

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

CASSIA FERNANDA YANO

Citogenética em peixes de cabeceiras de dois riachos pertencentes à bacia do
Alto rio Paraná, região de Toledo (PR).

Toledo
2011

CASSIA FERNANDA YANO

Citogenética em peixes de cabeceiras de dois riachos pertencentes à bacia do
Alto rio Paraná, região de Toledo (PR).

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. Vladimir Pavan Margarido
Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Makrakis

Toledo
2011

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

Y24c Yano, Cassia Fernanda
Citogenética em peixes de cabeceiras de dois riachos
pertencentes à bacia do Alto rio Paraná, região de Toledo (PR)
/ Cassia Fernanda Yano. -- Toledo, PR : [s. n.], 2011.
79 f.

Orientador: Dr. Vladimir Pavan Margarido
Co-orientador: Dr. Sergio Makrakis
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. Peixes de riachos – Citogenética – Alto rio Paraná,
bacia 2. Citogenética de peixes 3. Alto do rio Paraná, bacia –
Ecologia 4. Peixes – Cariótipo 5. Peixes – Cromossomos I.
Margarido, Vladimir Pavan, Or. II. Makrakis, Sergio, Or. III.
T.

CDD 20. ed. 597.09298162
597.015
639.313

FOLHA DE APROVAÇÃO

CASSIA FERNANDA YANO

Citogenética em peixes de dois riachos de cabeceiras pertencentes à bacia do
▸ alto rio Paraná, região de Toledo/PR

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 Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Profª Drª Maristela Cavicchioli Makrakis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2011.

Local de defesa: mini-auditório da Unioeste/Campus de Toledo.

Dedico este trabalho aos meus
pais Santos e Sueli pelo apoio,
amor e confiança.

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

Luiz Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

A Unioeste e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca pelo suporte e auxílio na realização deste estudo.

Ao prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido pelo imenso aprendizado adquirido ao desenvolver este trabalho, por exigir sempre o melhor, por acreditar no meu potencial e por incentivar meu crescimento profissional. Muito obrigada!

A prof^a Dr. Maristela Makrakis Cavicchioli pelos bons conselhos que recebi, por sempre ser atenciosa nos momentos que mais precisei, e ao prof Dr. Sergio Makrakis pela co-orientação em meu trabalho e incentivos.

A prof^a Dr. Onildes Maria Taschetto, pelo grande esforço em relação à estruturação do laboratório de citogenética, permitindo o desenvolvimento deste e de outros trabalhos.

Ao professores Dr. Orlando Moreira-Filho e Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior, pelas inúmeras contribuições que enriqueceram meu trabalho.

Aos meus pais, Santos e Sueli, por serem os exemplos que são em minha vida, por terem me educado da melhor forma possível, por exigirem de mim sempre o melhor, pelos conselhos e por acreditarem no meu potencial.

À minha irmã Carina, por todos os momentos divertidos, da cumplicidade de irmãs, pelo carinho e atenção que sempre tive em sua agradável companhia.

Ao meu namorado Airan, por ser tão especial, por toda paciência que teve comigo durante momentos difíceis, por me incentivar, me apoiar sempre, e por me fazer muito feliz.

À prof^a MSc. Jociléia Konerat, pelos ensinamentos em relação à citogenética, sempre mostrando o melhor caminho a ser seguido para obter melhores resultados e por me incentivar.

Ao Grupo de Pesquisas em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos-GETECH pelo suporte financeiro e apoio logístico nas coletas.

Ao técnico do Laboratório de Genética Fernandes João Luzzi, pelos auxílios prestados.

Ao meu amigo e colega de laboratório Leonardo por ser alguém com quem eu sempre pude contar, sendo meu companheiro de trabalho, além dos bons momentos de descontração e piadinhas.

Aos colegas de laboratório Vanessa, Mauricio e Lucas, pela ajuda, conhecimento compartilhado, conversas e momentos de diversão.

Aos colegas José Roberto, Régis, Dimas e Milico por terem sido fundamentais na captura dos peixes, pelo esforço e ensinamentos de campo.

À Suély, Eidiellen, Aline, Micheli, Joana, Cristina e Mariana, pela inestimável amizade e por me apoiarem sempre. Amizade assim é o melhor tesouro que podemos ter.

Aos colegas de mestrado Daniele, Adilson, Milton, Luceleine, Patricia, Ilson e Elaine pelos momentos de descontração e reuniões comemorativas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À Companhia Energética de São Paulo (CESP) pela bolsa concedida.

RESUMO

Estudos citogenéticos foram realizados em dois gêneros de peixes nos riachos Pindorama e Lopei, pertencentes à bacia do Alto rio Paraná, com diferentes abordagens: citossistemática e ecológico-evolutiva. Em *Heptapterus mustelinus* foi realizada a primeira caracterização citogenética no gênero, tendo sido verificado 54 cromossomos ($26m+18sm+4st+6a$), número diplóide não relatado entre os heptapterídeos até o momento estudados. Diferentemente da maioria das espécies da família, foram observadas Ag-RONs múltiplas e heterocromatina presente na região centromérica da maioria dos cromossomos do complemento, sendo estas heterocromatinas $CMA_3^+/DAPI^-$ em nove pares cromossômicos, além daquelas coincidentes com as Ag-RONs. Estes dados revelam um caminho diferente na evolução cariotípica de *H. mustelinus* em relação aos demais gêneros de Heptapteridae. No gênero *Astyanax* foi realizada uma análise comparativa entre populações de *Astyanax* aff. *paranae*, *Astyanax fasciatus* e *Astyanax altiparanae* coletadas nos riachos Pindorama e Lopei, verificando-se as tendências da evolução e diferenciação cromossômica nas três espécies. Nas populações de *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus* foram verificados 48 e 50 cromossomos, respectivamente, mas com diferenças interpopulacionais nas fórmulas cariotípicas em ambas as espécies. O número diplóide para *A. altiparanae* foi de 50 cromossomos com mesma fórmula cariotípica em ambas as populações. As três espécies apresentaram Ag-RONs múltiplas, com diferenças interpopulacionais observadas em *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus*. Em relação ao padrão de distribuição de heterocromatina, diferenças interpopulacionais foram verificadas. A ocorrência de Ag-RONs/ CMA_3^+ foi observada nas três espécies, além de bandas $DAPI^+$ em *A. altiparanae*. Os dados demonstraram que *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus* apresentaram diferenças cariotípicas interpopulacionais mais conspícuas do que as populações de *A. altiparanae*, provavelmente por características bionômicas que restringem *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus* a trechos superiores de riachos, com a fixação de rearranjos cromossômicos nas populações. Entretanto, a ausência de diferenças cariotípicas interpopulacionais em *A. altiparanae* sugerem fluxo entre as duas populações. De forma geral ficou evidente que a citogenética é uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo dentro dos grupos de peixes, e que a associação a estudos de ecologia é fundamental para compreender os processos envolvidos na dispersão de algumas espécies.

Palavras-chaves: Rearranjos cromossômicos; Ecologia de peixes; Fluorocromos; Diferenças cariotípicas.

ABSTRACT

Cytogenetics studies were carried out in two genera of fishes from Pindorama and Lopei streams, Upper Paraná River basin, with cytossistematic and ecologic-evolutionary approaches. In *Heptapterus mustelinus*, the first cytogenetics characterization in the genus was carried out, verifying 54 chromosomes ($26m+18sm+4st+6a$), which is a diploid number not observed among the Heptapteridae species till now studied. Differently from the others members of this family, multiple Ag-NORs and centromeric heterochromatin in almost all the chromosome of the complement were observed, being these heterochromatin $CMA_3^+/DAPI^-$ in nine chromosome pairs, beyond that coincident with Ag-NORs. These data show a different way in the karyotypic evolution of *H. mustelinus* in relation to the others Heptapteridae genus. In the genus *Astyanax*, an interpopulation comparative analysis was carried out in *Astyanax* aff. *paranae*, *Astyanax fasciatus* and *Astyanax altiparanae* from Pindorama and Lopei streams, in way to observe the chromosomal differentiation and the evolutionary trends in the three species. It was verified 48 and 50 chromosome in *Astyanax* aff. *paranae* and *A. fasciatus*, respectively, with interpopulation differences in the karyotypic formulae. The diploid number obtained to *A. altiparanae* was 50 chromosomes, with the same karyotypic formulae in both populations. The three species presented multiple Ag-NORs, with interpopulation differences observed in *Astyanax* aff. *paranae* and *A. fasciatus*. In relation to the heterochromatin distribution pattern, interpopulation differences were verified. The occurrence of Ag-NORs/ CMA_3^+ was observed in the three species, besides $DAPI^+$ bands in *A. altiparanae*. The results showed that *Astyanax* aff. *paranae* and *A. fasciatus* presented more conspicuous interpopulation differences than *A. altiparanae* populations, probably due bionomic characteristic that avoid the presence of *Astyanax* aff. *paranae* and *A. fasciatus* to upper segments in the streams, leading to the fixation of chromosomal rearrangements in these populations. However, the absence of interpopulation karyotypic differences in *A. altiparanae* suggests gene flow between the two populations. By the way, the present study showed that cytogenetics is an important tool in understanding the chromosomal mechanism involved in the evolutionary process in fishes group, and that the association to ecological studies is fundamental to the comprehension of dispersion process of some group of fishes.

Key-words: Chromosomal rearrangements; Ecology of fishes; Fluorochromes; Karyotypic differences.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Journal of Fish Biology*. (Capítulo 1) Disponível em: <<http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0022-1112>>; (Capítulo 2) *River Research and Applications*. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291535-1467/homepage/ForAuthors.html>>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. O sistema Alto rio Paraná e a importância dos riachos	10
1.2. Aspectos gerais da ordem Siluriformes, com ênfase na família Heptapteridae	13
1.3. Citogenética em Heptapteridae	14
1.4. Aspectos gerais da ordem Characiformes, família Characidae e gênero <i>Astyanax</i> ..	16
1.5. Citogenética no gênero <i>Astyanax</i>	19
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material e locais de coleta	24
3.2. Preparação dos cromossomos mitóticos	25
3.3. Preparo de lâminas.....	27
3.4. Determinação das AgRONS	27
3.5. Determinação da heterocromatina	27
3.6. Dupla coloração pelos Fluorocromos Cromomicina A ₃ /DAPI	28
3.7. Estudos cariotípicos.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Capítulo 1: Primeiros estudos citogenéticos no gênero <i>Heptapterus</i>	30
Apêndices	
Tabela 1.	43
Figura 1.	46
Figura 2.	47
4.2. Capítulo 2: Dispersão e diversificação em três espécies de <i>Astyanax</i>	48
Apêndices	
Figura 1.....	63
Figura 2.	64
Figura 3.	65
Figura 4.	66
Figura 5.	67
Figura 6.	68
Figura 7.	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. O sistema Alto rio Paraná e a importância dos riachos

O rio Paraná com 4.695 km de extensão é o quarto maior do mundo em termos de drenagem e décimo em relação à descarga. Sua bacia ocupa a maior parte central-sul da América do Sul, abrangendo Brasil, Paraguai e Argentina (Agostinho *et al.*, 2007a). De sua nascente, na confluência dos rios Grande e Paranaíba até sua foz, no estuário do rio da Prata, o rio Paraná drena uma área de 2.800.000 km². Provenientes de rochas cristalinas, o rio Paranaíba surge no Planalto Central, e o rio Grande nas serras da Canastra e da Mantiqueira (Stevaux *et al.*, 1997). Além destes dois grandes rios, o rio Paraná conta com importantes tributários, os rios Tietê, Verde, Pardo, Ivinhema, Paranapanema, Amambai, Ivaí, Iguatemi, Piquiri e Iguaçu (Agostinho & Júlio Junior, 1999).

Com cerca de 1.900 km em território brasileiro, o rio Paraná cruza diversos estados e tem o curso de seus principais afluentes alterados por represamentos, que são 146 registrados através de levantamentos, com 104 destinados à geração hidrelétrica. A área total alagada nessa bacia é de aproximadamente 16.700 km², contribuindo com parte significativa da água represada no Brasil (Agostinho *et al.*, 2007b). Com seu maior afluente, o Paraguai (2.559 km), o rio ocupa uma região com clima ameno, terras férteis e de fácil acesso, fatores que têm favorecido o desenvolvimento da maior concentração humana e industrial na América do Sul (Agostinho *et al.*, 2007a).

A bacia do rio Paraná está dividida em quatro grandes partes: curso superior, a partir de sua origem na confluência dos rios Paranaíba e Grande até a barragem de Itaipu (local dos saltos de Sete Quedas); curso médio, ao longo da fronteira da Argentina e do Paraguai para a confluência do rio Paraguai, perto de Corrientes (Argentina); curso inferior, correspondendo a uma vasta planície aluvial até o sul de Rosario, e delta, a partir da confluência do rio Carcarañá para o estuário de La Plata (Stevaux, 2000).

O sistema do Alto rio Paraná, curso superior, representa o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul com 3,2 milhões de km², incluindo toda drenagem do rio Paraná à montante da Usina Hidroelétrica de Itaipu (Graça & Pavanelli, 2007; Sallun *et al.*, 2007). Ocupando uma área de 802.150 km² em território brasileiro, este sistema abrange redes hidrográficas que passam pelos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Paraná e abriga grandes tributários como os rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema (Stevaux *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2003).

Os principais limites geográficos do Alto rio Paraná são: ao norte as bacias do rio Grande e Paranaíba e Serra de Caiapó, a leste o maciço Litorâneo Brasileiro, ao sul a bacia do rio Iguaçu, afluente do Médio Paraná, e a oeste a bacia do rio Paraguai e a Serra de Maracaju (Sallun *et al.*, 2007). Na margem esquerda os principais rios deste sistema são mais longos e possuem nascentes em rochas cristalinas na serra do Mar, enquanto que na margem direita os rios nascem em área da bacia sedimentar, nas serras de Maracaju e do Caiapó (Stevaux *et al.*, 1997).

Um dos afluentes do rio Paraná, o rio São Francisco Verdadeiro, cuja nascente está localizada em Cascavel-PR, tem uma área de 2.219,1 km², abrangendo onze municípios do Oeste do Estado do Paraná. O rio deságua no reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu e ao longo desse trajeto, o curso d'água e seus tributários passam por áreas urbanas e terras agrícolas em aproximadamente 10.000 propriedades rurais (PHI, 2010; Gubiani *et al.*, 2010). A bacia do rio São Francisco Verdadeiro tem como principais afluentes o rio do Ouro, rio Central e rio das Antas, com volume de chuva anual de 1.800 mm, concentrada no período de outubro a maio; possui vazão média anual de 62 m³/s, comprimento de 91,6 km e largura de 28 km. Em relação ao volume de água potencial de superfície, o rio São Francisco Verdadeiro possui 2.000 milhões m³/ano, já em relação a água subterrânea, a bacia encontra-se acima do maior aquífero contíguas no mundo, o aquífero Guarani (Unesco, 2010).

Associado ao Alto rio Paraná há um grande número de riachos e cabeceiras, ambientes que são habitados principalmente por espécies de peixes de pequeno porte, geralmente com menos de 15 cm de comprimento padrão, com distribuições geográficas restritas e pouco ou nenhum valor comercial (Agostinho & Júlio Junior, 1999; Castro, 1999). A região do Alto rio Paraná é uma das áreas com maior número de estudos ictiofaunísticos realizados, e ainda assim faltam muitos estudos tendo em vista a diversidade presente (Súarez & Lima-Junior, 2009). Levantamentos sobre a diversidade de peixes vêm sendo bastante realizados nesta bacia (Castro *et al.*, 2003, 2005; Langeani *et al.*, 2007, Gubiani *et al.*, 2010), tendo sido verificado 310 espécies de peixes, sendo que das 52 espécies novas potenciais, 36 são de riachos, mostrando a relevância destes ambientes (Langeani *et al.*, 2007).

Os riachos, componentes comuns nas bacias hidrográficas, são ecossistemas que geralmente apresentam grande diversidade de ambientes, caracterizados por leito rochoso, águas límpidas, fortes correntezas, temperaturas relativamente baixas e elevadas concentrações de oxigênio (Oyakawa *et al.*, 2006). Também são áreas frágeis e sensíveis a perturbações antropogênicas ao longo de seus cursos, tais como construção de pequenas barragens (tanto para irrigação ou construção de açudes), uso descontrolado de pesticidas e

fertilizantes, destruição da vegetação ripária, assoreamentos e introdução de espécies exóticas (Böhlke *et al.*, 1978; Castro, 1999).

Ambientes lóticos, os riachos geralmente possuem alta concentração de oxigênio e possuem características próprias como a presença de barreiras físicas naturais como cachoeiras e rochas, além de áreas sombreadas e outras abertas, diferentes substratos e níveis de profundidade. As espécies que habitam pequenos riachos, em geral apresentam características que favorecem a ocorrência de eventos vicariantes, distribuição geográfica restrita, pouco valor comercial e dependem da vegetação ripária para alimentação, reprodução e abrigo (Castro, 1999).

Esses ambientes podem sofrer alguns impactos em decorrência da ocupação humana, que não se resumem apenas em consequências como a poluição. A urbanização também resulta em aumento da densidade de estradas e de uma associação ao aumento do número de córregos atravessados por estradas (Wheeler *et al.*, 2005). O aumento da construção rodoviária associada com a urbanização pode resultar em fragmentação e perda de populações de peixes em riachos (Benton *et al.*, 2008).

Os peixes podem ser bastante influenciados pelo padrão direto de conectividade aquático (Shurin *et al.*, 2009). Em riachos, o isolamento é frequentemente equiparado como uma variável continua tal como o volume do fluxo e variabilidade destes ambientes, já que pode impedir a dispersão em diferentes graus (Taylor & Warren, 2001). A dispersão pode limitar a variedade de espécies e a diversidade de comunidades. Apesar de sua importância, pouco é conhecido sobre seu papel em habitats de água doce e sua relação em ambientes lóticos (Shurin *et al.*, 2009). O uso de informações filogenéticas é fundamental para o entendimento dos aspectos biogeográficos e de variação espacial das espécies de riacho, visto que a biogeografia histórica fornece as hipóteses necessárias para o entendimento da origem da diversidade do grupo (Buckup, 1999).

A avaliação da diversidade cariotípica torna-se interessante em espécies que habitam estes ambientes, principalmente pelo fato da variedade nos riachos tropicais, associada por vários autores a um aumento na heterogeneidade de habitats, o qual, por sua vez, é relacionado principalmente a um aumento na vazão e na disponibilidade de abrigos (Caramaschi, 1986; Garutti, 1988; Uieda, 1995). A citogenética de peixes é uma importante ferramenta para a caracterização das espécies, em estudos citotaxonômicos, além de sugerir tendências evolutivas dentro dos diversos grupos (Bertollo *et al.*, 1978; Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Vissotto *et al.*, 1999; Vicari *et al.*, 2008).

Peixes neotropicais apresentam uma diversidade cromossômica alta com variações em número diplóide, cromossomos sexuais, e cromossomos supranumerários, e muitos casos de variações estruturais chamados polimorfismos (Galetti Junior, 1998). Variações cromossômicas podem ser vantajosas, desvantajosas, ou neutras. As desvantajosas são eliminadas rapidamente de populações, enquanto as variações vantajosas e neutras podem ser transmitidas para os descendentes e podem contribuir com variações cariotípicas dentro das espécies (Mazzuchelli *et al.*, 2007).

1.2. Aspectos gerais da ordem Siluriformes, com ênfase na família Heptapteridae

Os peixes formam um grupo muito diversificado e de muita importância, tanto econômica quanto ecológica, constituindo cerca de 28.000 espécies válidas distribuídas em 62 ordens (Nelson, 2006). Dentre essas ordens, Siluriformes é representada por um grupo de peixes conhecido popularmente como bagres e cascudos, possui cerca de 3090 espécies reconhecidas como válidas distribuídas entre 478 gêneros e 36 famílias (Ferraris Junior, 2007).

