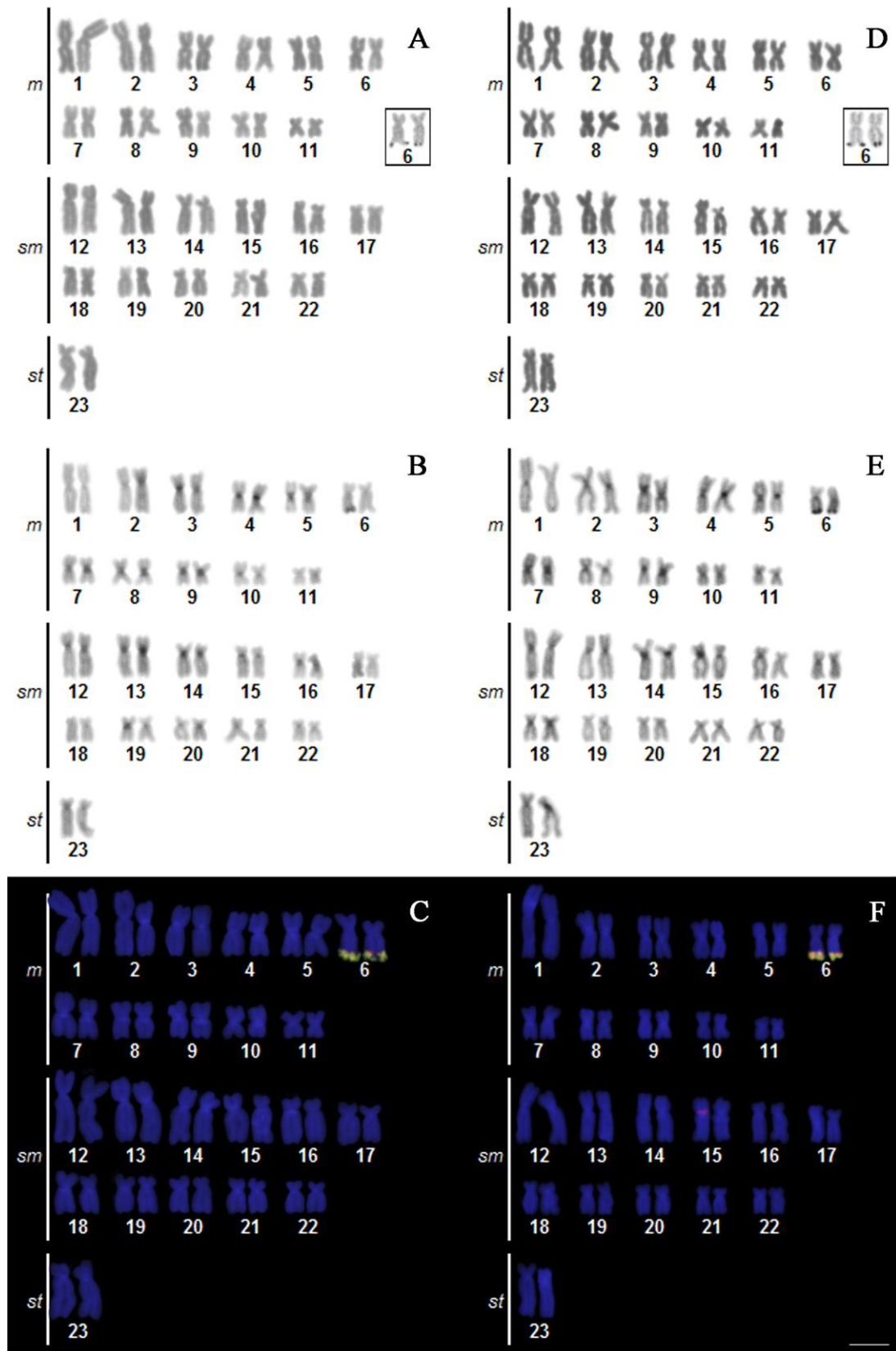


Figura 3: Cariótipos de *Corydoras carlae* (coluna da esquerda) e *Corydoras sp. B* (coluna da direita). Corados com Giemsa (A) e (D), C-bandados (B) e (E) e Duplo Fish com sondas DNAr 5S (vermelho) e DNAr 18S (verde) (C) e (F). Nos boxes os pares portadores das Ag-RONs. A barra representa 10 μm .