Os Siluriformes apresentam características morfológicas distintas como corpo nu envolto por uma pele espessa ou coberto por placas ósseas, nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e da dorsal portador de um acúleo forte, o qual, muitas vezes produz toxina associada à glândula de veneno. Presença de nadadeira adiposa geralmente bem desenvolvida e nadadeira caudal assumindo formatos variáveis e de um a quatro pares de barbilhões sensitivos (Britski *et al.*, 1988).

Os representantes da ordem Siluriformes são os mais diversos e amplamente distribuídos dentro do grupo Ostariophysi. São encontrados na América do Sul, América do Norte, Eurásia e África e representantes fósseis foram encontrados na Antártida (Pinna, 1998). Este grupo de peixes habita principalmente ambientes de água doce, mas algumas espécies possuem tolerância à salinidade de estuários ou até mesmo a níveis de salinidade oceânica. Assim, enquanto a maioria dos bagres vive em águas interiores, a distribuição da ordem também inclui as regiões costeiras dos continentes e próximas a ilhas (Ferraris Junior, 2007). Duas famílias incluem representantes marinhos, Ariidae e Plotosidae, e além disso, Pimelodidae, Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae incluem espécies de estuário que podem ainda, apresentar certa tolerância a ambientes marinhos (Pinna, 1998).

Esta ordem é uma das mais representativas, e juntamente com Characiformes, compreende aproximadamente 80% das espécies de peixes Neotropicais (Agostinho *et al.*,

2007a; Langeani *et al.*, 2007a), apresentando na bacia do Alto rio Paraná esta mesma representatividade (Castro *et al.*, 2003, 2005; Graça & Pavaneli, 2007; Aquino *et al.*, 2009).

Uma das famílias desta ordem, Heptapteridae com 26 gêneros é endêmica da região Neotropical (Bockmann & Guazzelli, 2003), possuindo 203 espécies (Froese & Pauly, 2010). Os heptapterídeos são peixes de pequeno porte, atingindo cerca de 20 cm, com hábitos alimentares variados, sendo onívoros ou carnívoros. Não possui cuidado parental, além de serem solitários ou formarem pequenos grupos em pequenos corpos d'água ou escondidos na vegetação. Como muitos outros Siluriformes, são adaptados a vida bentônica, e geralmente vivem em riachos de segunda a quinta ordem. A presença e grande abundância de heptapterídeos é notável em riachos com densa cobertura vegetal e com água de boa qualidade, de modo que atuam como eficientes indicadores da saúde do ambiente (Bockmann & Guazzelli, 2003).

Anteriormente considerada uma subfamília dentro de Pimelodidae (Heptapterinae, Pimelodinae e Pseudopimelodinae) por Pinna (1998), Heptapteridae foi elevada a categoria de família (Bockmann & Guazzelli, 2003; Ferraris Junior, 2007). De acordo com Froese & Pauly (2010), o gênero *Heptapterus* Bleeker, 1858 possui 9 espécies válidas. Dentre estas espécies, *Heptapterus mustelinus* (Valenciennes, 1835), conhecida popularmente no Brasil como bagre-de-pedra, não possui dimorfismo sexual e atinge cerca de 20 cm de comprimento. Com distribuição pela América do Sul, *H. mustelinus* tem sido observada em riachos da bacia do Alto rio Paraná (Langeani *et al.*, 2007) e neste mesmo sistema, na micro-bacia do rio São Francisco Verdadeiro (Gubiani *et al.*, 2010).

Em relação às características morfológicas, o gênero *Heptapterus* possui cabeça e corpo muito alongado, coberto com pele macia, olhos pequenos, palato desdentado e seis barbilhões. Nadadeira adiposa longa, baixa, confluenta ou quase contínua com o caudal, uma nadadeira dorsal curta com sete raios, nadadeira anal de comprimento moderado, nadadeira caudal obliquamente arredondado e nadadeira ventral com seis raios (Günther, 1864).

1.3. Citogenética em Heptapteridae

A citogenética de peixes tem se revelado de extrema importância tendo em vista a diversidade de espécies. Bertollo *et al* (1986) ressaltaram o valor da citogenética para a taxonomia, através de uma boa caracterização cromossômica das espécies, a evidência cariotípica para as suas relações evolutivas e o suporte adicional para colaborar na identificação de espécies. Diante da diversidade observada no grupo dos peixes, inúmeros

dados citogenéticos tem sido produzidos nos últimos anos, em torno de 1.150 espécies, e destas, 318 espécies da ordem Siluriformes (Oliveira *et al.* 2009)

Vários estudos citogenéticos vêm sendo realizados em Heptapteridae, contribuindo para o melhor entendimento da diversidade neste grupo (Hochberg & Erdtmann, 1988; Dias & Foresti, 1993; Abucarma & Martins-Santos, 2001; Maistro *et al.*, 2002; Fenocchio *et al.*, 2003; Stolf *et al.*, 2004; Margarido & Moreira-Filho, 2008; Kantek *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010). Apesar disso, em apenas 5 dos 26 gêneros da família existem dados disponíveis, sendo a maior parte no gênero *Rhamdia* Bleeker, 1858. Os primeiros dados citogenéticos revelados nesta família foram através de estudos de Toledo & Ferrari (1976) em *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), (citada como *Rhamdia hilarii*) e *Pimelodella* sp. na bacia do Alto rio Paraná. O número diplóide em Heptapteridae varia de 42 cromossomos em *Imparfinis hollandi* Haseman, 1911 (Margarido & Moreira-Filho, 2008) a 58 cromossomos, como em *Pimelodella kronei* (Miranda Ribeiro, 1907) (Almeida-Toledo *et al.*, 1992), *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart & Gomes, 1959 (Vissotto *et al.*, 1999), entre outras, havendo o predomínio deste número diplóide.

Alto número fundamental e riqueza de cromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos é relatado para a maioria das espécies da família, como em *Cetopsorhamdia iheringi* por Vissotto *et al.* (1999), em *Imparfinis* aff. *schubarti* (Gomes, 1956) por Stolf *et al.* (2004), em *Pimelodella meeki* por Vidotto *et al.* (2004), além de espécies que apresentaram cromossomos apenas deste dois tipos como *Imparfinis mirini* Haseman, 1911 (Vissotto *et al.*, 1997), *R. quelen* (Maistro *et al.*, 2002) e *Pimelodella boschmai* Van der Stigchel, 1964 (Garcia & Almeida-Toledo, 2010). De acordo com Oliveira e Gosztonyi (2000), um elevado número fundamental em Siluriformes corresponde a uma condição plesiomórfica.

Uma característica comum neste grupo é o predomínio de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) simples, na região terminal dos braços curtos de cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos, havendo em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, porém mais raros. Outra particularidade interessante desta família é o que ocorre em quase todas as espécies de *Cetopsorhamdia* (Eigenmann & Fisher, 1916) e *Imparfinis* (Eigenmann & Norris, 1900), a evidência de RONs na região intersticial em um par cromossômico (Vissotto *et al.*, 1997; Vissotto *et al.*, 1999; Vissotto *et al.*, 2001; Fenocchio *et al.*, 2003; Stolf *et al.*, 2004; Kantek *et al.*, 2009).

A maioria dos representantes em Heptapteridae apresenta pouca heterocromatina, dificultando a observação precisa destes segmentos (Vasconcelos & Martins-Santos 2000; Maistro *et al.*, 2002; Stivari & Martins-Santos, 2004; Margarido & Moreira-filho, 2008). O

padrão da heterocromatina encontrado é basicamente em regiões terminais de quase todos os cromossomos, bem como em regiões centroméricas e pericentroméricas em alguns estudos (Fenocchio *et al.*, 2000; Vissotto *et al.*, 2001; Swarça *et al.*, 2003; Vidotto *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2007).

Outra característica observada na família é a presença de cromossomos Bs, de diferentes tamanhos. Almeida-Toledo *et al.* (1992) verificaram um micro cromossomo B em *Pimelodella kronei*, além disso Fenocchio & Bertollo (1990), Abucarma & Martins-Santos (2001), Hochberg & Erdtmann (1988) observaram mais de um pequeno cromossomo B além do complemento. Maistro *et al.* (2002) e Valcarcel *et al.* (1993) verificaram médios cromossomos deste tipo e Stivari & Martins-Santos (2004) observaram variação de 1 a 4 grandes cromossomos Bs em *Rhamdia quelen*.

A variação cariotípica, tanto em relação a diferenças no número diplóide como na macroestrutura cromossômica foi observada em Heptapteridae e vários estudos apontaram mecanismos para a diferenciação cariotípica. Margarido & Moreira-Filho (2008) atribuíram a eventos de fusões em *tandem* a redução do número diplóide para 42 cromossomos em *Imparfinis hollandi* Haseman, 1911, que originaram quatro grandes pares de cromossomos assimétricos. Já o principal rearranjo cromossômico responsável pela redução do número diplóide em *Pimelodella* foi sugerido ser através de translocação robertsoniana (Vasconcelos & Martins-Santos, 2000).

Em *Rhamdia* spp., o alto grau de variabilidade na macroestrutura cromossômica observado e sem mudança no número diplóide foi atribuído por Garcia *et al.* (2010) a rearranjos não-Robertsonianos, principalmente inversões. Assim como Vissotto *et al.* (2001) em *Imparfinis* cf. *piperatus* Eingenmann & Norris, 1900, que avaliaram que as diferenças na fórmula cariotípica e no número fundamental observados em algumas espécies ou populações de *Imparfinis* Eingenmann & Norris, 1900 são devido a pequenos rearranjos cromossômicos fixados durante o processo evolutivo.

1.4. Aspectos gerais da ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Astyanax*

A ordem Characiformes é uma das mais representativas, com cerca de 1.700 espécies distribuídas em 270 gêneros e 18 famílias (Nelson, 2006). Destas espécies, 475 possuem dados citogenéticos (Oliveira *et al.*, 2009). As espécies desta ordem possuem geralmente corpos pequenos e prateados, comportamento diurno, linha lateral completa ou incompleta, nadadeira adiposa freqüentemente presente, a presença de um órgão sensorial chamado

Aparelho de Weber e a intolerância à água salgada (Weitzman & Malabarba, 1998). Dentes em geral bem desenvolvidos (a maioria são carnívoros), mandíbula superior geralmente não verdadeiramente protrátil, dentes faríngeos normalmente presentes, mas geralmente não especializada como nos Cypriniformes e barbelas ausentes (Nelson, 1994).

A origem dos Characiformes data de mais de 100 milhões de anos atrás, quando África e América do Sul formavam uma única massa continental chamada Gondwana (Ortí & Meyer, 1997). Neste grupo ocorre uma variedade de especializações ecológicas, com uma gama de formas de alimentação, como detritívoros, planctívoros, herbívoros e carnívoros. Algumas espécies possuem adaptações morfológicas e fisiológicas para permitir a sobrevivência em condições de baixa concentração de oxigênio; além disso, alguns grupos em Characiformes exibem comportamento de nidificação e cuidado parental. Incluem espécies de grande porte atingindo um tamanho de 100-130 cm de comprimento, como o Dourado pertencente ao gênero *Salminus*, até espécies de pequeno porte (Ortí & Vari, 1997).

A família Characidae é um grupo bastante diversificado com cerca de 950 espécies e 165 gêneros (Reis *et al.*, 2003) e devido ao grande tamanho da família e da sua natureza heterogênea, as espécies são agrupadas em 13 subfamílias, devido a inclusão de Stervadiinae (Weitzman *et al.*, 2005). São listados nesta família 88 gêneros como *Incertae Sedis*, incluindo 620 espécies, abrangendo uma assembléia amplamente heterogênea de peixes de grande a pequeno porte. Neste grupo 64% ou 399 espécies são atribuídas como especiosas, taxonomicamente pouco conhecidas e possivelmente constituindo gêneros não monofiléticos em Characidae (Lima *et al.*, 2003).

Muitas famílias de Characiformes possuem evidências de monofiletismo, por apresentarem certas especializações, como Cheirodontinae, por apresentar caracteres relacionados à morfologia dentária, à musculatura e ao padrão de colorido na região umeral, que suportam seu monofiletismo (Malabarba, 1998). Porém em algumas famílias, como Characidae, não há consenso do monofiletismo e sua composição (Mirande, 2010). Tetragonopterinae era tida como a mais especiosa entre as subfamílias de Characidae, e pela carência de dados que suportariam o seu monofiletismo, foi considerada apenas com o gênero *Tetragonopterus*. Os demais gêneros de Tetragonopterinae, entre eles *Astyanax* Baird e Girard, 1854, foram listados em *Incertae Sedis* (Lima *et al.*, 2003).

O gênero *Astyanax* possui 128 espécies válidas de acordo com dados atuais (Froese & Pauly, 2010). Eigenmann (1917) considerou *Astyanax* um gênero primitivo dentro da família, além de identificar linhas de evolução divergentes, produzindo um gênero polifilético. Os peixes deste gênero são dominantes na América do Sul, são pequenos, comprimidos, mais ou

menos alongados, raramente com tamanho maior que 150 mm, sendo geralmente menores, com exceção de *Astyanax maximus*, atingindo até 200 mm. *Astyanax* apresenta duas séries de dentes, linha lateral completa, ausência de escamas na nadadeira caudal, ossos infra-orbitais que não cobrem completamente a face e presença de nadadeira adiposa (Eigenmann, 1917).

Grande parte das espécies de Characidae é de pequeno porte, sendo conhecida no Brasil pelos nomes de lambari, piquira, piaba e matupiri (Buckup, 1999). A maioria das espécies de pequeno porte apresenta capacidade de deslocamento restrita dentro de grandes bacias hidrográficas e que, além disso, para praticamente todos os peixes, extensões de terra seca de quaisquer dimensões constituem barreiras e é possível imaginar que, ao longo dos mais de 65 milhões de anos da história evolutiva dos Otophysi, um grande número de alterações geográficas e ecológicas tenha ocorrido nos corpos d'água sul-americanos, gerando numerosos eventos de vicariância (Castro, 1999).

As espécies do gênero *Astyanax* apresentam ampla distribuição geográfica, principalmente quando se considera a ictiofauna de riachos da bacia do Alto rio Paraná (Súarez & Lima-Junior, 2009). Dentre essas espécies, *Astyanax paranae* Eigenmann (1914), *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) e *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 têm ampla distribuição e têm sido verificadas nos levantamentos ictiofaunísticos desta bacia hidrográfica (Castro *et al.*, 2003; Langeani *et al.*, 2007).

Astyanax paranae foi descrita por Eigenmann (1914), como um pequeno lambari considerada uma espécie comum na bacia do Alto rio Paraná, formando numerosas populações isoladas entre si em cabeceiras de rios (Garutti & Britski, 2000) e, além disso, faz parte do complexo *A. scabripinnis* (Bertaco & Lucena, 2006). *Astyanax fasciatus* foi originalmente descrito por Cuvier em 1819 como *Chalceus fasciatus*, tipicamente habitando rios brasileiros (Eigenmann, 1917), e apesar do porte reduzido é de grande importância como elo na cadeia alimentar (Gurgel, 2004). *Astyanax altiparanae* era conhecido como *Astyanax bimaculatus*, peixe muito comum nos rios e córregos da bacia do alto rio Paraná. Recebeu esta nova denominação após a revisão realizada por Garutti & Britski (2000) para o gênero *Astyanax*.

1.5. Citogenética no gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* possui inúmeros dados citogenéticos, e os primeiros estudos foram feitos por Jim & Toledo (1975) em *A. fasciatus* e *A. altiparanae* (referido como *Astyanax bimaculatus*). Desde então as espécies deste gênero foram bastante avaliadas citogeneticamente, trazendo contribuições dentro da citogenética de peixes, tendo em vista a diversidade de abordagens, tanto em relação à caracterização das espécies bem como inferências ecológicas e biogeográficas para explicar diferenças entre populações.

O número diplóide em *Astyanax* varia de 36 cromossomos em *Astyanax schubarti* (Morelli *et al.*, 1983) a 50 cromossomos em *A. scabripinnis*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *Astyanax jacuhiensis* (Souza & Moreira-Filho, 1995; Artoni *et al.*, 2006; Ferreira Neto *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2010). *Astyanax* compreende um grupo interessante para estudos citogenéticos, constituído por espécies com diferentes tendências de evolução, além da variação no número diplóide são verificadas diferenças na fórmula cariotípica, a presença de cromossomos Bs, triploidia, polimorfismos na heterocromatina, bem como variação no número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (Kavalco *et al.*, 2007).

As espécies *A. scabripinnis*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* têm sido consideradas como um “complexo de espécies”, caracterizado por espécies morfologicamente muito semelhantes (Fernandes & Martins-Santos, 2004). Moreira-Filho & Bertollo (1991) atribuíram pela primeira vez o termo complexo de espécies em *A. scabripinnis* quando encontraram diferenças cariotípicas e morfológicas pertencentes a riachos de diferentes bacias e a diferentes riachos dentro da mesma bacia. Estes autores encontraram diferenças no número diplóide, nos tipos cromossômicos e padrão de heterocromatina entre as populações. Fazem parte do complexo *Astyanax scabripinnis* 17 espécies (Bertaco & Lucena, 2006; Bertaco *et al.*, 2010).

Lowe-McConnell (1969) afirmou que as espécies podem ficar isoladas geograficamente nas cabeceiras de tributários, e as barreiras podem ser físicas (como a velocidade do fluxo de água ou tipo de leito), químicas (verificadas na composição da água) ou bióticas (como movimentos da superfície da terra). Tais alterações ecológicas permitem o isolamento microgeográfico em diferentes trechos e em alguns grupos de peixes. Corroborando esta afirmação, Moreira-Filho & Bertollo (1991) observaram que nos estudos das espécies do complexo *Astyanax scabripinnis*, bem como outras espécies com características similares, é importante interpretar os dados obtidos não somente como um

papel do isolamento causado por divisores dos maiores sistemas hidrográficos, mas principalmente como um papel dos diferentes ambientes como os riachos.

Os números cromossômicos encontrados em *A. scabripinnis* são de 46 cromossomos (Moreira-Filho & Bertollo, 1991), 48 cromossomos (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Souza *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Maistro *et al.*, 2000; Alves & Martins-Santos, 2002; Fernandes & Martins-Santos, 2003; Vicari *et al.*, 2008) e 50 cromossomos (Morelli *et al.*, 1983; Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Stange & Almeida-Toledo, 1993; Fauaz *et al.*, 1994; Souza & Moreira-Filho, 1995; Porto-Foresti *et al.*, 1997; Maistro *et al.*, 1998; Néo *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001; Kavalco *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008).

Evidências de alguns processos de diferenciação cariotípica envolvidos na evolução dos peixes foram fornecidas por análises de número, quantidade e variabilidade posicional das regiões heterocromáticas e RONS (Margarido & Galetti Junior, 2000; Mantovani *et al.*, 2004). Este tipo de análise se tornou uma importante ferramenta para o entendimento das relações dentro do grupo *scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2000). A presença de RONS múltiplas é mais comum em *A. scabripinnis*, e diferença numérica e posicional das RONS foram verificadas entre as populações (Maistro *et al.*, 1998; Mantovani *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2001).

Variação entre populações em relação ao padrão de heterocromatina também foi verificada, como nos trabalhos realizados por Moreira-Filho & Bertollo (1991), Maistro *et al.* (1998). Souza & Moreira-Filho (1995) quando compararam populações em diferentes altitudes, observaram uma das populações com blocos pericentroméricos e teloméricos de heterocromatina e outra população com poucas bandas distribuídas. Diferenças no cariótipo em populações de *A. scabripinnis* são devido ao fato dessas espécies comporem populações restritas a cabeceiras de pequenos riachos (Souza & Moreira-Filho, 1995).