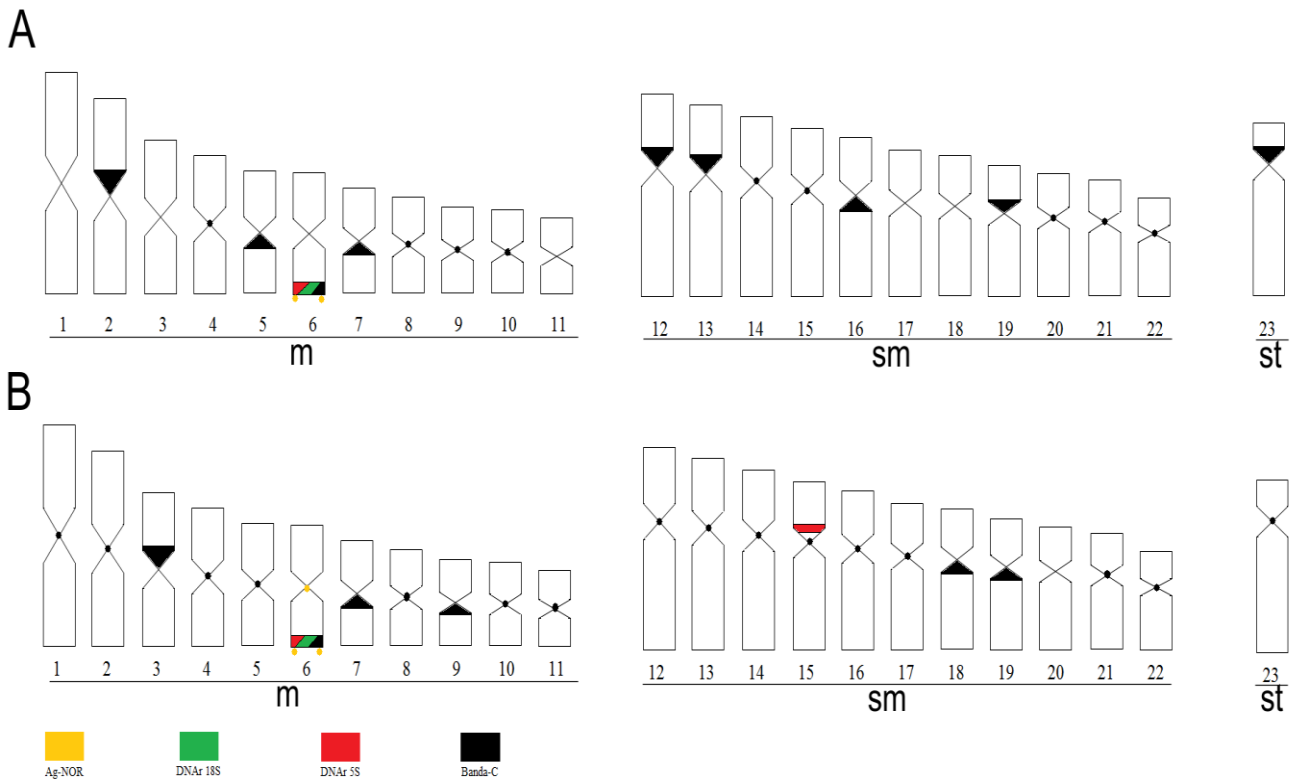


Figura 4: Ideograma das duas espécies de *Corydorás*, demonstrando a AgNOR, DNAr 18s, DNAr 5S e Banda- C. Em A) *Corydorás carlae* e B) *Corydorás* sp. B.

3.2 Análise Morfométrica

A análise das proporções calculadas a partir das medidas morfométricas de *Corydorás carlae* (rio Florido) e *Corydorás* sp. B (riacho Poço Preto) demonstrou que as duas espécies são diferentes, sendo as proporções que representam a diferenciação: altura do corpo/ comprimento padrão com uma média em mm de 29,15 em *C. carlae* e 34,25 em *Corydorás* sp. B, a distância interorbital com média de 52,65 em *C. Carlae* e 39,35 mm em *Corydorás* sp. B e o diâmetro horizontal da orbita com 30,00 mm em *C. carlae* e 23,45 mm em *Corydorás* sp. B (Tab 1).

Tabela 1: Medidas morfométricas dos exemplares de *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B da bacia do rio Iguaçu, e proporções morfométricas em relação ao Comprimento Padrão (CP) e ao Comprimento da Cabeça (CC).

	<i>Corydoras carlae</i>		<i>Corydoras</i> sp. B	
	Mínimo-Máximo	Média	Mínimo-Máximo	Média
Comprimento Padrão (mm)	21,5-38,4	29,5	29,2-41,9	35,55
% Comprimento Padrão				
CT/CP	12,4-24,8	18,6	17,4-25,5	21,45
CA/CP	28,5-37,8	33,1	31,2-41,0	36,1
AC/CP	23,3-35,0	29,15	31,5-37,0	34,25
D. PRÉ-DORSAL	42,3-59,3	50,8	44,1-65,3	54,7
D. PRÉ-PÉLVICA	38,0-54,0	46,0	40,5-46,2	43,35
D. PRÉ-ANAL	66,3-80,3	73,3	63,0-99,7	81,35
D. PRÉ-ADIPOSA	57,7-88,1	72,9	81,0-109,6	95,3
CEND/CP	19,6-30,9	25,25	16,9-23,8	20,35
CENP/CP	15,7-27,0	21,35	19,3-27,3	23,3
APC/CP	12,2-14,8	13,5	12,8-17,3	15,05
CENA/CP	6,2-10,9	8,55	6,8-11,4	9,1
DBNDOENA/CP	14,6-33,6	24,1	17,9-24,8	21,35
CBND/CP	12,4-22,0	17,2	15,5-20,6	18,5
CBNA/CP	6,2-12,2	9,2	6,0-11,4	8,7
LMC/CP	8,0-14,0	11,0	9,5-17,7	13,6
Comprimento da Cabeça (mm)	5,1-10,2	7,65	7,7-12,4	10,05
% Comprimento da Cabeça				
CBM/CC	30,3-70,5	50,4	27,7-65,9	46,8
A. CABEÇA/CC	73,5-115,2	94,35	79,8-107,7	93,75
DI/CC	32,8-72,5	52,65	33,3-45,4	39,35
DHO/CC	16,9-43,1	30,0	19,4-27,5	23,45
CF/CC	41,3-78,4	59,85	39,2-58,4	48,8
D.INTERNAREAL/CC	12,3-35,2	23,75	14,5-30,3	22,4