Em relação a *A. fasciatus* vários estudos indicam a existência de populações bem diferenciadas ao longo dos sistemas hidrográficos brasileiros. O nível de divergência entre elas sugerem a ocorrência de um complexo de espécies (Pazza *et al.*, 2006; Medrado *et al.*, 2008, Pazza *et al.*, 2008). *Astyanax fasciatus* apresentou os seguintes números diplóides, 45 cromossomos (Pazza *et al.*, 2006), 46 cromossomos (Jim & Toledo, 1975; Morelli *et al.*, 1983; Pazza *et al.*, 2006), 47 cromossomos (Pazza *et al.*, 2006), 48 cromossomos (Morelli *et al.*, 1983; Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2006; Medrado *et al.*, 2008) e 50 cromossomos (Artoni *et al.*, 2006).

Alguns estudos demonstraram a presença de diferentes cariomorfos em simpatria, como observado por Artoni *et al.* (2006), em que verificaram a presença de três cariomorfos

no Alto rio Tibagi. Pazza *et al.* (2006) observaram ao menos seis cariomorfos em Cachoeira das Emas, no rio Mogi Guaçu e os autores atribuíram este fato a possíveis cruzamentos aleatórios entre os cariomorfos e/ou entre os descendentes deles. Se esse for o caso, deve haver uma relativa plasticidade cariotípica para esta espécie, onde ao menos umas poucas combinações cromossômicas não devem ter um efeito forte para causar efeitos deletérios para provocar inviabilidade nos portadores deles (Pazza *et al.*, 2006)

Além disso, diferenças entre populações também foram verificadas, tanto em relação ao número diplóide quanto na fórmula cariotípica (Morelli *et al.*, 1983; Medrado *et al.*, 2008). As diferenças encontradas entre as populações e bacias parecem ser causadas por restrições do fluxo gênico relatados pela presença de obstáculos naturais ou eventos históricos (Medrado *et al.*, 2008). Diferenças no número e posição das RONS, e no padrão de heterocromatina também foram verificadas entre populações de *A. fasciatus* (Medrado *et al.*, 2008).

Contrastando com as espécies de *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* que apresentam variação no número cromossômico, *A. altiparanae* possui uma estabilidade no número diplóide, com 50 cromossomos observados em todos os estudos (Jim & Toledo, 1975; Pacheco *et al.*, 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2008; Ferreira Neto *et al.*, 2009). Este fato provavelmente deve-se ao comportamento migratório da espécie, mesmo dentro de distâncias curtas (Orsi *et al.*, 2002). Garutti & Britski (2000) afirmam que a migração pode levar a homogeneização do número diplóide neste peixe, amplamente distribuídas ao longo da bacia do Alto rio Paraná.

Apesar desta tendência para o conservadorismo, existem diferenças na fórmula cariotípica, no número e localização das RONS e pequenas variações no padrão de heterocromatina entre populações de *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007; Ferreira Neto *et al.*, 2009). De acordo com Fernandes & Martins-Santos (2004) essas características levam *A. altiparanae* a pertencer a um complexo de espécies, à semelhança do que tem sido relatado em outras espécies do mesmo gênero. Ferreira Neto *et al.* (2009) afirmam que essas pequenas diferenças cariotípicas detectadas indicam alguma divergência evolutiva devido a restrições de fluxo gênico.

A presença de cromossomos Bs foi observada em *A. scabripinnis* (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Souza & Moreira-Filho, 1995; Porto-Foresti *et al.*, 1997; Ferro *et al.*, 2001; Alves & Martins-Santos, 2002), em *A. fasciatus* por Moreira-Filho *et al.* (2001), em *A. altiparanae* por Hashimoto *et al.* (2008). De acordo com Porto-Foresti *et al.* (1997), a frequência de cromossomos Bs foi alta em cabeceiras de riachos, mas reduzida quando os peixes habitavam outros segmentos do riacho. Eles sugerem que estes cromossomos podem

conferir uma vantagem adaptativa para os peixes de cabeceiras de riacho. Para explicar as diferenças encontradas tanto em relação ao número diplóide bem como na morfologia dos cromossomos nestes três complexos de espécies, Souza & Moreira-Filho (1995) e Alves & Martins-Santos (2002) atribuíram ao isolamento geográfico, principalmente em cabeceiras de pequenos riachos onde ocorreram eventos sucessivos de rearranjos cromossômicos, fixados independentemente nas populações locais, diferenciando uma da outra.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diante da relevância de ambientes como cabeceiras de riachos e a diversidade de espécies de peixes presentes, estudos devem ser feitos para conhecer a variabilidade genética, e a partir deste conhecimento propor mais pesquisas em diversas áreas para a conservação ambiental.

Assim foi objetivo deste trabalho caracterizar o cariótipo de quatro espécies residentes nas cabeceiras de riachos buscando o entendimento da evolução cromossômica, da diversificação específica, bem como fornecer subsídios à citotaxonomia e ao estudo das relações filogenéticas dos grupos estudados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material e locais de coleta

Foram estudados exemplares dos riachos Pindorama e Lopei, afluentes do rio São Francisco Verdadeiro, na bacia do Alto rio Paraná. Os peixes (10 a 20 indivíduos/espécie) foram coletados através de equipamentos como tarrafas e redes de bloqueio, levados vivos para os laboratórios de Genética da UNIOESTE – Cascavel e mantidos em aquários aerados. Foram sacrificados por *overdose* de óleo de cravo (Griffiths, 2000) (Conforme Comitê de ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas da Unioeste: Protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste) para retirada de tecidos para preparações citogenéticas.

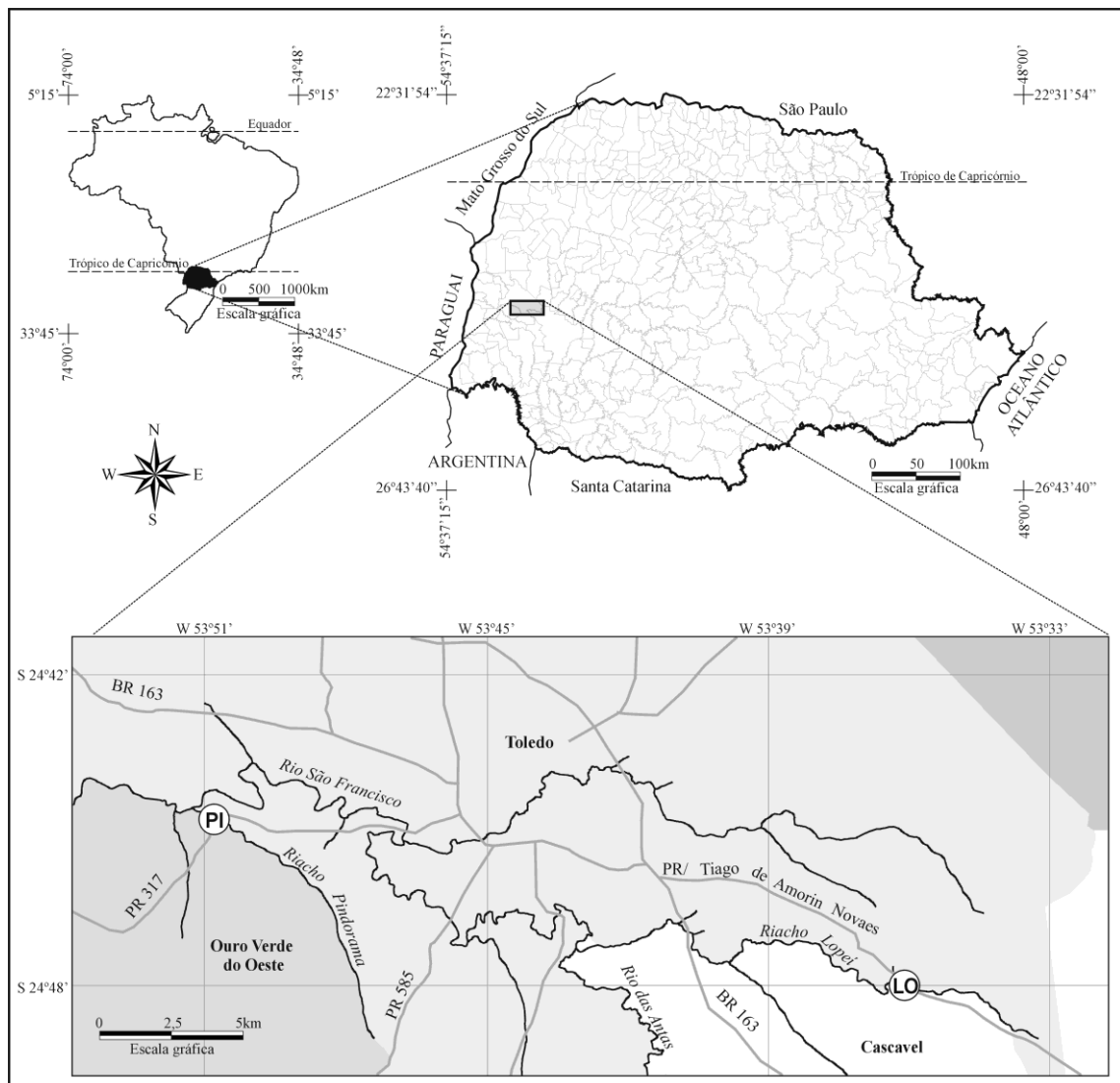


Figura 1. Pontos de coleta das espécies: (LO) riacho Lopei e (PI) riacho Pindorama.

3.2. Preparação dos cromossomos mitóticos

A. Preparação *in vivo* (Bertollo *et al.*, 1978)

1. Injetar intra-abdominalmente uma solução de colchicina 0,025% na proporção de 1 ml para cada 100g de peso do animal. Manter o peixe em aquário aerado por aproximadamente 30-40 minutos.
2. Anestesiá-lo por *overdose* de óleo de cravo, sacrificando-o sem seguida.
3. Retirar uma porção do rim anterior, transferindo-a em aproximadamente 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), dissociando-o com auxílio de pinças de dissecação e seringa hipodérmica, procurando obter uma suspensão celular.
4. Incubar o material em estufa a 37°C durante 25-30 minutos.
5. Retirar a suspensão celular da estufa, e adicionar 5-10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Ressuspender levemente com pipeta de Pasteur. Levar a centrífuga (900rpm) por 10 minutos.
6. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 7-10 ml de fixador. Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm.
7. Repetir o passo 6 por mais duas vezes.
8. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1-2 mL de fixador, ressuspender o material.
9. Acondicionar o material em tubos plásticos tipo Ependorff e guardá-los no refrigerador.

B. Preparação *in vitro* (Foresti *et al.*, 1993)

1. Anestesiado o animal por *overdose* de óleo de cravo, sacrificando-o sem seguida.
2. Fragmentos do rim anterior foram colocados em 10 ml de meio de cultura RPMI e dissociados com pinças de ponta fina e uma seringa, desprovida de agulha.
3. Transferir a suspensão celular obtida para um tubo de centrífuga, utilizando-se uma pipeta Pasteur, adicionando-se 1-2 gotas de solução de colchicina 0,025%, misturando-as bem com o material.
4. Incubar à temperatura ambiente por 30 minutos e uma centrifugação do material durante 10 minutos, a 900 rpm.
5. Descartar o sobrenadante e adicionar 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), re-suspendendo bem o material transferido-o para estufa a 37°C, por mais 28 minutos.
6. Retirar a suspensão celular da estufa, e adicionar 5-10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Ressuspender levemente com pipeta de Pasteur. Levar a centrífuga (900rpm) por 10 minutos.
7. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 7-10 ml de fixador. Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm.
8. Repetir o passo 7 por mais duas vezes.
9. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1-2 mL de fixador, ressuspender o material.
10. Acondicionar o material em tubos plásticos tipo Ependorff e guardá-los no refrigerador.

3.3. Preparo de lâminas

1. Pingar de 1 a 3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, deixando-a secar ao ar.
2. Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$), pH= 6,8 por 7 minutos, ou tratar a lâmina segundo as técnicas de banda-C, impregnação por prata e fluorocromos ou fish.

3.4. Determinação das AgRONs (Howell & Black, 1980)

1. Colocar sobre uma lâmina previamente preparada 2-3 gotas de solução aquosa de gelatina (1g de gelatina incolor + 50 mL de H_2O + 0,5 ml de ácido fórmico).
2. Adicionar sobre cada gota de gelatina, 2 gotas de AgNO_3 50% e 1 gota de água destilada.
3. Cobrir com lamínula e colocar em estufa a 60°C durante 3-6 minutos.
4. Deixar a lamínula escorrer debaixo de água corrente.
5. Secar a lâmina, corar com Giemsa e observar ao microscópio.

3.5. Determinação da heterocromatina (Sumner, 1972)

1. Incubar a lâmina em solução de HCl 0,2N a 42°C por aproximadamente 15 minutos.
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar.
3. Passar por uma solução aquosa de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 5% a 42°C durante 1 minuto e meio.
4. Mergulhar a lâmina três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar.
5. Incubar a lâmina em solução salina 2xSSC (pH=6.8) a 60°C por aproximadamente 30 minutos.
6. Lavar a lâmina em água corrente, deixar secar ao ar.

7. Corar com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$) pH 6.8 por aproximadamente 7 minutos.
8. Alternativamente, as lâminas podem ser coradas com iodeto de propídio, em uma proporção de 0,7 μL de iodeto de propídio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para 20 μL de *antifading*.

3.6. Dupla coloração pelos Fluorocromos Cromomicina A₃/DAPI (Schweizer, 1980)

1. Colocar cerca de 80 μL de solução de cromomicina sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora.
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina e tampão McIlvaine; lavar e secar levemente.
3. Colocar cerca de 80 μL de solução DAPI 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 15 minutos.
4. Lavar a lâmina em tampão McIlvaine, secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de montagem glicerol/McIlvaine; esperar 3 dias para analisar.

OBS: Opcionalmente, a lâmina poderá ser montada com DAPI/*Antifading*. Neste caso, no passo 3, deverá ser utilizado 80 μL de solução DAPI/*Antifading* (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e retirado o excesso em papel filtro; a análise poderá ser feita após 15 minutos.

3.7. Estudos cariotípicos

As preparações (Giemsa, banda-C e Ag-RONs) foram analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, em aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases e as preparações com fluorocromos foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX60 com câmera digital DP71.

As metáfases tiveram os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan *et al.* (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB):

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st)

RB > 7,00, acrocêntrico (a).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CAPÍTULO 1

Primeiros estudos citogenéticos no gênero *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): diferenciação cariotípica e revisão dos dados citogenéticos na família Heptapteridae

RESUMO

O peixe neotropical *Heptapterus mustelinus* coletado no riacho Pindorama, bacia do Alto rio Paraná (Brasil) foi estudado citogeneticamente, tendo sido verificado 54 cromossomos ($26m+18sm+4st+6a$), número diplóide não relatado entre os Heptapteridae até o momento estudados. Diferentemente da maioria das espécies da família, foram observadas Ag-RONs múltiplas e heterocromatina presente na região centromérica da maioria dos cromossomos do complemento, sendo estas heterocromatinas $CMA_3^+/DAPI^-$ em nove pares cromossômicos, além daquela coincidente com as Ag-RONs. Os dados apresentados neste trabalho revelam um caminho diferente na evolução cariotípica de *Heptapterus mustelinus* em relação aos demais gêneros de Heptapteridae, e que estudos citogenéticos nas demais espécies do gênero devem ser realizados para um melhor entendimento da sistemática e evolução e dos mecanismos cromossômicos envolvidos no processo de especiação desta família.

Palavras-chave: bandamento cromossômico, rearranjos cromossômicos, fluorocromos.

INTRODUÇÃO

O sistema do Alto rio Paraná representa o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul com 3,2 milhões de km², incluindo toda drenagem do rio Paraná à montante da Usina Hidroelétrica de Itaipu (Graça & Pavanelli, 2007; Sallun *et al.*, 2007). Associado a este sistema há um grande número de riachos e cabeceiras, ambientes que são habitados principalmente por espécies de peixes de pequeno porte, geralmente com menos de 15 cm de comprimento padrão, com distribuições geográficas restritas e pouco ou nenhum valor comercial (Agostinho & Júlio Junior, 1999; Castro, 1999).

A região do Alto rio Paraná é uma das áreas com maior número de estudos ictiofaunísticos realizados, e ainda assim faltam muitos estudos tendo em vista a diversidade presente (Súarez & Lima-Junior, 2009). Levantamentos sobre a diversidade de peixes vêm sendo bastante realizados nesta bacia (Castro *et al.*, 2003, 2005; Langeani *et al.*, 2007, Gubiani *et al.*, 2010), verificando 310 espécies de peixes, sendo que das 52 espécies novas potenciais, 36 são de riachos, mostrando a relevância destes ambientes (Langeani *et al.*, 2007).

A avaliação da diversidade cariotípica torna-se interessante nestes ambientes, principalmente pelo fato da variedade dos riachos tropicais, associada por vários autores a um aumento na heterogeneidade de habitats, o qual, por sua vez, é relacionado principalmente a um aumento na vazão e na disponibilidade de abrigos (Caramaschi, 1986; Garutti, 1988; Uieda, 1995). A citogenética de peixes é uma importante ferramenta para a caracterização das espécies, em estudos citotaxonômicos, além de sugerir tendências evolutivas dentro dos diversos grupos (Bertollo *et al.*, 1978; Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Vissotto *et al.*, 1999a; Vicari *et al.*, 2008).

A ordem Siluriformes é uma das mais representativas, e juntamente com Characiformes, compreende aproximadamente 80% das espécies de peixes Neotropicais (Agostinho *et al.*, 2007; Langeani *et al.*, 2007), apresentando na bacia do Alto rio Paraná esta mesma representatividade (Castro *et al.*, 2003, 2005; Graça & Pavanelli, 2007; Aquino *et al.*, 2009). Esta ordem é constituída por 36 famílias, 478 gêneros e aproximadamente 3.088 espécies, conhecidas como bagres, cascudos e mandis (Ferraris Junior, 2007).

Heptapteridae com 26 gêneros é endêmica da região Neotropical (Bockmann & Guazzelli, 2003), possuindo 203 espécies (Froese & Pauly, 2010). Os heptapterideos são peixes de pequeno porte, atingindo cerca de 20 cm, com hábitos alimentares variados, sendo onívoros ou carnívoros. Não possui cuidado parental, além de serem solitários ou formarem

pequenos grupos em pequenos corpos d'água ou escondidos na vegetação. Como muitos outros Siluriformes, são adaptados a vida bentônica, e geralmente vivem em riachos de segunda a quinta ordem. A presença e grande abundância de heptapterídeos é notável em riachos com densa cobertura vegetal e com água de boa qualidade, de modo que atuam como eficientes indicadores da saúde do ambiente (Bockmann & Guazzelli, 2003).

Anteriormente considerada uma subfamília dentro de Pimelodidae (Heptapterinae, Pimelodinae e Pseudopimelodinae) por Pinna (1998), Heptapteridae foi elevada a categoria de família (Bockmann & Guazzelli, 2003; Ferraris Junior, 2007). De acordo com Froese & Pauly (2010), o gênero *Heptapterus* Bleeker, 1858 possui 9 espécies válidas. Dentre estas espécies, *Heptapterus mustelinus* (Valenciennes, 1835), conhecida popularmente no Brasil como bagre-de-pedra, não possui dimorfismo sexual e atinge cerca de 20 cm de comprimento. Com distribuição pela América do Sul, *H. mustelinus* tem sido observada em riachos da bacia do Alto rio Paraná (Langeani *et al.*, 2007) e neste mesmo sistema, na micro-bacia do rio São Francisco Verdadeiro (Gubiani *et al.*, 2010).

Apesar de vários estudos citogenéticos terem sido realizados em Heptapteridae, em apenas 5 dos 26 gêneros da família existem dados disponíveis, sendo a maior parte no gênero *Rhamdia* Bleeker, 1858 (Tabela 1). Os primeiros dados citogenéticos revelados nesta família foi através de estudos de Toledo & Ferrari (1976) em *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), (citada como *Rhamdia hilarii*) e *Pimelodella* sp. da bacia do Alto rio Paraná. O número diplóide em Heptapteridae varia de 42 cromossomos em *Imparfinis hollandi* Haseman, 1911 (Margarido & Moreira-Filho, 2008) a 58 cromossomos, como em *Pimelodella kronei* (Miranda Ribeiro, 1907) (Almeida-Toledo *et al.*, 1992), *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart & Gomes, 1959 (Vissotto *et al.*, 1999a), entre outras, havendo o predomínio deste número diplóide.

Estudos citogenéticos em *Heptapterus* são inexistentes, visto que *Heptapterus longicauda* caracterizada por Vissotto *et al.* (1999a) atualmente é classificada como *Imparfinis borodini* Mees & Cala, 1989 (Bockmann & Guazzelli, 2003). O presente estudo busca realizar a primeira caracterização citogenética no gênero *Heptapterus*, e diante da escassez de dados citogenéticos na maior parte dos gêneros em Heptapteridae, auxiliar no entendimento da diversidade cariotípica do grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises citogenéticas foram realizados em *H. mustelinus* (4 machos e 4 fêmeas), coletados no riacho Pindorama, afluente do rio São Francisco Verdadeiro, na bacia do Alto rio Paraná (Paraná, Brasil). Os peixes foram sacrificados por *overdose* de óleo de cravo como descrito por Griffiths (2000) e os espécimens depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura - NUPÉLIA (NUP 11429) da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil). A obtenção de cromossomos mitóticos foi a partir de células da porção anterior do rim, segundo Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram caracterizadas pela impregnação com nitrato de prata (Howell & Black, 1980). Para a detecção de heterocromatina (bandas-C) foi utilizada a técnica convencional de hidróxido de bário (Sumner, 1972), com modificações na coloração feita com iodeto de propidium (Lui *et al.*, 2009), sob prévia análise de lâminas com coloração convencional por Giemsa (análise sequencial). A caracterização da composição da heterocromatina foi realizada através da dupla coloração, com emprego dos fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Schweizer, 1980). A morfologia dos cromossomos foi determinada baseada na razão de braços proposto por Levan *et al.* (1964). O número fundamental foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos (*m*), submetacêntricos (*sm*) e subtelocêntricos (*st*) contendo dois braços, e os cromossomos acrocêntricos (*a*) contendo apenas um braço. As metáfases foram capturadas com câmera digital DP71 acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX60 utilizando-se programa DP Controller versão 3.2.1.276.

RESULTADOS

O número diplóide encontrado para *H. mustelinus* foi de 54 cromossomos para ambos os sexos (26 metacêntricos, 18 submetacêntricos, 4 subtelocêntricos e 6 acrocêntricos; NF=102) (Fig. 1a). Foram observadas RONS múltiplas em posição terminal, sendo que em todos os indivíduos essas regiões foram evidenciadas no braço curto do par acrocêntrico 25, e esporadicamente no braço longo de um cromossomo do par metacêntrico 1, no braço curto de um cromossomo do par metacêntrico 2 e no braço longo dos cromossomos do par submetacêntrico 18 (Fig. 1a). O bandamento C evidenciou heterocromatina presente na região centromérica da maioria dos cromossomos do complemento (Fig. 1b) e associada às RONS. A

dupla coloração pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI mostrou que as heterocromatinas centroméricas dos pares 1, 3, 4, 6, 10, 14, 17, 23 e 27 são GC-ricas, assim como os pares portadores das RONS. Tanto as regiões heterocromáticas como as RONS foram DAPI negativas (Fig. 2 a, b).

DISCUSSÃO

Embora o número de cromossomos encontrado em *H. mustelinus* esteja dentro da variação observada em Heptapteridae (42 a 58), o número diplóide de 54 cromossomos encontrado neste estudo difere de todos os dados das espécies de Heptapteridae até agora analisadas. Contudo, este número diplóide tem sido encontrado nas espécies da família Pseudopimelodidae (Vissotto *et al.*, 1999a; Marques *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008), que assim como Heptapteridae, já foi considerada uma subfamília em Pimelodidae (Pinna, 1998). Além disso, Lundberg *et al.* (1991) sugeriram uma relação de grupo irmão entre as famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae baseado na estrutura do lábio inferior. Martinez *et al.* (2008) trabalharam com três espécies de Pseudopimelodidae, e comparando com outros dados da literatura observaram que a presença de 54 cromossomos poderia ser uma importante característica para diferenciar as espécies desta família com as espécies de Heptapteridae e Pimelodidae, hipótese que não pode ser aplicada baseada neste estudo.

Um alto número fundamental e riqueza de cromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos observado está conforme o relatado para a maioria das espécies da família (Tabela 1), além de espécies que apresentaram cromossomos apenas deste dois tipos como *Imparfinis mirini* Haseman, 1911 (Vissotto *et al.*, 1997), *R. quelen* (Maistro *et al.*, 2002) e *Pimelodella boschmai* Van der Stigchel, 1964 (Garcia & Almeida-Toledo, 2010). De acordo com Oliveira e Gosztonyi (2000), um elevado número fundamental em Siluriformes corresponde a uma condição plesiomórfica. Outra característica observada em *H. mustelinus* compartilhada por quase todas as espécies em Heptapteridae é a simetria do cariótipo, não havendo a grande diferença de tamanho entre os pares cromossômicos observada no cariótipo assimétrico de *Imparfinis hollandi* (Margarido & Moreira-Filho, 2008).

A presença de RONS múltiplas não é comum dentro deste grupo, sendo observada em *Imparfinis borodini* (Vissotto *et al.*, 1999a), em *Rhamdia*. sp e *R. quellen* (citada como *R. branneri*) (Abucarma & Martins-Santos, 2001) e no presente estudo. Uma característica predominante neste grupo é a presença de RONS simples, na região terminal dos braços curtos

de cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos, sendo mais raros em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, ou intersticial (Tab. 1).

Souza *et al.* (1996) afirmaram que o padrão de distribuição de heterocromatina é uma valiosa ferramenta para diferenciar algumas espécies, e pode ajudar no entendimento dos mecanismos ocorridos durante o processo evolutivo dos diferentes grupos de peixes. De fato, estudos têm sido realizados em muitas espécies pertencentes a diversos grupos dentro da ictiofauna, usando a heterocromatina como um meio importante para caracterização dentro da citogenética (Oliveira & Wright, 1998; Souza *et al.*, 1996; Artoni & Bertolo, 1999; Maistro *et al.*, 2000; Margarido & Galetti Junior, 2000). Em *H. mustelinus* foi verificado uma quantidade significativa de heterocromatina, diferente de outros Heptapteridae onde se observou pequena quantidade (Vissotto *et al.*, 2001; Maistro *et al.*, 2002; Stivari & Martins-Santos, 2004). Em peixes e anfíbios o uso de fluorocromos pode fornecer uma importante informação sobre os tipos de heterocromatina (Souza *et al.*, 1996; Margarido & Galetti Junior, 2000). A presença de heterocromatinas centroméricas GC-ricas não associadas às RONS observadas em *H. mustelinus* é uma característica incomum entre os Heptapteridae. Por outro lado, a ocorrência de Ag-RONS/CMA₃⁺ é muito comum em cariótipos de peixes, evidenciada em várias espécies desta família (Maistro *et al.*, 2002; Swarça *et al.*, 2003a; Vidotto *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2010; Tsuda *et al.*, 2010).

Alguns estudos em Heptapteridae apontaram mecanismos diferentes para a diferenciação cariotípica. Margarido & Moreira-Filho (2008) atribuíram a eventos de fusões em *tandem* a redução do número diplóide para 42 cromossomos em *I. hollandi*, que originaram quatro grandes pares de cromossomos assimétricos. Em *Rhamdia* spp., o alto grau de variabilidade na macroestrutura cromossômica observado e sem mudança no número diplóide foi atribuído por Garcia *et al.* (2010) a rearranjos não-Robertsonianos, principalmente inversões. Assim como Vissotto *et al.* (2001) em *Imparfinis* cf. *piperatus* Engenmann & Norris, 1900, que avaliaram que as diferenças na fórmula cariotípica e no número fundamental observados em algumas espécies ou populações de *Imparfinis* Engenmann & Norris, 1900 são devido a pequenos rearranjos cromossômicos fixados durante o processo evolutivo.

Alguns autores afirmaram que a maioria dos rearranjos cromossômicos, incluindo translocações, deleções, inversões ocorrem em regiões heterocromáticas (Kuzin *et al.*, 2002; Badaeva *et al.*, 2007). O padrão de distribuição da heterocromatina em *H. mustelinus* em comparação aos dados disponíveis na literatura corroboram a proposta apresentada por Oliveira *et al.* (1993) a respeito do papel da heterocromatina em relação aos eventos

responsáveis pela diversidade cromossômica do grupo, como facilitadora de rearranjos. Considerando esta hipótese, o número diplóide de 54 cromossomos, poderia ter surgido através de translocações Robertsonianas, sugerindo que espécies com número menor que 58 cromossomos seriam derivadas, visto que 58 cromossomos é condição basal em Heptapteridae (Fenocchio *et al.*, 2003a).

Os dados observados no presente trabalho, como cariótipo composto por 54 cromossomos, ocorrência de RONS múltiplas, heterocromatina presente no centrômero da maioria dos cromossomos, sendo algumas GC ricas, revelam um caminho diferente na evolução cariotípica de *Heptapterus mustelinus* em relação aos demais gêneros de Heptapteridae. Mais estudos citogenéticos devem ser realizados nas espécies de *Heptapterus*, e nos demais gêneros em Heptapteridae, para confirmar esta proposta, bem como para um melhor entendimento dos mecanismos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo desta família.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Unioeste, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e ao Grupo de Pesquisas em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos-GETECH pelo suporte financeiro e apoio logístico na captura dos peixes, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – SISBIO, número da licença: 10522-3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abucarma, M. & Martins-Santos, I. C. (2001). Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguaçu Basin. *Cytologia* **66**, 299-306.
- Agostinho, A. A. & Júlio Junior, H. F. (1999). Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In *Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais* (Lowe-McConnell, R. H. ed.), pp. 374-399. São Paulo: EDUSP.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C. & Pelicice, F. M. (2007). *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá: Eduem. 501p.
- Almeida-Toledo, L. F., Foresti F., Trajano, E. & Toledo-Filho, A. S. (1992). Cytogenetic analysis of the blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitória*. *Caryologia* **45**, 255-262.
- Aquino, P. P. U., Schneider, M., Silva, M. J. M., Fonseca, C. P., Arakawa, H. B. & Cavalcanti, D. R. (2009). Ictiofauna dos córregos do Parque Nacional de Brasília, bacia do Alto Rio Paraná, Distrito Federal, Brasil Central. *Biota Neotropica* **9**, 217-230.
- Artori, R. F. & Bertollo, L. A. C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* **106**, 209-214.
- Badaeva, E. D., Dedkova, O. S., Gay, G., Pukhalskyi, V. A. & Zelenin, A. V. (2007). Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome* **50**, 907-926.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* **1**, 103-120.
- Bockmann, F. A. & Guazzeli, G. M. (2003). Family Heptapteridae (Heptapterids). In *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Reis, R. E., Kullander S. O. & Ferraris Junior, C. J. ed.), pp. 406-431. Porto Alegre: Edipucrs.
- Caramaschi, E. P. (1986). Distribuição da ictiofauna de riachos das Bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo.
- Castro, R. M. C. (1999). Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In *Ecologia de Peixes de Riachos: Estado Atual e Perspectivas* (Caramaschi, E.P., Mazzoni, R., Bizerril, C.R.S.F., & Peres-Neto, P.R. ed.), *Oecologia Brasiliensis* **6**, 139-155.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Ferreira, K. M., Ribeiro, A. C., Benine, R. C., Dardis, G. Z. P., Melo, A. L. A., Stopiglia, R., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Carvalho, M., Gibran, F. Z. & Lima, F. C. T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. *Biota Neotropica* **3**, 1-31.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F.; Vari, R. P., Melo, A. L. A.; Martins, L. S. F.; Abreu, T. X., Benine R. C., Gibran, F. Z., Ribeiro, A. C., Bockmann, F. A., Carvalho, M.,

- Pelição, G. Z., Ferreira, K. M., Stopiglia, R. & Akama, A. (2005). Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **16**, 193-288.
- Dias, A. L. & Foresti, F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Brazilian Journal of Genetics* **16**, 585-600.
- Fenocchio, A. S. & Bertollo, L. A. C. (1990). Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* **81**, 193-198.
- Fenocchio, A. S., Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Camacho, J. P. (2000). Considerations on B-Chromosome origin and distribution in fish populations of the genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* **48**, 105-109.
- Fenocchio, A. S., Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S., Dias, A. L. & Swarça, A. C. (2003a). Cytogenetic Studies and Correlated Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* **68**, 363-368.
- Fenocchio A. S., Swarça A. C., Cestari M. M. & Dias A. L. (2003b). Karyotypic characterization and NOR analysis by different banding techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguaçu river (Brazil). *Folia Biologica* **51**, 3-4.
- Ferraris Junior, C. J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* **1418**, 1-628.
- Fonseca Y. M., Oliveira, C., Foresti, F. & Maistro, E. L. (2003). First cytogenetic description of the species *Rhamdela microcephala* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* **68**, 31-34.
- Foresti, F., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* **49**, 810-813.
- Frøese, R. & Pauly, D. Editors. (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <http://www.fishbase.org/search.php> (último acesso 20 outubro 2010).
- Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. & Centofante L. (2003). B Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* **68**, 403-411.
- Garcia, C., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* **9**, 365-384.
- Garcia, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2010). Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* **63**, 32-40.

- Garutti, V. (1988). Distribuição longitudinal da ictiofauna de um córrego da região noroeste do Estado de São Paulo, Bacia do Rio Paraná. *Revista Brasileira de Biologia* **48**, 747-759.
- Graça, W. J., & C. S. Pavanelli. (2007). *Peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM. 241 p.
- Griffiths, S. P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* **57**, 1453-1464.
- Gubiani, E. A., Daga, V. S., Frana, V. A. & Graça, W. J. (2010). Fish, Toledo urban streams, São Francisco Verdadeiro River drainage, upper Paraná River basin, state of Paraná, Brazil. *Check List* **6**, 45-48.
- Hochberg, V. B. M. & Erdtmann, B. (1988). Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) - the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Brazilian Journal of Genetics* **11**, 563-576.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**, 1014-1915.
- Kantek, D. L. Z., Peres, W. A. M., Buckup, P. A. & Moreira-Filho, O. (2009). Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainage, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *Zoologia* **26**, 733-738.
- Kuzin, F. E., Shilova, I. E., Lezzi, M. & Gruzdev, A. D. (2002). DNA in the centromeric heterochromatin of polytene chromosomes is topologically open. *Chromosome Research* **10**, 201-208.
- Langeani, F., Castro, R. M. C., Oyakawa, O. T., Shibatta, O. A., Pavanelli, C. S. & Casatti, L. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* **7**.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**, 201-220.
- Lui, R. L., Blanco, D. R., Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Mícron* **40**, 552-559.
- Lundberg, J. G., Mago-Leccio, F. & Nass, P. (1991). *Exallondontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the deep river channels of South America, and delimitation of the subfamily Pimelodidae. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **104**, 840-869.
- Maistro, E. L., Foresti, F., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2000). Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **23**, 365-369.
- Maistro, L. M.; Oliveira, C. & Foresti, F. (2002). Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, Silver Nitrate and CMA3 staining and Restriction Endonucleases Banding. *Cytologia* **67**, 25-31.

- Margarido, V. P. & Galetti Junior, P. M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology* **23**, 569-573.
- Margarido, V. P. & Moreira-Filho. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 235-238.
- Marques, M. B. A., Moreira-Filho, O., Garcia, C. & Margarido, V. P. (2008). Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco River basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 215-221.
- Martinez, E. R. M., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F. & Oliveira, C. (2008). Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 692-696.
- Moraes, V. P., Cereali, S. S., Froehlich, O. & Dias, A. L. (2007). Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research* **6**, 627-633.
- Moraes, V. P. O., Souza Carneiro, J. & Dias, A. L. (2009). B Chromosomes in Four Different Populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): A Comparative Study of Frequency and Distribution. *Folia Biologica* **57**, 3-4.
- Moreira-filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a "species complex". *Brazilian Journal of Genetics* **14**, 331-357.
- Nelson, G. J. (2006). *Fishes of the world*. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 601p.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F., Mori, L. & Toledo-Filho, S. A. (1993). Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia* **46**, 171-188.
- Oliveira, C. & Wright, J. (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research* **6**, 205-211.
- Oliveira C. & Gosztonyi A. E. (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. *Caryologia* **53**, 1-37.
- Pinna, M. C. (1998). Phylogenetic relationships of neotropical siluriforms (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Vari, R. E., Lucena, Z. M. & Lucena, C.A. ed.), pp. 279 - 330. Porto Alegre: Edipucrs.
- Sallun, A. E. M., Suguio, K. & Stevaux, J. C. (2007). Proposição formal do Alogrupo Alto Rio Paraná (SP, PR e MS). *Geologia USP: Série Científica* **7**, 49-70.

- Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**, 190-193.
- Souza, I. L., Moreira-Filho, O. & Galetti Junior, P. M. (1996). Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazilian Journal of Genetics* **19**, 405-410.
- Stivari, M. K. & Martins-Santos, I. C., (2004). Karyotype Diversity in two Populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* **69**, 25-34.
- Stolf, R., Swarça, A. C., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2004). Analyses of karyotype and nucleolar organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. *Caryologia* **57**, 348-352.
- Súares, Y. R. & Lima-Junior, S. E. (2009). Variação espacial e temporal nas assembléias de peixes de riachos na bacia do rio Guiraí, Alto Rio Paraná. *Biota Neotropica* **9**, 101-111.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**, 304-306.
- Swarça A. C., Vidotto A. P. & Dias A. L. (2003a). Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia* **56**, 421-425.
- Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M. & Dias, A. L. (2003b). Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* **119**, 87-92.
- Toledo, V. & Ferrari, I. (1976). Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica* **4**, 120-123.
- Tsuda, J. R., Moraes, V. P. O., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2010). Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* **9**, 1929-1935.
- Uieda, V. S. (1995). Comunidade de peixes de um riacho litorâneo: composição, habitat e hábitos. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas. Campinas, SP.
- Valcarcel, A., Brunner, P. & Maggese, M. C. (1993). B-Chromosome polymorphism in South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture* **110**, 111-118.
- Vasconcelos, C., & Martins-Santos I. C. (2000). Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* **132**, 103-109.
- Vicari, M. R., Noleto, R. B., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (2008). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 173-179.

Vidotto, A. P., Swarça, A. C., Fenocchio, A. S. & Dias A. L. (2004). Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity* **95**, 517-520.

Vissotto, P. C.; Foresti, F. & Oliveira C. (1997). A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia* **62**, 61-66.

Vissotto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999a). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* **3**, 1-7.

Vissotto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999b). Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* **3**, 9-13.

Vissotto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C., 2001. Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Science* **5**, 97-103.

Tabela I. Revisão dos dados citogenéticos em Heptapteridae.