Comprimento padrão (CP), comprimento do tórax (CT), comprimento do abdome (CA), Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal (AC), distância pré-dorsal (D. PRÉ-DORSAL), distância pré-pélvica (D. PRÉ-PÉLVICA), distância pré-anal (D. PRÉ-ANAL), distância pré-adiposa (D. PRÉ-ADPOSA), comprimento do espinho da nadadeira dorsal (CEND), comprimento do espinho da nadadeira peitoral (CENP), altura do pedúnculo caudal (APC), comprimento do espinho da nadadeira adiposa (CENA), distância entre o final da base da nadadeira dorsal e a origem do espinho da nadadeira adiposa (DBNDOENA), comprimento da base da nadadeira dorsal (CBND), comprimento da base da nadadeira anal (CBNA), largura máxima do cleitro (LMC), comprimento da cabeça (CC), comprimento do barbilhão maxilar (CBM), altura da cabeça (A. CABEÇA), distância interorbital (DI), diâmetro horizontal da órbita (DHO), comprimento do focinho (CF), distância internareal (D. INTERNAREAL).

Os dois primeiros eixos da ACP (Análises de Componentes Principais) apresentaram autovalores maiores que os autovalores de Broken-stick e foram retidos para interpretação. Esses dois eixos apresentaram variância explicada acumulada de 34,93% (Tab. 2).

Tabela 2: Resultados da Análise de Componentes Principais (ACP). É dado, para cada eixo, os autovalores, a porcentagem de variância explicada e os autorvalores de Broken-stick. Para cada variável (índice) é listado o autovetor. O número de espécimes analisados foi de 17 para *Corydoras carlae* e de 24 para *Corydoras* sp. B. *diferenças significativas foram observadas para essas variáveis entre as espécies analisadas (Permanova; $p < 0,05$).

Medida/Índices	Eixo 1	Eixo 2
Autovalor	4,57	2,76
Autovalor de Broken-stick	3,64	2,64
% de variância	21,79	13,14
CT/CP	0,24	-0,16
*CA/CP	0,15	-0,09
AC/CP	0,37	0,04
D. pré-dorsal/CP	0,21	0,38
D. pré-pélvica/CP	0,25	0,27
D. pré-anal/CP	0,05	0,18
D. pré-adposa/CP	0,01	-0,03
CEND/CP	0,02	0,32
CENP/CP	0,27	0,17
APC/CP	0,07	0,29
CENA/CP	0,08	0,37
DBNDO/CP	0,01	-0,03
CBND/CP	0,07	0,24
CBNA/CP	0,04	0,05
LMC/CP	0,05	0,29
CBM/CC	-0,23	-0,03
A. CA/CC	-0,22	0,14
*DI/CC	-0,39	0,22
*DHO/CC	-0,36	0,04
CF/CC	-0,28	0,20
DI/CC	-0,30	0,26

Os resultados da PERMANOVA demonstraram que *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B apresentam diferenças significativas na morfologia (Pseudo-F = 1,98; $p < 0,01$) entre as duas espécies. Dessa forma, *Corydoras* sp. B possui a altura do corpo em relação ao comprimento padrão maior do que o encontrado para *Corydoras carlae*. Por outro lado, a

distância interorbital e o diâmetro horizontal da órbita em relação ao comprimento da cabeça são maiores em *Corydoras carlae* quando comparado com *Corydoras sp. B* (Fig. 4).

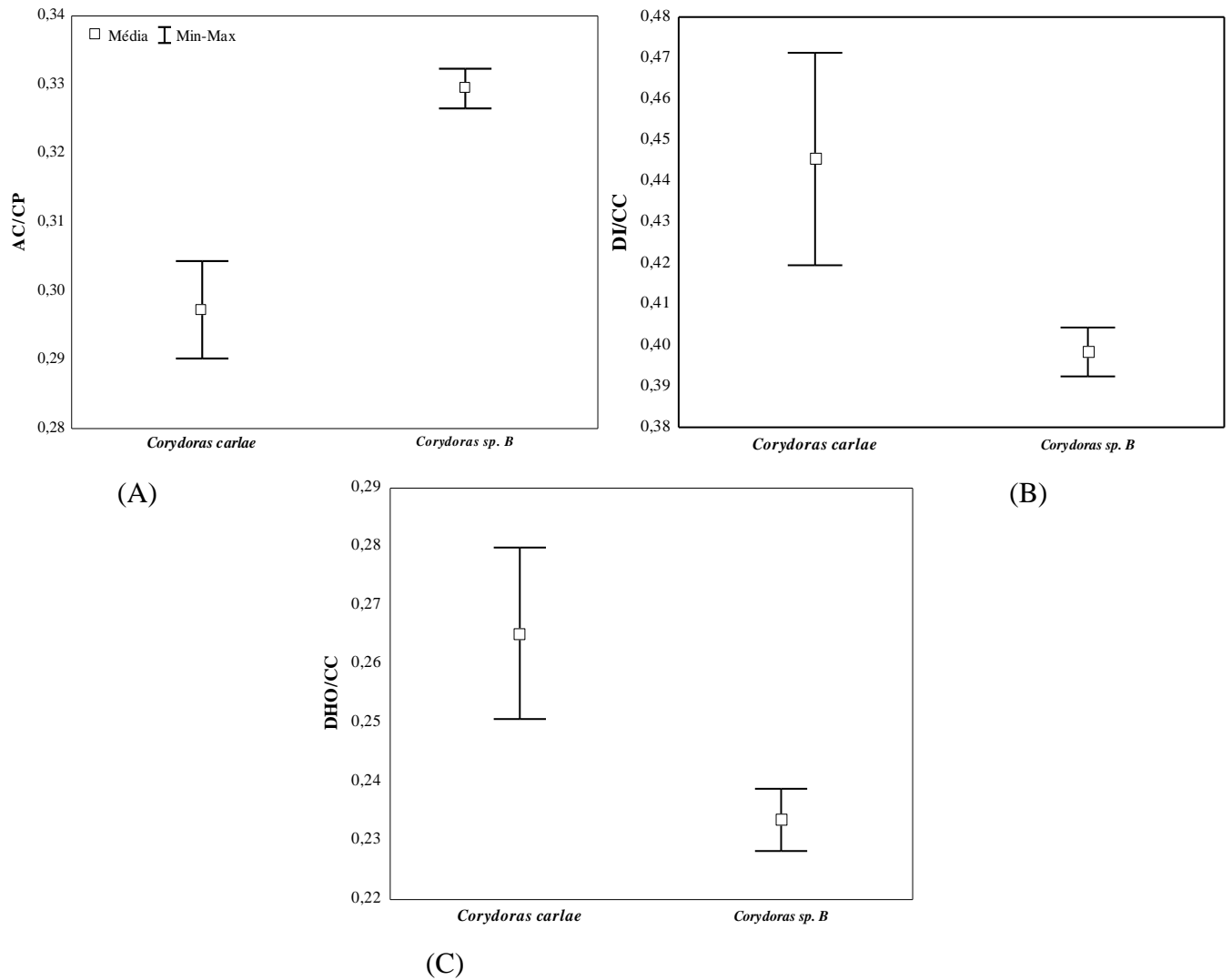


Figura 4: Análise de ordenação de Componente Principais (ACP) média e valores máximos e mínimos de *C. carlae* coletados no rio Florido, bacia do rio Iguazu e *Corydoras sp. B* do riacho Poço Preto, bacia do rio Iguazu. Proporções que apresentaram diferença significativa entre as espécies: (A) altura do corpo/ comprimento padrão; (B) distância interorbital/ comprimento da cabeça; (C) diâmetro horizontal da órbita.

4 DISCUSSÃO

4.1 Citogenética em *Corydoras*

Estudos citogenéticos realizados por Scheel et al. (1972) já demonstravam que a variabilidade cariotípica no gênero *Corydoras* é uma das maiores em espécies de peixes. Nesse contexto, Oliveira et al. (1992) dividiram as espécies de *Corydoras* estudadas em cinco grupos, levando em consideração o número diplóide e a fórmula cariotípica, sendo o grupo 1 formado pelas espécies com número diplóide variando de 60 a 86 cromossomos e fórmula cariotípica composta por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos; o grupo 2 com número diplóide variando de 74 a 102 com apenas cromossomos acrocêntricos; o grupo 3 com 56 a 60 cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos; grupo 4 de 40 a 52 cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos e o grupo 5 as espécies com 92 cromossomos e fórmula cariotípica composta por metacêntricos e submetacêntricos. Processos de poliploidia, assim como outros eventos de rearranjos cromossômicos como fusões, fissões ou inversões podem ter ocorridos durante o processo evolutivo das espécies pertencentes ao gênero *Corydoras* (Oliveira et al., 1993), o que explica a grande variabilidade cromossômica nessas espécies.

De acordo com essa divisão, *C. carlae* e *Corydoras* sp. B estariam incluídas no grupo 4, por apresentarem o número diplóide de 46 cromossomos. No entanto, as duas espécies apresentam cromossomos do tipo subteloacêntrico em sua fórmula cariotípica, ainda não observado nesse grupo. Em *Corydoras ehrhardti* e *Corydoras paleatus* o número diplóide foi de 44 cromossomos, distribuídos em 18 metacêntricos e 26 submetacêntricos (Artoni et al., 2006). Portanto, as variações numéricas e estruturais das espécies pertencentes a esse grupo indicam que rearranjos cromossômicos como fusões e fissões que alteram o número diplóide e inversões pericentroméricas, deleções e duplicações que modificam a morfologia cromossômica sem alterar o número diplóide podem ter ocorrido durante o processo evolutivo dessas espécies.