Species	Locality (Hydrographic Basin)	2n	Chromosome formulae	NORs	Ref.
<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	Capivara and Pardo rivers-SP (UP)	58	28m+24sm+6st	single, sm-interstitial	1
<i>C. iheringi</i>	São Francisco river-MG (SF)	58	22m+16sm+10st+10a	single, st-interstitial	2
<i>C. iheringi</i>	Marrecas river-SP (UP)	58	22m+16sm+10st+10a	single, st-interstitial	2
<i>Cetopsorhamdia</i> sp.	Canta Galo stream - SP (UP)	58	22m+16sm+10st+10a	single, m-interstitial	2
<i>Heptapterus mustelinus</i>	Pindorama stream - PR (UP)	54	26m+18sm+4st+6a	multiple, m-sm-a-terminal	3
<i>Imparfinis borodini</i> *	Quinta stream-SP (UP)	52	22m+26sm+4st	multiple, m-st-terminal	1
<i>I. mirini</i>	Jacutingá and Quinta streams-SP (UP)	58	24m+34sm	—	4
<i>I. piperatus</i>	Araras river-SP (UP)	58	32m+26sm	single, m-interstitial	5
<i>I. piperatus</i>	Grande river-SP (UP)	58	26m+22sm+8st+2a	single, m-interstitial	5
<i>I. cf. piperatus</i>	Juquiá river-SP (UP)	56	22m+26sm+4st+4a	single, a-interstitial	5
<i>I. cf. piperatus</i>	Juquiá river-SP (UP)	56	24m+12sm+20st	single, st-interstitial	2
<i>I. aff. schubarti</i>	Canta Galo stream - SP (UP)	58	22m+16sm+10st+10a	single, m-terminal	2
<i>I. aff. schubarti</i>	Tibagi river-PR (UP)	58	28m+28sm+2st	single, m-interstitial	6
<i>I. schubarti</i>	Piumhi-MG (SF)	58	18m+34sm+6st	single, sm-interstitial	7
<i>I. hollandi</i>	Iguaçu river-PR (UP)	42	22m+10sm+10st	single, st-terminal	8
<i>Pimelodella</i> sp.	Mogi-Guaçu and Pardo rivers-SP (UP)	46	28m+10sm+8a	—	9
<i>Pimelodella</i> sp.	Mogi-Guaçu river-SP (UP)	46	40m/sm+6st/a	single, m-sm-terminal	10
<i>Pimelodella</i> sp.	Pardo-Cardoso river-SP (UP)	46	34m+12sm	single, sm-terminal	11
<i>Pimelodella</i> sp1	Paraná river-PR (UP)	46	20m+20sm+6st	single, sm-terminal	12
<i>Pimelodella</i> sp2	Paraná river-PR (UP)	52	22m+22sm+8st	single, sm-terminal	12
<i>P. kronei</i>	Iporanga-SP (UP)	58	54m/sm+4st	—	13
<i>P. transitoria</i>	Iporanga-SP (UP)	58	54m/sm+4st	—	13
<i>P. avanhandavae</i>	Araquá and Capivara rivers-SP (UP)	46	20m+20sm+6st	single, sm-terminal	1
<i>P. aff. avanhandavae</i>	Tibagi river-PR (UP)	52	30m+22sm	single, sm-terminal	14
<i>P. meeki</i>	Tibagi and Couro do Boi rivers-PR (UP)	46	30m+12sm+4st	single, sm-terminal	15
<i>P. meeki</i>	Gabriel da Cunha river-PR (UP)	46	30m+12sm+4st	single, sm-terminal	15
<i>P. meeki</i>	Paranapanema river-SP (UP)	46	28m+12sm+6st	single, sm-terminal	11

<i>P. meeki</i>	Paranapanema river-SP (UP)	46	28m+12sm+6st	single, sm-terminal	11
<i>P. boschmai</i>	Mogi-Guaçu river-SP (UP)	46	38m+8sm	single, sm-terminal	11
<i>P. lateristriga</i>	Angra-RJ (PS)	58	36m+22sm	single, sm-terminal	11
<i>P. gracilis</i>	Mariápolis-SP (UP)	46	34m+12sm	single, sm-terminal	11
<i>Rhamdela microcephala</i>	Machado river-MG (SF)	56	18m+30sm+8st	single, sm-interstitial	16
<i>Rhamdia quelen</i> *	Onça river-SP (UP)	62	—	—	9
<i>R. quelen</i> *	Monjolinho dam-SP (UP)	58	—	single, st-terminal	17
<i>R. quelen</i> *	Lobo dam- SP (UP)	58	—	single, st-terminal	18
<i>R. quelen</i> *	29 dam- SP (UP)	58	—	singler, st-terminal	18
<i>R. quelen</i> *	Mogi-Guaçu river-SP (UP)	58	—	single, st-terminal	18
<i>R. quelen</i> *	São Francisco river-MG (SF)	58	—	single, st-terminal	18
<i>R. quelen</i> *	Mogi-Guaçu river-SP (UP)	58	58m/sm	single, st-terminal	19
<i>R. quelen</i> *	Aguapey river- Corrientes - ARG (PA)	58	26m+16sm+8st+8a	single, a-terminal	20
<i>R. quelen</i> *	Hortelã, Quinta, Araquá and Jacutingá streams, Pardo river, Jurumirim dam- SP (UP)	58	30m+18sm+10st	single, sm-terminal	21
<i>R. quelen</i> *	Buenos Aires- Argentina (PA)	58	44m/sm+14st/a	—	22
<i>R. quelen</i> *	Iguaçu river, Usina de Salto Segredo-PR (IG)	58	36m+14sm+4st+4a	multiple, a-st-terminal	23
<i>R. quelen</i> *	Iguaçu river, Usina de Salto Segredo-PR (IG)	58	36m+14sm+4st+4a	single, a-terminal	23
<i>R. quelen</i>	Guaíba river e Quadros lagoon-RS (IG)	58	52m/sm/st+6a	single, a-terminal	24
<i>R. quelen</i>	Iguaçu river, Porto União-SC (IG)	58	—	single, st-terminal	18
<i>R. quelen</i>	Iguaçu river-PR (IG)	56	—	single terminal	25
<i>R. quelen</i>	Iguaçu river-PR (IG)	58	32m+16sm+6st+4a	single, st-terminal	20
<i>R. quelen</i>	Paraná river, Posadas- ARG (UP)	58	26m+16sm+8st+8a	single, a-terminal	2
<i>R. quelen</i>	Taquarussu river-SP (UP)	58	26m+20sm+6st+6a	single, st-terminal	26
<i>R. quelen</i>	Maringa stream-PR (UP)	58	26m+22sm+6st+4a	single, sm-terminal	26
			26m+24sm+8st	single, sm-terminal	26
<i>R. quelen</i>	Porto Murtinho-MS (PA)	58	36m+16sm+6st	single, sm-terminal	27
<i>R. quelen</i>	Água dos Patos river-Iepê-SP (UP)	58	36m+16sm+6st	—	28
<i>R. quelen</i>	Água das Pedras river-Londrina-PR (UP)	58	36m+16sm+6st	—	28

<i>R. quelen</i>	Taquari river-Jataizinho-PR (UP)	58	36m+16sm+6st	—	28
<i>R. quelen</i>	FUNPIVI-Timbó-SC	58	36m+16sm+6st	—	28
<i>R. quelen</i>	Lindóia stream/Tibagi river-PR (UP)	58	30m+16sm+10st+2a	single, <i>sm</i> -terminal	29
<i>R. quelen</i>	Lindóia stream/Tibagi river-PR (UP)	3n=87	45m+21sm+15st+6a	multiple, <i>sm</i> -terminal	29
<i>R. quelen</i>	Oeste river-PR (LP)	58	36m+10sm+12st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Sangão river-PR (LP)	58	32m+8sm+12st+6a	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Angra dos Reis-RJ (PS)	58	40m+10sm+8st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	São José river-RJ (PS)	58	36m+14sm+8st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Paraíba do Sul river-RJ (PS)	58	36m+14sm+8st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Araras river-SP (UP)	58	40m+10sm+8st	single, <i>sm</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Capivara river- Botucatu-SP (UP)	58	44m+12sm+2st	single, <i>sm</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Colina-SP (UP)	58	36m+10sm+12st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Guapiara-SP (UP)	58	36m+10sm+12st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Iguape-SP (RI)	58	36m+10sm+12st	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Passa Cinco river- Ipeúna-SP (UP)	58	34m+16sm+8st	single, <i>sm</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Fortuna stream - Mariápolis-SP (UP)	58	40m+10sm+8st	single, <i>sm</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Piquete-SP (PS)	58	40m+10sm+8st	single, <i>sm</i> -terminal	30
<i>R. quelen</i>	Santo Antônio do Pinhal-SP (PS)	58	30m+14sm+12st+2a	single, <i>st</i> -terminal	30
<i>Rhamdia</i> sp.	Iguaçu river, Usina de Salto Segredo-PR (UP)	58	36m+14sm+4st+4a	multiple, <i>a-st</i> -terminal	23
<i>Rhamdia</i> sp.	Grande stream-SP (PS)	58	46m/sm+12st	—	31
<i>Rhamdia</i> sp.	Grande stream-SP (PS)	3n=87	69m/sm+18st	—	31

2n, diploid chromosome number; Ref., references; UP, Upper Paraná river basin; SF, São Francisco river basin; PS, Paraíba do Sul river basin; PA, Paraguay river basin; IG, Iguaçu river basin; LP, Lower Paraná river basin; RI, Ribeira do Iguape river basin; *m*, metacentric; *sm*, submetacentric; *st*, subtelocentric; *a*, acrocentric; FUNPIVI, Fundação de Piscicultura do Vale do Itajaí; 1, Vissotto *et al.* (1999a); 2, Fenocchio *et al.* (2003a); 3, Present study; 4, Vissotto *et al.* (1997); 5, Vissotto *et al.* (2001); 6, Stolf *et al.* (2004); 7, Kantek *et al.* (2009); 8, Margarido & Moreira-Filho (2008); 9, Toledo & Ferrari (1976); 10, Dias & Foresti (1993); 11, Garcia & Almeida-Toledo (2010); 12, Vasconcelos & Martins-Santos (2000); 13, Almeida Toledo *et al.* (1992); 14, Swarça *et al.* (2003a); 15, Vidotto *et al.* (2004); 16, Fonseca *et al.* (2003); 17, Fenocchio & Bertollo (1990); 18, Fenocchio *et al.* (2000); 19, Maistro *et al.* (2002); 20, Fenocchio *et al.* (2003b); 21, Vissotto *et al.* (1999b); 22, Valcarcel *et al.* (1993); 23, Abucarma & Martins-Santos (2001); 24, Hochberg & Erdtmann (1988); 25, Swarça *et al.* (2003b); 26, Stivari & Martins-Santos (2004); 27, Moraes *et al.* (2007); 28, Moraes *et al.* (2009); 29, Tsuda *et al.* (2010); 30, Garcia *et al.* (2010); 31, Garcia *et al.* (2003); * Renamed species.

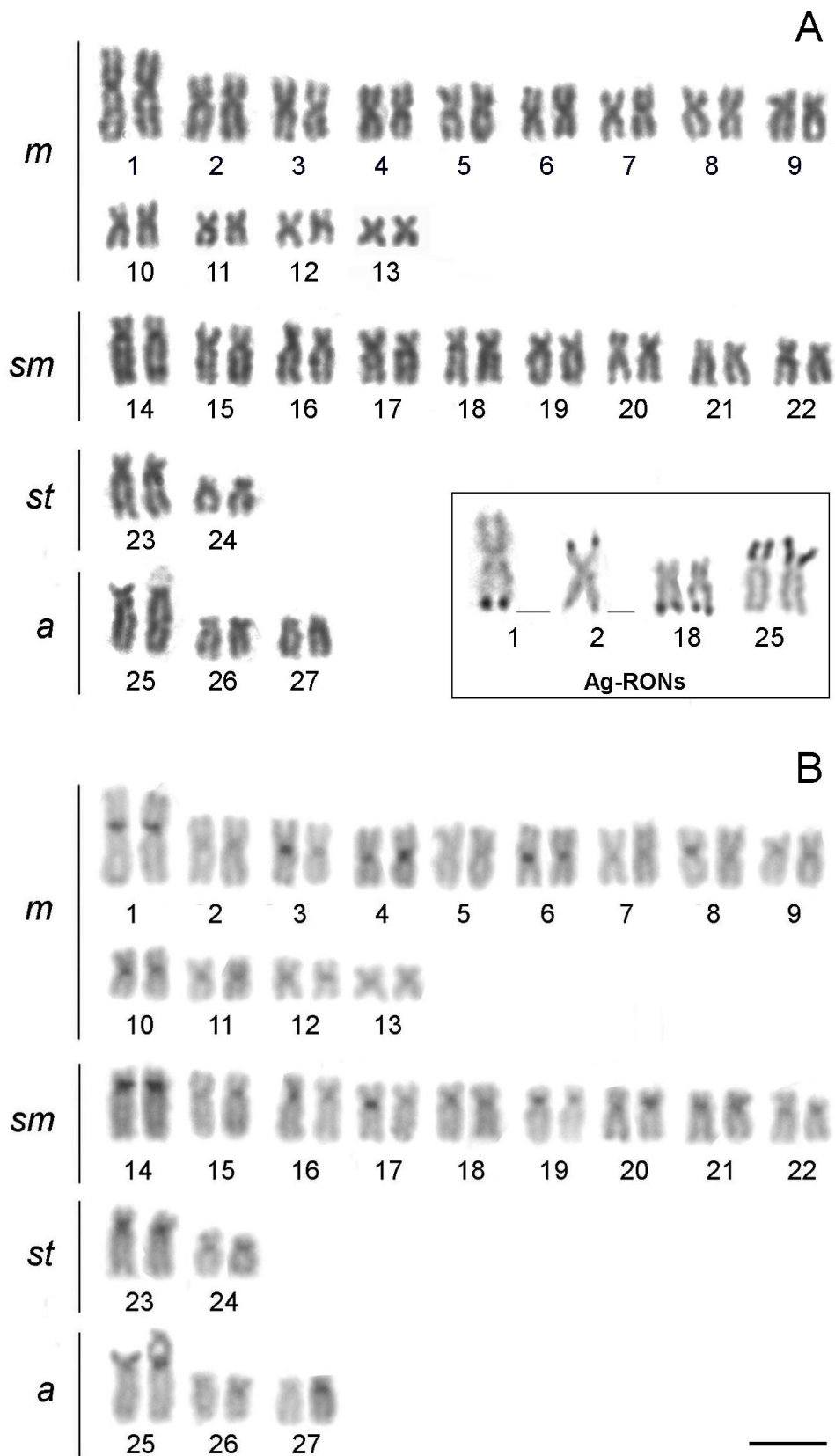


Figura 1. Cariótipos de *Heptapterus mustelinus* (a) corado por Giemsa e (b) C-bandado. Cromossomos portadores das Ag-RONs na caixa (a). Barra = 10 μ m.

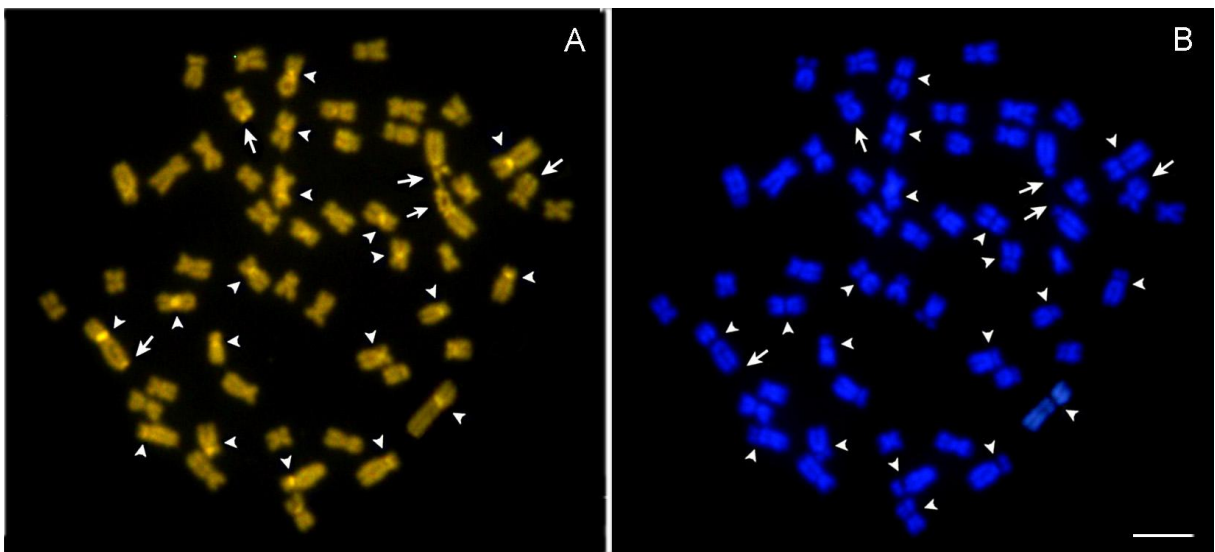


Figura 2. Metáfases coradas pelos fluorocromos (a) CMA₃ e (b) DAPI. As setas indicam as RONS e as cabeças de seta indicam as heterocromatinas GC-ricas. Barra = 10 μ m.

4.2. CAPÍTULO 2

Dispersão e diversificação de três espécies de *Astyanax* (Characiformes, *Incertae Sedis*) em dois riachos de cabeceiras do Alto rio Paraná, Brazil, verificada pela citogenética.

Populações de *Astyanax* aff. *paranae*, *Astyanax fasciatus* e *Astyanax altiparanae* coletadas nos riachos Pindorama e Lopei, bacia do Alto rio Paraná (Brasil), foram estudadas citogeneticamente, verificando-se a diferenciação cromossômica e a tendência evolutiva nas três espécies. Em *Astyanax* aff. *paranae* foi verificado 48 cromossomos nas duas populações com diferenças na fórmula cariotípica ($8m+20sm+10st+10a$ no riacho Pindorama e $8m+16sm+14st+10a$ no riacho Lopei). *Astyanax fasciatus* apresentou 50 cromossomos em ambos os riachos com diferentes fórmulas cariotípicas ($8m+18sm+10st+14a$ no riacho Pindorama e $8m+14sm+12st+16a$ no riacho Lopei). O número diplóide para *A. altiparanae* foi de 50 cromossomos sem diferenças interpopulacionais na fórmula cariotípica ($6m+30sm+4st+10a$). As três espécies estudadas apresentaram Ag-RONs múltiplas, com diferenças entre as populações de *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus*. Em relação à heterocromatina, diferenças interpopulacionais na distribuição foram verificadas. A ocorrência de Ag-RONs/CMA₃⁺ foi observada nas espécies, além de regiões AT ricas em *A. altiparanae*. Os dados do presente estudo demonstraram que *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus* apresentaram diferenças cariotípicas interpopulacionais mais conspícuas do que as populações de *A. altiparanae*, provavelmente por características que restringem *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus* a trechos superiores de riachos, com a fixação de rearranjos cromossômicos nas populações. Entretanto, a ausência de diferenças cariotípicas interpopulacionais em *A. altiparanae* sugerem fluxo entre as duas populações. No presente estudo ficou evidente o papel dos riachos como ambiente mantenedor de diversidade ictiofaunística portadora de diferentes pools genéticos.

Palavras-chave: diferenças cariotípicas, isolamento microgeográfico, ecologia.

INTRODUÇÃO

A bacia do rio Paraná está dividida em quatro grandes partes: curso superior, curso médio, curso inferior e delta (Stevaux, 2000). O curso superior corresponde ao sistema do Alto rio Paraná, que representa o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul. Ocupando uma área de 802.150 km² em território brasileiro, este sistema abrange redes hidrográficas que passam pelos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Paraná e abriga grandes tributários como os rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema (Stevaux *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2003). Um dos afluentes do rio Paraná, o rio São Francisco Verdadeiro nasce na cidade de Cascavel-PR, com uma área de 2.219,1 km² e possui associado a este sistema um grande número de riachos e cabeceiras (Gubiani *et al.*, 2010).