Assim como observado para o número diplóide, o número e a posição das RONS (impregnação pelo nitrato de prata) em espécies de *Corydoras* é bastante variável. Nossos resultados demonstraram que as duas espécies analisadas apresentaram RONS simples em um par de cromossomos metacêntricos em região terminal do braço longo e foram banda-C positiva. Resultado similar também foi encontrado por Shimabukuro-Dias et al. (2004) para *Corydoras sodalis*, diferindo apenas no tipo de cromossomo portador das RONS. No entanto, também já foram encontrados sistema de RONS múltiplas, como para *Corydoras ehrhardti* e *Corydoras paleatus* (Artoni et al., 2006) e para *Corydoras britskii* (Takagui et al., 2014).

A localização tanto do DNAr 18S quanto do DNAr 5S são informações bastante escassas dentro da família Callichthyidae, sendo conhecido apenas para algumas espécies (Tab. 3). O FISH do DNAr 18S em *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B demonstrou marcações em regiões terminais do braço longo de um par de cromossomos metacêntricos, confirmando a marcação da Ag-RON. Em *C. ehrhardti* também foram detectados cístrons DNAr 18S em região terminal do braço longo de dois cromossomos metacêntricos (Artoni et al., 2006). Por outro lado, em *C. britskii* foram observadas marcações em três cromossomos acrocêntricos, localizadas em região terminal do braço curto (Takagui et al., 2014), já em *C. paleatus* as marcações foram observadas em dois cromossomos metacêntricos e um submetacêntrico em região terminal no braço longo (Artoni et al., 2006).

Tabela 3: Distribuição do gene ribossomal maior e menor em Callichthyidae. As colunas 45S e 5S reportam o número de cromossomos portadores dos cístrons e sua localização.

Gênero/ Espécie	45S	5S	Nota	Referência
<i>Corydoras carlae</i>	2, q distal	2, q distal	Sintenia	Presente estudo
<i>Corydoras</i> sp. B	2, q distal	2, q distal + 1, p intersticial	Sintenia	Presente estudo
<i>Corydoras britskii</i>	3, p distal	2 p, intersticial	Não- Sintenia	Takagui et al., 2014
<i>Corydoras paleatus</i>	3, q distal	-----	Não- Sintenia	Artoni et al., 2006
<i>Corydoras ehrhardti</i>	2, q distal	-----	Não- Sintenia	Artoni et al., 2006
<i>Hoplosternum littorale</i>	2, p distal	4, p distal	Não-Sintenia	Almeida et al., 2012
<i>Callichthys callichthys</i>	2, (pq)distal	3, distal + 4 pericentromérica	Sintenia	Konerat et al., 2014
<i>Leptoplosternum pectorale</i>	10, p distal; 2, q distal	6, p distal	Não- Sintenia	Konerat et al., 2014

Em *C. carlae* e *Corydoras* sp. B o DNAr 5S, foi visualizado em um par de cromossomos metacêntricos em região terminal do braço longo. Em *Corydoras* dados da localização e número de cístrons de DNAr 5S só foram descritos para *C. britskii* que apresenta dois cromossomos com cístrons em região intersticial no braço longo (Takagui et al., 2014), diferindo dos resultados do presente estudo. Os resultados também se mostram diferentes para outros gêneros da família (Tab. 3), como em *Hoplosternum littorale* (Almeida et al., 2012), *Callichthys callichthys* (Konerat et al., 2014) e *Leptoplosternum pectorale* (Konerat et al., 2014). Além disso, o DNAr 5S apresentou sintenia com o 18S no par de cromossomo metacêntrico e também apresentou co-localização desses cístrons. A sintenia é uma característica rara em peixes, a qual é registrada aqui pela primeira vez no gênero

Corydoras, destacando o ineditismo destes resultados. Konerat et al. (2014) descreveram marcações sintênicas em *Callichthys callichthys*, sendo este o primeiro registro dessa característica para a família Callichthyidae. Assim, nossos resultados reforçam essas informações para a família. A co-localização também já foi descrita para outros grupos de peixes, como em *Mugil incilis* (Hett et al., 2011), *Astyanax faciatus* e *A. scabripinnis* (Almeida-Toledo et al., 2002) e em *Salea senegalensis* (Cross et al., 2006).

Corydoras sp. B além do par de cromossomos que apresentou co-localização do DNAr 5S e DNAr 18S, cístrons adicionais de DNAr 5S foram detectados no braço curto em um único cromossomo do par quinze, localizado em região intersticial próxima ao centrômero. Do ponto de vista evolucionário, esses dados são intrigantes porque a inserção de elementos transponíveis em sequências do DNAr 5S do par metacêntrico poderia ter levado a dispersão dessas sequências até o cromossomo submetacêntrico (par 15) de *Corydoras* sp. B. Segundo Raskina et al. (2004) um dos mecanismos responsáveis pelo processo de mobilidade de sequências de DNAr para novos sítios seria devido a ação de elementos transponíveis. A ação dos elementos transponíveis foi sugerida para justificar a diferença de número e localização dos cístrons de DNAr 5S em três espécies do gênero *Bryconamericus* (Piscor et al., 2013).