Os riachos, componentes comuns às bacias hidrográficas, são ecossistemas que geralmente apresentam grande diversidade de ambientes e espécies de pequeno porte (Castro, 1999; Oyakawa *et al.*, 2006), que podem ser bastante influenciados pelo padrão direto de conectividade aquático (Shurin *et al.*, 2009). Várias ferramentas, como a citogenética, têm explorado essas características, produzindo dados bastante consistentes sobre o papel do isolamento geográfico e a fixação de alguns caracteres entre as populações de peixes.

A ordem Characiformes é uma das mais representativas, com cerca de 1.700 espécies distribuídas em 270 gêneros e 18 famílias (Nelson, 2006), sendo que 475 espécies possuem dados citogenéticos (Oliveira *et al.*, 2009). A família Characidae é um grupo bastante diversificado com cerca de 950 espécies e 165 gêneros (Reis *et al.*, 2003) agrupadas em 13 subfamílias, devido a inclusão de Stervadiinae (Weitsman *et al.*, 2005), abrangendo uma assembléia amplamente heterogênea de peixes de pequeno a grande porte. São listados nesta família 88 gêneros como *Incertae Sedis*, incluindo o gênero *Astyanax* anteriormente pertencente à subfamília Tetragonopterinae (Lima *et al.*, 2003). *Astyanax* possui 128 espécies válidas de acordo com dados atuais (Froese e Pauly, 2010).

As espécies de *Astyanax* são pequenas, corpo comprimido, mais ou menos alongado, raramente com tamanho maior que 150 mm e apresentam ampla distribuição geográfica, principalmente quando se considera a ictiofauna de riachos da bacia do Alto rio Paraná (Eigenmann, 1917; Suárez e Lima-Junior, 2009). *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax fasciatus* e *Astyanax altiparanae* têm sido consideradas um “complexo de espécies”, caracterizado por espécies morfológicamente muito semelhantes (Souza e Moreira-Filho, 1995; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Pazza *et al.*, 2006). O complexo *Astyanax scabripinnis*, por exemplo, compreende 17 espécies, incluindo *A. paranae* (Bertaco e Lucena, 2006; Bertaco *et al.*, 2010).

O gênero *Astyanax* possui inúmeros estudos citogenéticos, e os primeiros dados foram obtidos por Jim e Toledo (1975) em *A. fasciatus* e *A. altiparanae* (citado como *Astyanax bimaculatus*). O número diplóide no gênero varia de 36 cromossomos em *Astyanax schubarti* (Morelli *et al.*, 1983) a 50 cromossomos em *A. scabripinnis*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *Astyanax jacuhiensis* (Maistro *et al.*, 1998; Artoni *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2010).

Em *A. scabripinnis* o número diplóide varia de 46 a 50 cromossomos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Vicari *et al.*, 2008). Dentro deste complexo têm sido observadas diferenças cromossômicas entre populações de riachos da mesma bacia, como número diplóide, fórmula cariotípica, padrão de heterocromatina e número e localização dos pares cromossômicos portadores das RONS (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Ferro *et al.*, 2001; Alves e Martins-Santos, 2002; Kavalco *et al.*, 2007).

Astyanax fasciatus possui variação de 45 a 50 cromossomos (Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2006), também tendo sido observadas diferenças cromossômicas entre populações, como número diplóide, fórmula cariotípica, bem como número e posição das RONS e padrão de heterocromatina (Morelli *et al.*, 1983; Pazza *et al.*, 2008a). Outra característica interessante verificada neste complexo é a presença de diferentes cariomorfos em simpatria, como observado por Artoni *et al.* (2006) no rio Tibagi, e por Pazza *et al.* (2006) no rio Mogi-Guaçu.

Entretanto, em *A. altiparanae* há uma estabilidade no número diplóide, com 50 cromossomos (Jim e Toledo, 1975; Pacheco *et al.*, 2001). Apesar desta tendência para o conservadorismo no número diplóide entre populações de riachos diferentes pertencentes a mesma bacia, variações na fórmula cariotípica, no número e localização das RONS foram verificadas (Ferreira Neto *et al.*, 2009) e pequenas variações no padrão de heterocromatina (Fernandes e Martins-Santos, 2004).

Diante das variações observadas em muitos estudos citogenéticos e da complexidade destas espécies, este estudo busca avaliar citogeneticamente populações de *Astyanax* aff. *paranae*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* pertencentes a dois riachos de cabeceira, verificando as tendências da evolução e diferenciação cromossômica nas três espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises citogenéticas foram realizadas em *Astyanax* aff. *paranae* (6 machos e 11 fêmeas), *A. fasciatus* (4 machos e 7 fêmeas) e *A. altiparanae* (4 machos e 4 fêmeas) coletadas no riacho Pindorama, e *Astyanax* aff. *paranae* (4 machos e 5 fêmeas), *A. fasciatus* (4 machos e 4 fêmeas) e *A. altiparanae* (11 machos e 5 fêmeas) coletadas no riacho Lopei, ambos afluentes do rio São Francisco Verdadeiro, bacia do Alto rio Paraná (Paraná, Brasil). Os peixes foram sacrificados por *overdose* de óleo de cravo como descrito por Griffiths (2000) e os espécimens depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil). A obtenção de cromossomos mitóticos foi a partir de células da porção anterior do rim, segundo Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram caracterizadas pela impregnação com nitrato de prata (Howell e Black, 1980). Para a detecção de heterocromatina (bandas-C) foi utilizada a técnica convencional de hidróxido de bário (Sumner, 1972), com modificações na coloração feita com iodeto de propidium (Lui *et al.*, 2009), sob prévia análise de lâminas com coloração convencional por Giemsa (análise seqüencial). A caracterização da composição da heterocromatina foi realizada através da dupla coloração, com emprego dos fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Schweizer, 1980). A morfologia dos cromossomos foi determinada baseada na razão de braços proposto por Levan *et al.* (1964). O número fundamental foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos (*m*), submetacêntricos (*sm*) e subtelocentricos (*st*) contendo dois braços, e os cromossomos acrocêntricos (*a*) contendo apenas um braço. As metáfases foram capturadas com câmera digital DP71 acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX60 utilizando-se programa DP Controller versão 3.2.1.276.

RESULTADOS

Astyanax aff. *paranae*

O número diplóide encontrado para *Astyanax* aff. *paranae* foi de 48 cromossomos em ambos os riachos, porém nos espécimes do riacho Pindorama foi observada a fórmula cariotípica $8m+20sm+10st+10a$ e no riacho Lopei $8m+16sm+14st+10a$ (Fig. 2). Foram observadas RONS múltiplas com variação interindividual nas duas populações, em posição terminal no braço longo de um dos cromossomos dos pares 3, 5, 18, no braço curto dos pares

15, 16 e 19 e bitelomérica no par 4 no riacho Pindorama; em posição terminal no braço longo em um dos cromossomos dos pares 3 e 14, e no braço curto em um dos cromossomos dos pares 13 e 19, e braço curto do par 16 no riacho Lopei (Fig. 3). Nos espécimes dos dois riachos, o bandamento C evidenciou pequenas marcações centroméricas e associada às RONS, observada nos pares 3, 4, 5, 8 e 13 na população do riacho Pindorama; na população do riacho Lopei foi observada heterocromatina nos pares 2, 3, 8, 9 e 16 (Fig. 4). A dupla coloração por fluorocromos mostrou que as RONS são GC ricas em ambos os riachos (Fig. 5).

Astyanax fasciatus

O número diplóide encontrado para *A. fasciatus* foi de 50 cromossomos em ambos os riachos, porém nos espécimes do riacho Pindorama foi observada a fórmula cariotípica de $8m+18sm+10st+14a$ e no riacho Lopei $8m+14sm+12st+16a$ (Fig. 2). Foram observadas RONS múltiplas com variação interindividual nas duas populações, em posição terminal no braço longo nos pares 5 e 10, e em um dos cromossomos do par 20, no braço curto em um dos cromossomos dos pares 16 e 23 no riacho Pindorama; em posição terminal no braço longo em um dos cromossomos dos pares 10 e 20, no braço curto do par 14 e bitelomérica do par 19 no riacho Lopei (Fig. 3). Na população do riacho Pindorama o bandamento C evidenciou bloco conspícuo em posição terminal no braço longo do par 20. Na população do riacho Lopei o bandamento C evidenciou blocos conspícuos em posição terminal no braço longo dos pares 19 e 20 (Fig. 4). A dupla coloração por fluorocromos mostrou que as RONS são GC ricas em ambos os riachos (Fig. 6).

Astyanax altiparanae

O número diplóide encontrado para *A. altiparanae* foi de 50 cromossomos ($6m+30sm+4st+10a$) em ambos os riachos (Fig. 2). Foram observadas RONS múltiplas com variação interindividual nas duas populações, em posição terminal no braço longo do par 6, no braço curto em um dos cromossomos do par 14, e no par 19 no riacho Pindorama; em posição terminal no braço longo em um dos cromossomos do par 6, no braço curto em um dos cromossomos do par 14, e no par 19 no riacho Lopei (Fig. 3). Nos espécimes dos dois riachos o bandamento C evidenciou bandas pericentroméricas e heterocromatina associada às RONS, observada nos pares 5, 7, 9, 10, 16, 19 e 24 na população do riacho Pindorama. Na população do riacho Lopei foi observada nos pares 4, 5, 8, 10, 16, 19, 21, 22 e 25 (Fig. 4). A dupla coloração por fluorocromos mostrou que as heterocromatinas pericentroméricas são AT-ricas

nas duas populações, no riacho Pindorama presente nos pares 5, 9, 10 e 16, e no riacho Lopei nos pares 4, 5, 10 e 16. As RONS foram GC-ricas em ambas as populações (Fig. 7).

DISCUSSÃO

Os riachos apresentam diversos ambientes, como rochas e corredeiras e as espécies que os habitam em geral apresentam características que favorecem a ocorrência de eventos vicariantes (Castro, 1999). Estas espécies podem ficar isoladas geograficamente nas cabeceiras de tributários, e as barreiras podem ser físicas (como a velocidade do fluxo de água ou tipo de leito), químicas (verificadas na composição da água) ou bióticas (como movimentos da superfície da terra). Tais alterações ecológicas permitem o isolamento microgeográfico em diferentes trechos e em alguns grupos de peixes (Lowe-McConnell, 1969). Em riachos, o isolamento é freqüentemente equiparado como uma variável continua tal como o volume do fluxo e variabilidade destes ambientes, já que pode impedir a dispersão em diferentes graus (Taylor e Warren, 2001).

Diferenças cariotípicas e morfológicas foram observadas por Moreira Filho e Bertollo (1991) em *A. scabripinnis* pertencentes a riachos de diferentes bacias e a riachos dentro da mesma bacia. Estes autores observaram que nos estudos das espécies do complexo *Astyanax scabripinnis*, bem como outras espécies com características similares, é importante interpretar os dados obtidos não somente como um papel do isolamento causado por divisores dos maiores sistemas hidrográficos, mas principalmente como um papel dos diferentes ambientes como os riachos. Assim as diferenças cariotípicas ocorreriam devido ao fato de se desenvolverem independentes processos de rearranjos cromossômicos entre as populações (Souza e Moreira-Filho, 1995).

Apesar de não ter sido verificada variação interpopulacional de número diplóide nas espécies estudadas, *Astyanax aff. paranae* e *A. fasciatus* apresentaram diferenças cariotípicas interpopulacionais mais conspícuas do que as populações de *A. altiparanae*. Diferenças na fórmula cariotípica em distintas populações têm sido observada nos estudos de *A. scabripinnis* (Alves e Martins-Santos, 2002), *A. fasciatus* (Domingues *et al.*, 2007) e *A. altiparanae* (Medrado *et al.*, 2008). A presença de 48 cromossomos no complexo *Astyanax scabripinnis* também foi verificada em riachos do Alto rio Paraná (Moreira Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Maistro *et al.*, 2000; Alves e Martins-Santos, 2002; Malacrida *et al.*, 2003). Em *A. fasciatus* a presença de 50 cromossomos foi verificada por

Artoni *et al.* (2006) no rio Tibagi, afluente do Alto rio Paraná. Como em todos os estudos em *A. altiparanae*, este estudo verificou a presença de 50 cromossomos (Jim e Toledo, 1975; Pacheco *et al.*, 2001; Domingues *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2008; Ferreira Neto *et al.*, 2009).

Em outros grupos de peixes também têm sido encontradas diferenças cariotípicas entre populações da mesma espécie, tanto variações entre riachos, como entre bacias hidrográficas. Um trabalho realizado em 14 populações de *Rhamdia quellen*, comparando riachos da mesma bacia, e de bacias distintas também verificou variações na fórmula cariotípica e na localização das RONS, com manutenção do mesmo número diplóide (Garcia *et al.*, 2010). Pequenas diferenças em relação às RONS em *Pimelodella meeki* de dois tributários do rio Tibagi também foram observadas (Vidotto *et al.*, 2004). Em populações de *Hypostomus nigromaculatus* de dois rios ocorreram variação na fórmula cariotípica e nos pares portadores das RONS (Rubert *et al.*, 2008)

Souza & Moreira-Filho (1995) afirmaram que o número de cromossomos portadores das RONS também significa um importante fator para a diferenciação entre populações. A presença de RONS múltiplas com variação interpopulacional é comum entre as espécies dos complexos *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax fasciatus* (Ferro *et al.*, 2001; Medrado *et al.*, 2008), assim como verificado no presente estudo em *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus*, apresentando diferenças interpopulacionais na localização e no número de cromossomos portadores das RONS. Variações das RONS em *A. altiparanae* também têm sido observadas (Fernandes e Martins-Santos, 2004; Ferreira Neto *et al.*, 2009); entretanto, no presente estudo as duas populações apresentaram os mesmos pares marcados pela prata.

Embora haja na literatura diferentes padrões de heterocromatina em *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, o padrão de heterocromatina centromérica aqui verificado em *Astyanax* aff. *paranae* também foi observado por outros autores em *A. scabripinnis* (Stange e Almeida-Toledo, 1993; Souza *et al.*, 1996; Mantovani *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2008). Em *A. fasciatus* o padrão de heterocromatina telomérico obtido no presente estudo também foi observado por outros autores (Daniel-Silva e Almeida Toledo, 2001; Centofante *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2008a). Já a heterocromatina pericentromérica verificada em *A. altiparanae* parece ser conservada, observada em todos os estudos que utilizaram a técnica do bandamento C (Daniel-Silva e Almeida Toledo, 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2008; Ferreira Neto *et al.*, 2009). Diferenças interpopulacionais na distribuição da heterocromatina como nos resultados obtidos também foram verificadas por outros autores. Moreira-Filho e Bertollo (1991) e Fernandes e Martins-

Santos (2003) verificaram diferenças no padrão, na quantidade e distribuição da heterocromatina entre populações de *A. scabripinnis* de riachos da mesma bacia. Diferenças em relação à heterocromatina entre dois cariomorfos de *A. fasciatus* em simpatria foram demonstradas por Artoni *et al.* (2006), e pequenas variações foram observadas entre duas populações alopátricas (Pazza *et al.*, 2008a). Em relação a *A. altiparanae* foi observada uma pequena diferença interpopulacional na quantidade de heterocromatina assim como verificada no presente estudo (Fernandes e Martins-Santos, 2004).

Muitos estudos no complexo *A. scabripinnis* utilizaram fluorocromos para caracterizar as regiões ricas em GC e AT (Souza *et al.*, 1996; Ferro *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001; Kavalco *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009). Entretanto, menos estudos foram realizados no complexo *A. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2008b) e em *A. altiparanae* (Pacheco *et al.*, 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007). Todos os estudos citados demonstraram a ocorrência de Ag-RONs/CMA₃⁺, como observado nos resultados de *Astyanax* aff. *paranae*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* do presente estudo. A natureza AT-rica das bandas pericentroméricas em *A. altiparanae* aqui verificadas não foi demonstrada pelos demais autores, e talvez represente um caracter desta população.

Hipóteses foram propostas para explicar a restrição de algumas espécies de peixes às cabeceiras e se baseavam em fatores abióticos, como sazonalidade, ordem e largura média do canal; e em fatores bióticos (principalmente competição entre lambaris congêneres), mecanismos de dispersão da espécie através de grandes rios, e a distância genética entre as diferentes populações, constituindo assuntos de importantes implicações ecológicas e zoogeográficas (Caramaschi, 1986). Endler (1982) afirmou que as espécies encontram-se em determinado local porque suas características ecológicas assim lhes permite, tendo dispersado para aquele lugar. Caramaschi (1986) ao fazer um estudo em rios de diferentes bacias com diversas espécies de peixes observou que *A. scabripinnis* foi a única espécie que apresentou valores de constância decrescentes do trecho superior para o inferior nos rios de todas as bacias estudadas. *Astyanax fasciatus* foi classificada como acessória em trecho superior e médio na bacia do Pardo, constante no trecho médio da bacia Paranapanema, acessória no trecho médio e constante no trecho inferior da bacia do Tietê. Já *A. altiparanae* (citada com *Astyanax bimaculatus*) se apresentou como constante em trechos inferiores de rios da bacia do Tietê. Além disso, *A. altiparanae* estava entre as espécies mais abrangentes em relação à ordem de canal, variando de primeira a quinta ordem.

Os riachos Pindorama e Lopei são riachos de primeira ordem, ambos desaguando no rio São Francisco Verdadeiro (segunda ordem), e com uma distância aproximada de 36 km de

foz a foz. Devido a sua maior abrangência em rios e riachos de primeira a quinta ordem, e ao seu comportamento migratório, mesmo dentro de curtas distâncias (Orsi *et al.*, 2002), as duas populações de *A. altiparanae* parecem não estar isoladas, hipótese esta corroborada pelos dados citogenéticos aqui apresentados. Entretanto, para *Astyanax* aff. *paranae*, com menor constância dos espécimes em trechos inferiores do canal e características que a restringem a cabeceiras, como proposto por Caramaschi (1986), o trecho do rio São Francisco Verdadeiro compreendido entre a foz dos dois riachos parece ter funcionado como uma barreira ecológica para as duas populações, impedindo a dispersão entre os dois riachos, hipótese também corroborada pelas diferenças cariotípicas interpopulacionais observadas no presente trabalho.

Em *A. fasciatus* onde a forma de sua dispersão é mais abrangente, sendo espécie acessória ou constante em diferentes trechos do canal, como observado por Caramaschi (1986), também foram encontradas diferenças entre as populações estudadas. De acordo com Artoni *et al.* (2006), a diversidade cariotípica interpopulacional pode ocorrer mesmo em espécies com certa dispersão, tais como *A. fasciatus*, e surgiria em consequência da fixação de rearranjos cromossômicos nas populações, influenciada por fatores como tamanho efetivo da população, fluxo gênico e/ou deriva genética. Além disso, estudos citogenéticos em *A. fasciatus* em distintas ordens do canal demonstram diferenças cariotípicas marcantes entre os espécimes de rios e os de riachos. O predomínio de cariomorfos com 46 e 48 cromossomos em populações de *A. fasciatus* (Centofante *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2006; Torres-Mariano e Morelli, 2006; Pazza *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2008a), e a presença de diversos cariomorfos (45, 46, 47 e 48 cromossomos) em simpatria no rio Mogi-Guaçu (Pazza *et al.*, 2006), demonstram uma característica própria das populações que ocupam estes sistemas maiores. Já estudos realizados em riachos de cabeceiras, o cariomorfo de 50 cromossomos (sem a presença de diferentes cariomorfos) parece ser comum em espécimes coletados nestes ambientes, como verificado em um dos cariomorfos observados por Artoni *et al.* (2006) no rio Cará-cará e lagoa Dourada (afluentes do rio Tigabi) e no presente trabalho, e pode representar uma característica das populações do complexo de *A. fasciatus* restritas a riachos de cabeceiras.

No presente estudo ficou evidente que estes ecossistemas (riachos), que apresentam grande diversidade de ambientes, abrigam uma diversidade ictiofaunística pouco conhecida, e que a citogenética de peixes associada a estudos de ecologia é uma importante ferramenta para entender os processos envolvidos na distribuição e dispersão de algumas espécies, verificando diferentes tendências na evolução e diversificação em espécies do gênero *Astyanax*.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Unioeste, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e ao Grupo de Pesquisas em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos-GETECH pelo suporte financeiro e apoio logístico na captura dos peixes, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – SISBIO, número da licença: 10522-3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel LDS; Mantovani M, Moreira-Filho O. 2006. Chromosomal distribution of the As-51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **29**: 448-452.
- Alves AL, Martins-Santos IC. 2002. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n = 48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia* **67**: 117-122.
- Artioni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC, Vicari MR, Bertollo LAC. 2006. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): Evidences of a species complex in the Upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology* **4**: 197-202.
- Bertaco VA, Lucena CAS. 2006. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology* **4**: 53-60.
- Bertaco VA, Carvalho FR, Jerep FC. 2010 *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* **8**: 265-275.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* **1**: 103-120.
- Caramaschi EP. 1986. Distribuição da ictiofauna de riachos das Bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo.
- Castro RMC. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (Caramaschi EPR, Mazzoni R, Peres-Neto, PR. ed.), pp. 139-155. *Oecologia Brasiliensis*, Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ.
- Castro RMC., Casatti, L, Santos HF, Ferreira KM, Ribeiro AC, Benine RC, Dardis GZP, Melo ALA, Stopiglia R, Abreu TX, Bockmann FA, Carvalho M, Gibran FZ, Lima FCT. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. *Biota Neotropica* **3**: 1-31.

- Centofante L, Bertollo LAC, Justi AJ, Moreira-Filho O. 2003. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). *Ichthyological Exploration of Freshwater* **14**: 361-368.
- Daniel-Silva MFZ, Almeida-Toledo LF. 2001. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia* **54**: 209-215.
- Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Artoni RF. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* **5**: 37-44.
- Eigenmann CH. 1917. *The American Characidae*. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, **43**: 209-310.
- Endler JA. 1982. Alternative hypothesis in Biogeography: Introduction and synopsis of the Symposium. *American Zoologist* **22**: 441-452.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC. 2003. Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin, PR, Brazil. *Cytologia* **68**: 289-293.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC. 2004. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* **141**: 328-332.
- Ferreira Neto M, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O. 2009. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology* **32**: 792-796
- Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 2001 Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica* **110**: 55-62.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* **49**: 810-813.
- Froese R, Pauly D. Editors. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <http://www.fishbase.org/search.php> (último acesso 20 outubro 2010).
- Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 2010. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* **9**: 365-384.
- Griffiths SP. 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* **57**: 1453-1464.

Gubiani EA, Daga VS, Frana VA, Graça WJ. 2010. Fish, Toledo urban streams, São Francisco Verdadeiro River drainage, upper Paraná River basin, state of Paraná, Brazil. *Check List* **6**: 45-48.

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

Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**: 1014-1915.

Jim SM, Toledo V. 1975. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Ciência e Cultura* **27**: 1122-1124.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. 2007. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* **30**: 329-335.

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

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa O, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Casatti L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF. Characidae. 2003. In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Junior CJ. ed.), pp. 106-169. Porto Alegre: Edipucrs.

Lowe-McConnell RH. 1969. Speciation in tropical fresh-water fishes. *Biological Journal of the Linnean Society* **1**: 51-75.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O. 2009. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Mícron* **40**: 552-559.

Maistro EL, Foresti F, Oliveira C. 1998. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* **21**: 201-206.

Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **23**: 365-369.

Malacrida ACCP, Dias AL, Giuliano-Caetano L. 2003. Natural Triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. *Cytologia* **68**: 267-270.

Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* **109**: 161-168.

Medrado AS, Figueiredo AVA, Waldschmidt AM, Affonso PRAM, Carneiro PLS. 2008. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei,

Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology* **31**: 208-214.

Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC. 1998. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **21**: 55-61

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

Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Toledo SFA. 1983. Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I: Karyotypic variability. *Cariologia* **36**: 235-244.

Nelson GJ. 2006. *Fishes of the world*. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 601p.

Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**: 81-100.

Orsi ML, Shibatta AO, Silva-Souza AT. 2002. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis.. In *A bacia do rio Tibagi*. (Medri ME, Bianchini E, Shibatta O A, Pimenta JA. ed.). pp. 425-432 Londrina: Eduel.

Oyakawa OT, Akama A, Mautari KC, Nolasco JC. 2006. *Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo*. São Paulo: Neotropica, 201p.

Pacheco RB, Giuliano-Caetano L, Dias AL 2001. Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). *Chromosome Science* **5**: 109-114.

Pacheco RB, Giuliano-Caetano L, Julio Junior HF, Dias AL. 2010. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotropical Ichthyology* **8**: 667-671.

Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC. 2006 Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research* **112**: 313-319.

Pazza R, Kavalco, SAF, Penteado PR, Kavalco KF, Almeida-Toledo LF. 2008a. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): A multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology* **72**: 2002-2010.

Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC. 2008b. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2- Chromosomal location of a satellite DNA. *Cytogenetic and Genome Research* **122**: 61-66.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Junior, CJ. 2003. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 742 p.

- Rosa R; Rubert M; Malabarba LR, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L. 2009. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. *Neotropical Ichthyology* **7**: 601-605.
- Rubert M, Zawadzki CH, Giuliano-Caetano L. 2008. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes, Loricariidae). *Neotropical Ichthyology* **6**: 93-100.
- Schweizer D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**: 190-193.
- Shurin JB, Cottenie K, Hillebrand H. 2009. Spatial autocorrelation and dispersal limitation in freshwater organisms. *Oecologia* **159**, 151-159.
- Souza IL, Moreira-Filho O. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* **60**: 1-11.
- Souza IL, Moreira-Filho O, Galetti Junior PM. 1996. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazilian Journal of Genetics* **19**: 405-410.
- Souza IL, Galian J, De la Rua P, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. 2001. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia* **66**: 85-91.
- Stange EAR, Almeida-Toledo LF. 1993. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal Genetic* **16**: 601-615.
- Stevaux JC, Souza Filho EE, Jabur IC. 1997. A história quaternária do Rio Paraná em seu alto curso. In *A planície de inundação do Rio Paraná* (Vazzoler AEAM, Agostinho AA, Hahn NS. eds.) pp. 3-46. UEM-Nupelia, Maringá: EDUEM.
- Stevaux JC. 2000. Climatic events during the Late Pleistocene and Holocene in the Upper Parana River: Correlation with NE Argentina and South-Central Brazil. *Quaternary International* **72**: 73-85.
- Súarez YR, Lima-Junior SE. 2009. Variação espacial e temporal nas assembléias de peixes de riachos na bacia do rio Guiráí, Alto Rio Paraná. *Biota Neotropica* **9**: 101-111.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
- Taylor CM, Warren ML. 2001. Dynamics in species composition of stream fish assemblages: Environmental variability and nested subsets. *Ecology* **82**: 2320-2330.
- Torres-Mariano AR, Morelli S. 2006. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*. **66**: 161-165.

Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* **31**: 173-179.

Vidotto AP, Swarça AC, Fenocchio AS, Dias AL. 2004. Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity* **95**: 517-520.

Weitzman SH, Menezes NA, Evers HG, Burns JR. 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **3**: 329-360.

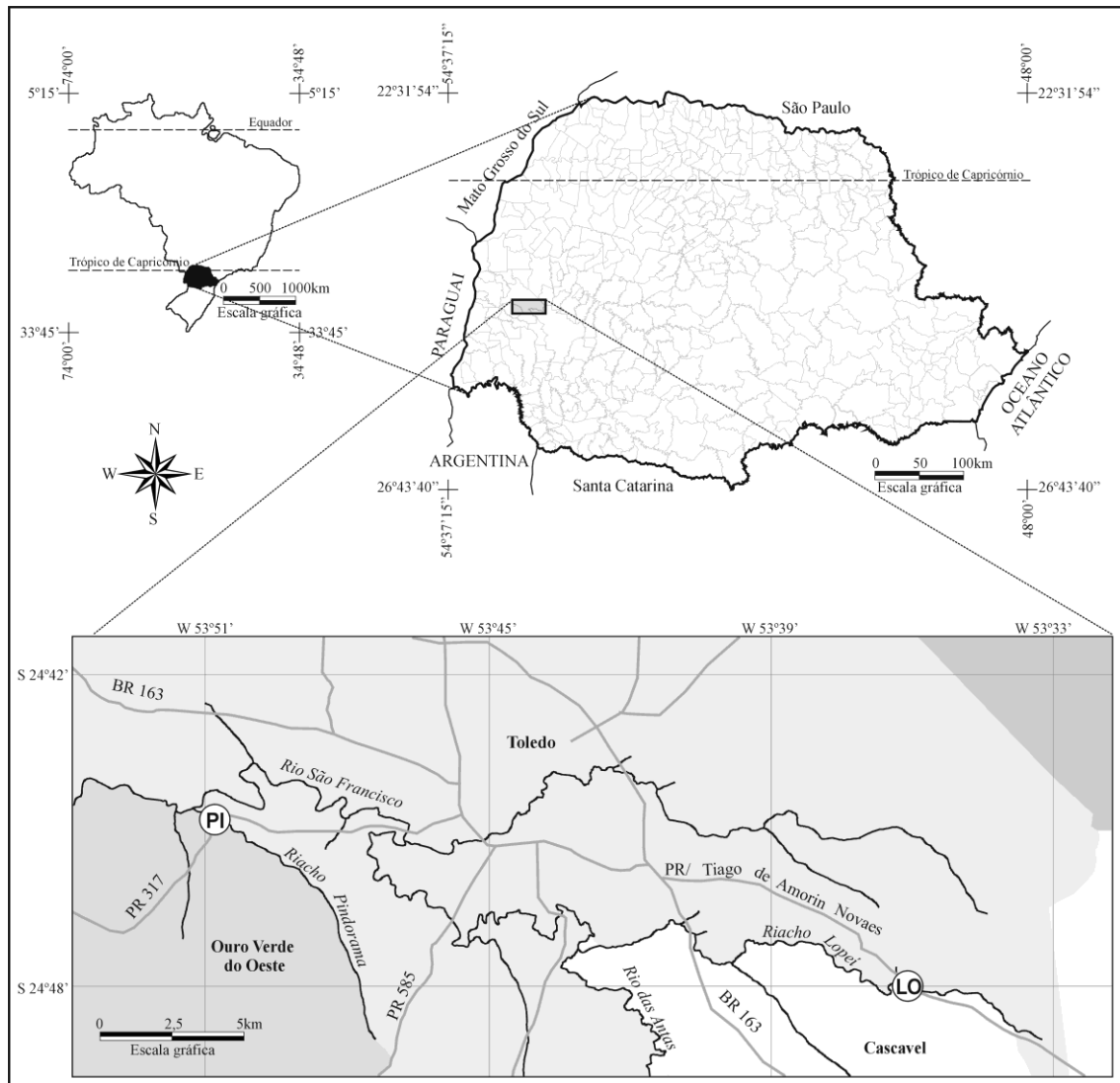


Figura 1. Pontos de coleta das espécies: (LO) riacho Lopei e (PI) riacho Pindorama.

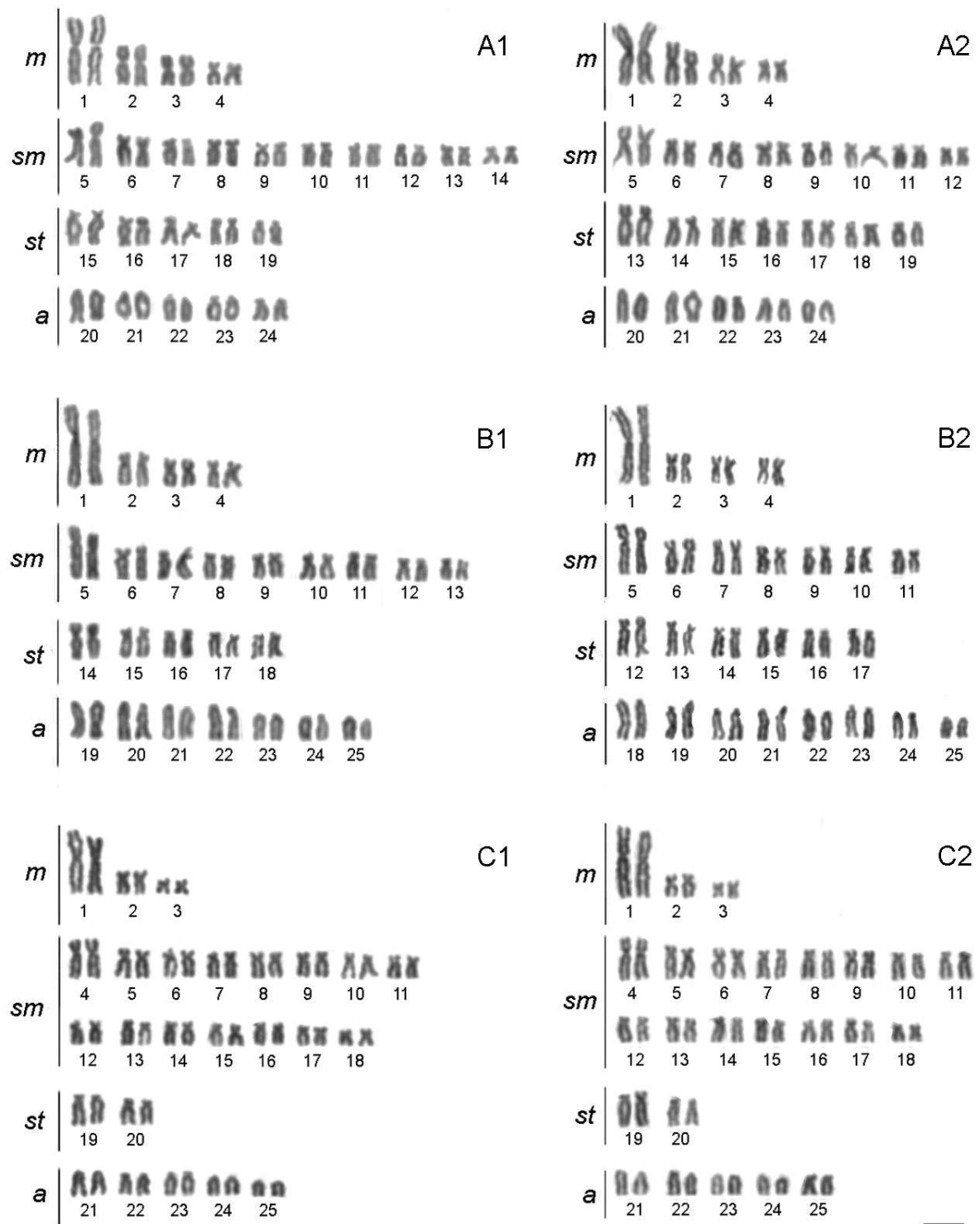


Figura 2. Cariótipos corados por Giemsa: *Astyanax aff. paranae*, riacho Pindorama (A1) e riacho Lopei (A2); *A. fasciatus*, riacho Pindorama (B1) e riacho Lopei (B2); *A. altiparanae*, riacho Pindorama (C1) e riacho Lopei (C2). Barra = 10 μm.

<i>Astyanax aff. paranae</i>									
	3 (m)	4 (m)	5 (sm)	13 (st)	14 (st)	15 (st)	16 (st)	18 (st)	19 (st)
Pindorama									
Lopei									

<i>Astyanax fasciatus</i>								
	3 (m)	5 (sm)	10 (sm)	14 (st)	16 (st)	19 (a)	20 (a)	23 (a)
Pindorama								
Lopei								

<i>Astyanax altiparanae</i>			
	6 (sm)	14 (sm)	19 (st)
Pindorama			
Lopei			

Figura 3. Cromossomos portadores das RONS nas populações de *Astyanax aff. paranae*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* dos riachos Pindorama e Lopei.

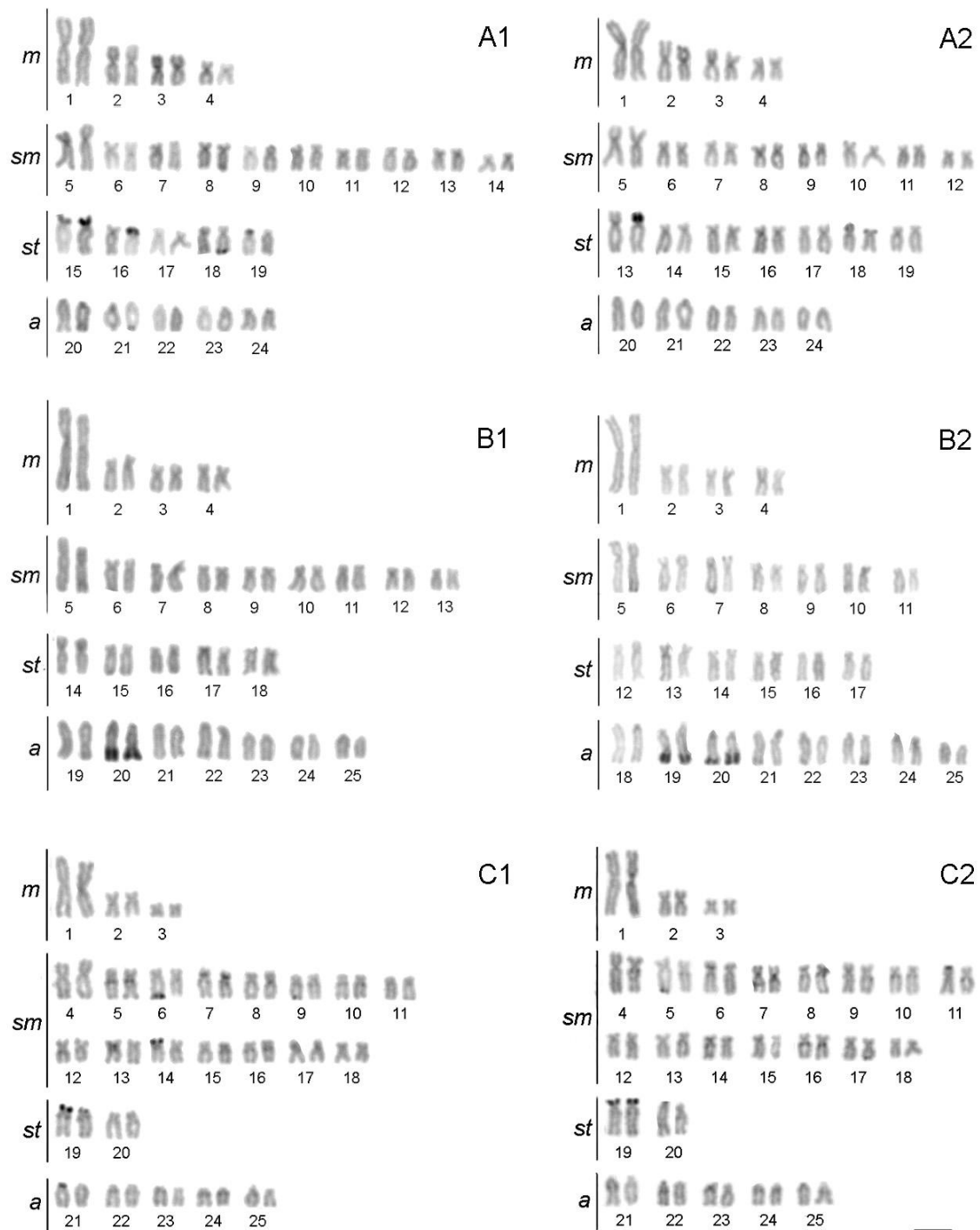


Figura 4. Cariótipos C-bandados: *Astyanax* aff. *paranae*, riacho Pindorama (A1) e riacho Lopei (A2); *A. fasciatus*, riacho Pindorama (B1) e riacho Lopei (B2); *A. altiparanae*, riacho Pindorama (C1) e riacho Lopei (C2). Barra = 10 μ m.