Já a heterocromatina constitutiva foi visualizada em regiões centroméricas e pericentroméricas, em grande parte do complemento cariotípico. Porém, diferenças nos cromossomos portadores da heterocromatina constitutiva são evidentes entre *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B (Fig. 3). Esses resultados diferem dos encontrados para outras espécies do gênero, como em *Corydoras nattereri*, *C. ehrhardti* e *C. paleatus* que apresentaram apenas marcações em regiões pericentroméricas (Oliveira et al., 1990; Artoni et al., 2006; Takagui et al., 2014). Em geral o padrão de distribuição e a quantidade de cromossomos C- bandados é bastante variável dentro da família Callichthyidae, *Callichthys* apresenta bandas reduzidas em região centromérica e pericentromérica, além de marcações discretas em regiões terminais (Konerat et al., 2014), *Hoplosternum* e *Megalechis* geralmente apresenta uma quantidade intermediária de cromossomos portadores de heterocromatina em regiões centroméricas e intersticiais (Shimabukuro-Dias et al., 2005).

4.2 Morfometria em *Corydoras*

As análises das proporções morfométricas das espécies amostradas de *Corydoras*, revelou que não houve sobreposição dos escores de ambas as espécies analisadas no espaço definidos pelos dois primeiros eixos da ACP. A figura 4 demonstra a não sobreposição das espécies, permitindo concluir que as espécies são diferentes. As variáveis que mais contribuíram para esse resultado foram: altura do corpo/ comprimento padrão; distância interorbital/ comprimento da cabeça e o diâmetro horizontal da órbita/ comprimento da cabeça. No entanto, Tencatt (2013) comparando morfologicamente *Corydoras* sp. B e *Corydoras carlae* encontrou que as espécies podem ser diferenciadas por apresentarem menores acúleos dorsal e peitoral (acúleo dorsal 13,7-22,5% no CP; acúleo peitoral 15,1-22,4% no CP vs. 26,6-33,6 e 25,9-31,90) o que contraria nossos resultados.

As diferenças encontradas para os dois eixos possibilitam supor tratar de diferentes espécies, visto que *C. carlae* foi coletado no rio Florido acima das Cataratas do Iguaçu, enquanto *Corydoras* sp. B foi capturado no riacho Poço Preto abaixo das Cataratas do Iguaçu. As duas espécies analisadas estão separadas por uma barreira geográfica natural (Cataratas do Iguaçu) formada a aproximadamente 22 milhões de anos e que é considerada como sendo uma das principais causas de isolamento e especiação alopátrica de espécies de peixes (Garavello et al., 1997; Agostinho e Gomes, 1997; Baumgartner et al., 2012).

Em estudos com *C. paleatus* de diferentes bacias, incluindo a do rio Iguaçu, realizado por Shibatta e Hoffmann (2005), foram propostos que as diferenças encontradas entre as populações ocorreram devido ao soerguimento das Cataratas do Iguaçu que separaram a espécie do rio Paraná das do rio Iguaçu. Já florentino & Suárez (2014) atribuíram e correlacionaram as diferenças entre populações de *C. aeneus* as características do ambiente que ao longo do tempo evolutivo foram selecionando os indivíduos com maior adaptação.

O fato de *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B estarem separados geograficamente, deve ter contribuído para estabelecer as diferenças morfológicas encontradas entre as duas espécies analisadas, visto que a falta de fluxo gênico entre as espécies resultou supostamente em um processo de especiação.

4.3 Isolamento Geográfico como causa de diferenciação de espécies

As diferenças citogenéticas e morfológicas encontradas entre as duas espécies de *Corydoras* analisadas no presente estudo se deve provavelmente devido ao isolamento geográfico causada pelo surgimento das Cataratas do Iguazu. Além dessa grande barreira geográfica, outras barreiras no rio Iguazu são observadas ao longo do seu fluxo como Salto Iacanga, Salto Grande, Salto Santiago e Salto Osorio (Maack, 2012).

O isolamento geográfico é sugerido para explicar as diferenças citogenéticas o que é refletido no número diplóide e padrões de bandeamentos, de espécies de peixes como em *Characidium* da bacia do Paraná (Pucci, 2013), em *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991) e *Astyanax altiparanae* (Hashimoto et al., 2008).

Nesse contexto, a evolução de espécies de peixes confinados aos diversos sistemas hidrográficos é resultado de um estreito relacionamento entre as histórias das bacias e as histórias evolutivas das suas espécies (Kavalco, 2003). Uma característica interessante é que as espécies de peixes de tamanho pequeno tendem a ser mais susceptíveis à especiação, visto que as populações localizadas podem divergir geneticamente das demais com maior rapidez das espécies típicas de grandes rios (Weitzman et al., 1988). No entanto, em uma visão genética a especiação causada pelo isolamento reprodutivo é uma propriedade de poucos locos individuais ou regiões genômicas, e não do genoma como um todo (Lexer & Widmer, 2008; Qvarnstron & Bailey, 2009).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados, concluímos que *Corydoras carlae* e *Corydoras* sp. B, são espécies distintas, apresentando o mesmo número diplóide, fórmula cariotípica e número de AgRONS, com diferenças na distribuição da heterocromatina constitutiva e no número de cromossomos portadores de cístrons de DNAr 5S. Além disso, a sintenia e a co-localização do DNAr 5S com o DNAr 18S são resultados inéditos para o gênero *Corydoras*. Ainda, as análises das proporções morfométricas, também confirmaram diferenças significativas entre as espécies.

As análises combinadas dos resultados citogenéticos e morfométricos foram importantes na caracterização das duas espécies e possibilitaram diferenciar *Corydoras carlae* de *Corydoras* sp. B, sendo as diferenças encontradas provavelmente devido a separação geográfica entre as espécies e a falta de fluxo gênico, o que levou a um processo de especiação, tornando-as distintas citogeneticamente e morfológicamente.

6 REFERÊNCIAS

Abell RM, Thieme L, Revenga C, Bryer M, Kottelat M, Bogutskaya N, Coad B, Mandrak N, Balderas SC, Bussing W, Stiassny M L J, Skelton G, Allen R, Unmack P, Naseka, Sindorf N, Robertson, Armijo, Higgins JV, Heibel TJ, Wikramanayake, Olson D, López H L, Reis RE, Lundberg JG, Pérez MHS, Petry P: Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience* 58(5): 403-414 (2008).

Almeida J. S, Affonso P.RADM, Diniz D, Carneiro PLS, Dias, A: Chromosomal Variation in the Tropical Armored Catfish *Callichthys Callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): Implications for Conservation and Taxonomy in a Species Complex from a Brazilian Hotspot. *Zebrafish* 10: (4), 451-458 (2013).

Almeida JS, Affonso PRAM, Dias AL. Remarkable karyotypic homogeneity in a widespread tropical fish species: *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Journal Fish Biology* 81:1415–1421 (2012).

Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ: Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetic Genome Res.* 97 (3-4): 229-233 (2002).

Agostinho AA, Gomes LC: Manejo e monitoramento de recursos pesqueiros: perspectivas para o reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO AA, GOMES LC: Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. EDUEM (1997).

Artoni RF, Terêncio ML, Vicari MR, Matiello MCA, Cestari MM, Bertollo LAC: Cytogenetics of two sympatric *Corydoras* species (pisces, siluriformes, challythyidae) of Southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 66: 191-198 (2006).

Baumgartner G, Pavanelli CS, Baumgartner D, Bifi AG, Debona T, Frana VA: Peixes do baixo rio Iguaçu. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM. Maringá- PR 387p (2012).

Bemvenuti MA e Rodrigues FL: Análise comparativa entre técnicas morfométricas aplicadas a *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes) e *Odontesthes humensis* De Buen (Osteichthyes, Atherinopsidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 19:789-796. (2002).

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetic* 1: 103-120 (1978).

Blackith RE, Reyment RA: *Multivariate morphometrics*. Academic Press, London. 410 (1971).

Britto MR: Família Callichthyidae. In: BUCKUP PA, MENEZES NA, GHAZZI MS. (Ed.). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional 75-81 (2007).

Castro RMC. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASCHI EP, MAZZONI R, PERES-NETO PR. (Eds) *Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis* Rio de Janeiro 6: 139-155 (1999).

Cavalcanti WN, Lopes PRD: Morfometria comparada de *Ctenosciaena gracilicirrhus*, *Paralanchurus brasiliensis* e *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) pela análise multivariada de redes de treliça. *Revista Brasileira de Zoologia* 7:(4) 627-635 (1990).

Cross I, Merlo A, Manchado M, Infante C, Cañavate JP, Rebordinos L: Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR,(GATA) n,(TTAGGG) n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. *Genetica* 128(1-3) 253-259. (2006).

Delariva RL, Silva JC: Fish fauna of headwater streams of Perobas Biological Reserve, a conservation unit in the Atlantic Forest of the northwestern Paraná state, Brazil. *Check List* 9: (3) 549-554 (2013).

Eschmeyer WN, Fong JD: Species by family/subfamily. Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. (Data de acesso - 10 novembro 2015) (2015).

Floretnino AC, Suárez YR: Diferenciação Morfológica entre Populações de *Corydoras aeneus* Gill (1858)(Siluriformes, Callichthyidae) em riachos das bacias hidrográficas dos Rios Paraná e Paraguai. *Biota Amazônia* 4(3), 95-99 (2014)

Frana VA, Graça WJD, Gubiani É A, Konerat JT e Margarido VP: Evidence of the color pattern variation in populations of *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes) from three streams in the upper Paraná River basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9(2): 343-350 (2011).

Froese R. e Pauly D: FishBase. Word Wide Web Eletronic Publication. Available from: <http://fishbase.org>. (Data de acesso - 10 fevereiro 2016) (2016).

Garavello JC, Pavanelli CS, Suzuki HI: Caracterização da ictiofauna do rio Iguçu. In: AGOSTINHO AA, GOMES LC: Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. EDUEM (1997).

Griffiths SP: The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57: 1453-1464 (2000).

Hashimoto D T, Gonçalves V R, Bortolozzi J, Forest F, Porto- Forest F: First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 31: 275-278 (2008).

Hett AK, Nirchio M, Oliveira C, Siccha ZR, Rossi AR e Sola L: Karyotype characterization of *Mugil incilis* Hancock, 1830 (Mugiliformes: Mugilidae), including a description of an unusual co-localization of major and minor ribosomal genes in the family. *Neotropical Ichthyology* 9(1), 107-112 (2011).

Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36: 1014- 1015 (1980).

IUCN: The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 02/03/2016 (2016).

Jackson DA: Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology* 74: 2204-2214 (1993).

Júlio JR, HF, Bonecker CC, Agostinho AA: Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu. In: Agostinho AA, Gomes LC: Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. EDUEM (1997).

KAVALCO, K. F. Contribuição citogenética a análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Piraitininga. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2003.

Konerat JT, Bueno V, Martins-Santos IC, Margarido VP: Karyotypic diversity and chromosome evolution in the armored catfishes Callichthyinae (Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 67:(2) 140-148 (2014).

Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220 (1964).

Lexer C, Widmer A: The genic view of plant speciation: recente progress and emerging questions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, United Kingdom* 363: 3023-3036 (2008).

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP: Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic and Histochemistry* 87: 433-438 (2012).

Margarido VP, Moreira-Filho O: Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* 31: 235-238 (2008).

Mccune B, Mefford MJ: PC-ORD Multivariate analysis of ecological data. MjM software. Gleneden, Oregon, USA (2007).

Maack R: Geografia física do Estado do Paraná. 2a. Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, Rio de Janeiro, J. Olympio, 442 (1981)

Moreira-Filho O, Bertollo LAC: *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae) a “species complex”. Brazilian Journal of Genetics 14: 331-357 (1991).

Nelson JS: Fishes of the world. New York: John Wiley & Sons. 4: 601 (2006).

Nijssen H, Isbrücker IJH: A review of the genus *Corydoras* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Bijdragen tot de Dierkunde 50: 190-220 (1980).

Oliveira C L, Toledo FDA, Filho SDAT: Comparative cytogenetic analysis of three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Cytologia 55(1): 21-26 (1990).

Oliveira C, Toledo LFA, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho AS: Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. Brazilian Journal of Genetics 11: (3), 557-624 (1988).

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho AS: Cytogenetic and DNA content studies on armoured catfishes of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. Brazilian Journal of Genetics. Ribeirão Preto 16: (3) 617-629 (1993).

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho AS: Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Journal of fish biology 40: (3) 419-431 (1992).

Pazza R, Kavalco KF, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC: *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil-Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. Caryologia 8:(4) 339-344. (2005).

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences* 83: 2934-2938 (1986).

Piscor D, Ribacinko-Pisco, DB, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP: Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Molecular cytogenetics* 6:(1) 1 (2013).

Qvarnström A, Bailey R I: Speciation through evolution of sex-linked genes. *Heredity* 102: 4-15 (2009).

Raskina O, Belyayev A, Nevo E: Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA clusters variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14818–14823 (2004).

Reis RE: Anatomy and phylogenetic analysis of 343 the Neotropical Callichthyidae catfish (Ostariophysi, Siluriformes). *Zool J Linn Soc* 124:105–168 (1998).

Severi WR, Hickson G, Maranhão TCF: Use of electric fishing for fish fauna survey in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 55(4): 651-660 (1995).

Scheel JJ, Simonsen V, Gyldenholm AO: The karyotypes and some electrophoretic patterns of fourteen species of the genus *Corydoras*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 10; (1) 144-152 (1972).

Shibatta OA, Orsi ML, Bennemann ST, Silva-Souza AT: Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibata OA, Pimenta JÁ: *A bacia do rio Tibagi*. Londrina, PR. 403-423 (2002).

Shibatta O, Hoffmann AC: Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jensens) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22:(2) 366-371 (2005).

Shimabukuro-Dias CK, Oliveira C, Foresti F: Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Corydoradinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Genetics and Molecular Biology* 27: (4) 549-554 (2004).

Shimabukuro-Dias CK, Oliveira C, Foresti F: Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Caryologia* 58:102–111 (2005)

Silva CC, Matta SLS, Hilsdorf AW, Langeani F, Marceniuk AP: Color pattern variation in *Trichomycterus iheringi* (Eigenmann, 1917) (Siluriformes: Trichomycteridae) from rio Itatinga and rio Claro, São Paulo, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 8(1): 49-56 (2010).

Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromérica heterochromatin. *Experimental Cell Research* 74: 304-306 (1972).

Takagui FH, Venturelli NB, Sampaio TR., Dias AL, Giuliano-Caetano L: Cytogenetic study in *Corydoras britskii* (Siluriformes: Callichthyidae), using different chromosomal banding and fluorescence hybridization in situ with rDNA probes. *Ichthyological Research* 61: (3) 201-206 (2014).

Tencatt LFC: Redescricao de *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Siluriformes: Callichthyidae) com a descricao de quatro novas especies. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais. Maringá- PR (2013).

Turner BJ, Duffoot N, Rasch EM: The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 3: 17-23 (1992).

Weitzman S H, Menezes N A, Weitzman M J: Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and south eastern Brazil. In: Heyer W R, Vanzolini P E

(Eds): Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências 379-427 (1988).

Zawadzki CH, Renesto E, Bini LM: Genetic and morphometric análisis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the rio Iguaçú basin (Brazil). *Revue Suisse de Zoologie* 106: 91-105 (1999).