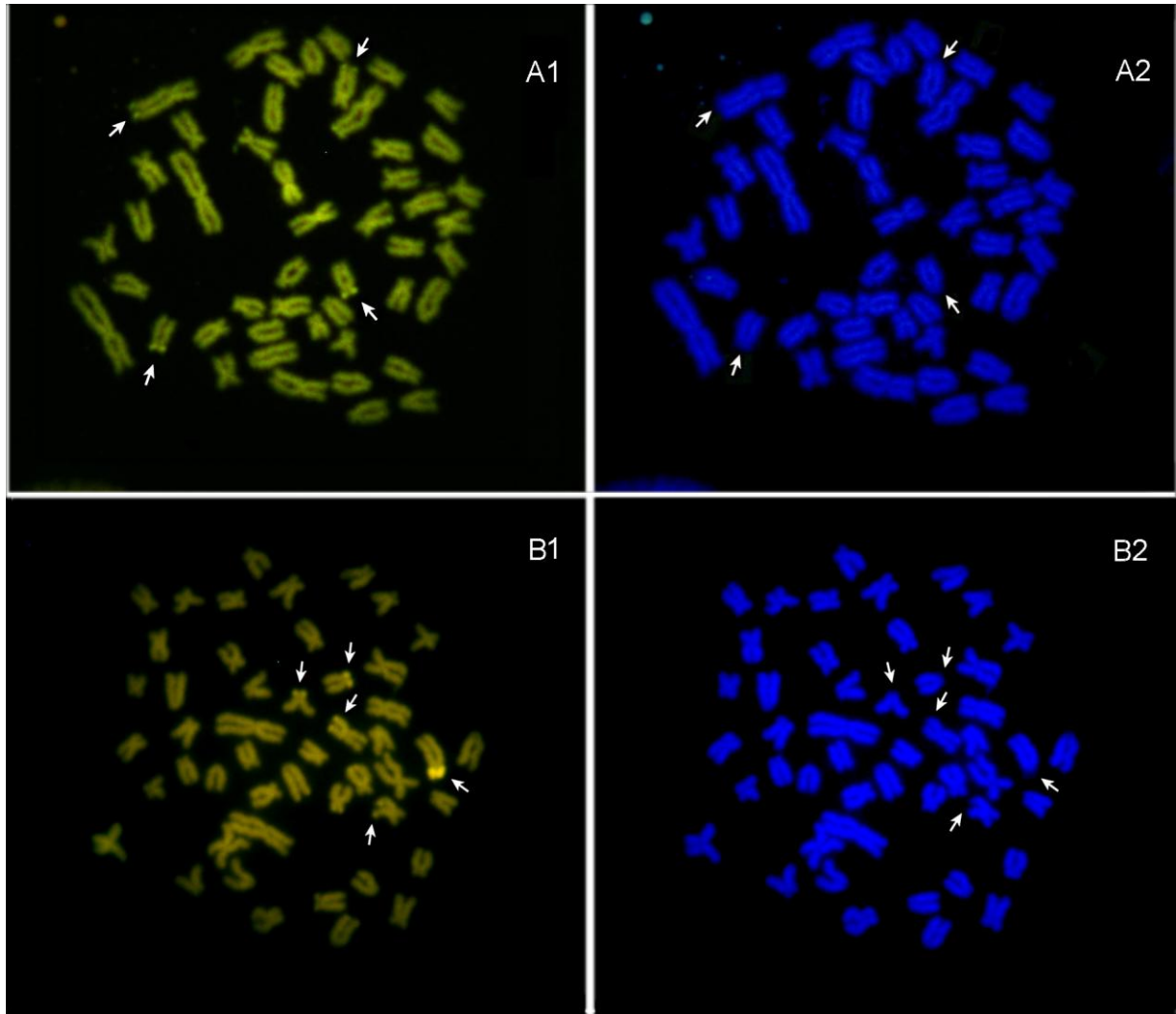


Figura 5. Metáfases de *Astyanax* aff. *paranae* coradas por fluorocromos: população do riacho Pindorama, CMA₃ (A1) e DAPI (A2); população do riacho Lopei, CMA₃ (B1) e DAPI (B2). As setas indicam as RONS. Barra = 10 µm.

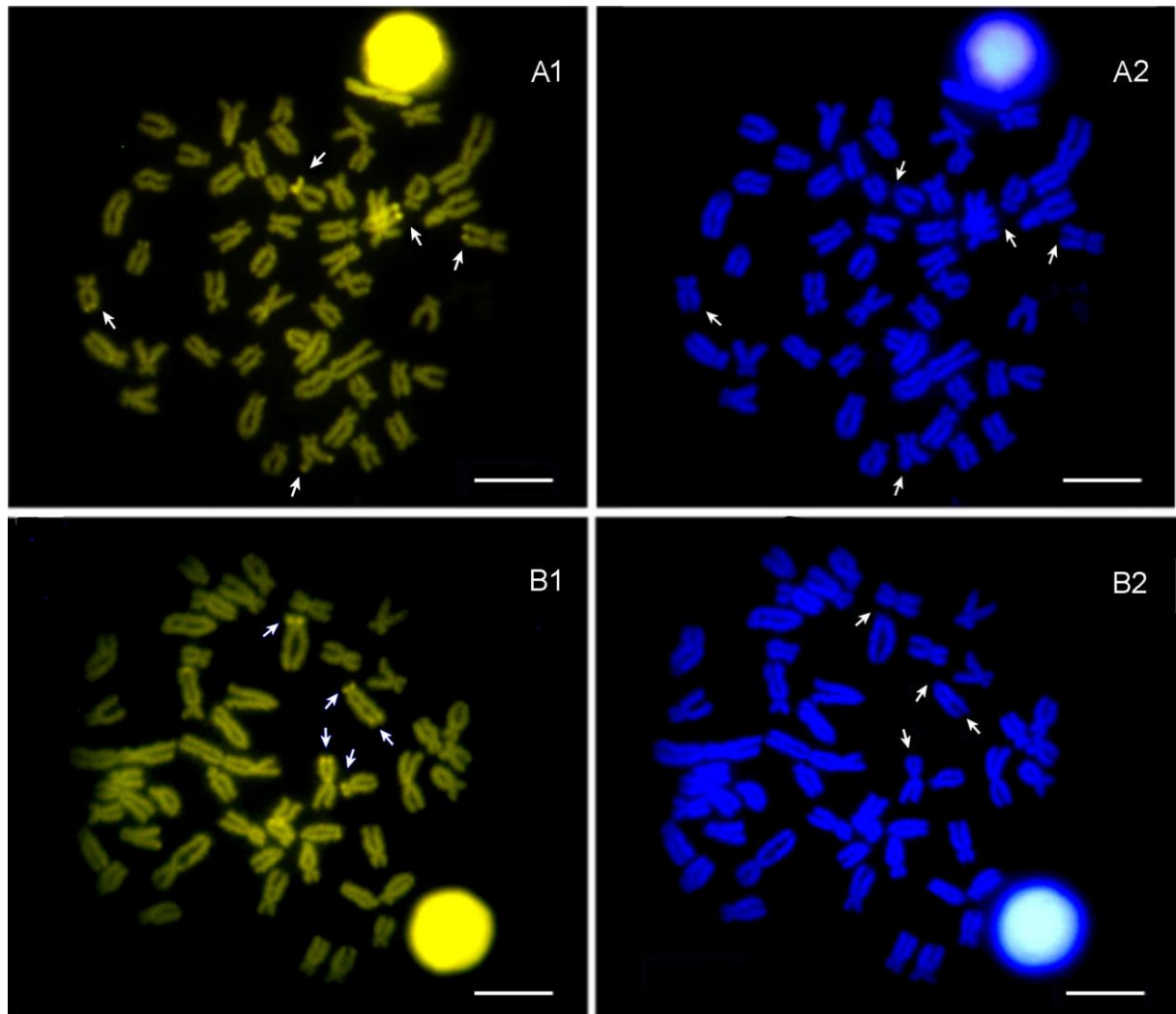


Figura 6. Metáfases de *Astyanax fasciatus* coradas por fluorocromos: população do riacho Pindorama, CMA₃ (A1) e DAPI (A2); população do riacho Lopei, CMA₃ (B1) e DAPI (B2). As setas indicam as RONS. Barra = 10 μm.

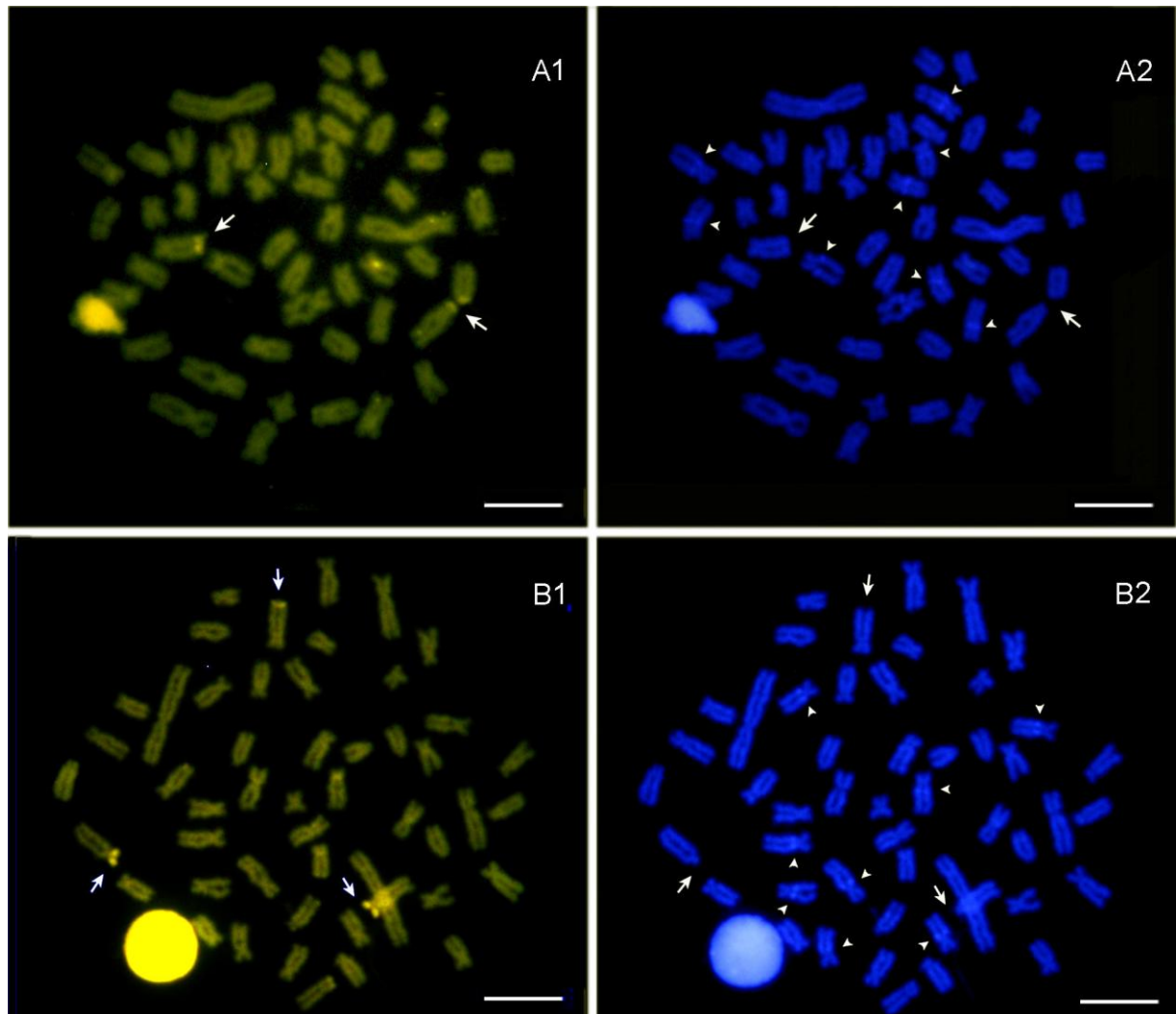


Figura 7. Metáfases de *Astyanax altiparanae* coradas por fluorocromos: população do riacho Pindorama, CMA₃ (A1) e DAPI (A2); população do riacho Lopei, CMA₃ (B1) e DAPI (B2). As setas indicam as RONS e as cabeças de seta indicam as heterocromatinas AT-ricas. Barra = 10 μ m.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi realizado em dois riachos da bacia do Alto rio Paraná e apresentou várias abordagens, tanto em relação aos dados cromossômicos demonstrando tendências evolutivas nos grupos de peixes estudados, como também apresentou a importância de ambientes como os riachos que possuem características próprias, abrigando espécies de pequeno porte.

Tendo em vista a diversidade encontrada na família Heptapteridae e a necessidade de mais dados citogenéticos com o intuito de esclarecer a tendência evolutiva dentro do grupo, o estudo referente ao Capítulo 1 revelou um caminho diferente na evolução cariotípica de *Heptapterus mustelinus*, uma espécie de pequeno porte, coletada no riacho Pindorama. Os resultados obtidos demonstraram diferenças cariotípicas marcantes quando comparados com os demais dados de Heptapteridae da literatura, reforçando a importância de realizar mais estudos nas espécies da família, visto que apenas cinco gêneros possuem dados citogenéticos.

Diante da complexidade das espécies do gênero *Astyanax*, o Capítulo 2 fez uma abordagem focada dentro do gênero, principalmente nos complexos *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax fasciatus* e *Astyanax altiparanae*. Além de demonstrar diferenças cariotípicas mais conspícuas entre as populações de *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus* do que entre as populações de *A. altiparanae* dos riachos Pindorama e Lopei, este estudo buscou entender, através de abordagens ecológicas e biogeográficas, os processos envolvidos nestes resultados, provavelmente pelo isolamento entre as populações de *Astyanax* aff. *paranae* e *A. fasciatus*, originado por fatores bióticos e abióticos, e o não isolamento entre as populações de *A. altiparanae* pelo modo de dispersão desta espécie.

A citogenética se mostrou uma ferramenta essencial produzindo resultados que dão as respostas necessárias para diferentes propósitos, como estudos evolutivos dentro dos diversos grupos de peixes, bem como estudos comparativos entre populações, proporcionando um vasto conhecimento da diversidade da ictiofauna.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abucarma, M. & Martins-Santos, I. C. (2001). Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguaçu Basin. *Cytologia* **66**, 299-306.
- Agostinho, A. A. & Júlio Junior, H. F. (1999). Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In *Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais* (Lowe-McConnell, R. H. ed.), pp. 374-399. São Paulo: EDUSP.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C. & Pelicice, F. M. (2007a). *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá: Eduem. 501p.
- Agostinho, A. A., Pelicice, F. M., Petry, A. C., Gomes, L. C. & Júlio Junior, H. F. (2007b). Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. *Aquatic Ecosystem Health & Management* **10**, 174-186,
- Almeida-Toledo, L. F., Forest, F., Trajano, E. & Toledo-Filho, A. S. (1992). Cytogenetic analysis of the blind catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* **45**, 255-262.
- Alves, A. L. & Martins-Santos, I. C. (2002). Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n = 48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia* **67**, 117-122.
- Aquino, P. P. U., Schneider, M., Silva, M. J. M., Fonseca, C. P., Arakawa, H. B. & Cavalcanti, D. R. (2009). Ictiofauna dos córregos do Parque Nacional de Brasília, bacia do Alto Rio Paraná, Distrito Federal, Brasil Central. *Biota Neotropica* **9**, 217-230.
- Artori, R. F., Shibatta, O. A., Gross, M. C., Schneider, C. H., Almeida, M. C., Vicari, M. R & Bertollo, L. A. C. (2006). *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): Evidences of a species complex in the Upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology* **4**, 197-202.
- Benton, P. D., Ensign, W. E., & Freeman, B. J. (2008). The Effect of Road Crossings on Fish Movements in Small Etowah Basin Streams. *Southeastern Naturalist* **7**, 301–310.
- Bertaco, V. A. & Lucena, C. A. S. (2006). Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology* **4**, 53-60.
- Bertaco, V. A., Carvalho, F. R. & Jerep, F. C. (2010) *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. . *Neotropical Ichthyology* **8**, 265-275.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic Considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* **1**, 103-120.

Bertollo, L. A. C., Moreira Filho, O. & Galetti Junior, P. M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal Fish Biology* **28**, 153-159.

Bockmann, F. A. & Guazzeli, G. M. (2003). Family Heptapteridae (Heptapterids). In *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Reis, R. E., Kullander S. O. & Ferraris Junior, C. J. ed.), pp. 406-431. Porto Alegre: Edipucrs.

Böhlke, J. E., Weitzman, S. H. & Menezes, N. A. (1978). Estado atual da sistemática de peixes da América do Sul. *Acta Amazônica* **8**, 657-677.

Britski, H. A., Sato, Y. & Rosa, A. B. S. (1988). *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)*, 3ª ed. Brasília: CODEVASF. 115 p.

Buckup, P. A. (1999). Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (Caramaschi, E. P. R., Mazzoni, R. & Peres-Neto, P. R. ed.), pp. 91-138. *Oecologia Brasiliensis*. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ.

Caramaschi, E. P. (1986). Distribuição da ictiofauna de riachos das Bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo.

Castro, R. M. C. (1999). Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (Caramaschi, E. P. R., Mazzoni, R. & Peres-Neto, P. R. ed.), pp. 139-155. *Oecologia Brasiliensis*, Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ.

Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Ferreira, K. M., Ribeiro, A. C., Benine, R. C., Dardis, G. Z. P., Melo, A. L. A., Stopiglia, R., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Carvalho, M., Gibran, F. Z. & Lima, F. C. T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. *Biota Neotropica* **3**, 1-31.

Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F.; Vari, R. P., Melo, A. L. A.; Martins, L. S. F.; Abreu, T. X., Benine R. C., Gibran, F. Z., Ribeiro, A. C., Bockmann, F. A., Caravvalho, M., Pelição, G. Z., Ferrerira, K. M., Stopiglia, R. & Akama, A. (2005). Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **16**, 193-288.

Dias, A. L. & Foresti, F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Brazilian Journal of Genetics* **16**, 585-600.

Domingues, M. S., Vicari, M. R., Abilhoa, V., Wamser, J. P., Cestari, M. M., Bertollo, L. A. C., Almeida, M. C. & Artoni, R. F. (2007). Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* **5**, 37-44.

Eigenmann, C. H. (1917). *The Americam Characidae*. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, **43** (3): 209-310.

- Fauaz, G., Vicente, V. E. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B chromosomes in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* **17**, 157-163.
- Fenocchio, A. S. & Bertollo, L. A. C. (1990). Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* **81**, 193-198.
- Fenocchio, A. S., Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Camacho, J. P. (2000). Considerations on B-Chromosome origin and distribution in fish populations of the genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* **48**, 105-109.
- Fenocchio, A. S., Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S., Dias, A. L. & Swarça, A. C. (2003a). Cytogenetic Studies and Correlated Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* **68**, 363-368.
- Fernandes, C. A. & Martins-Santos, I. C. (2003). Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin, PR, Brazil. *Cytologia* **68**, 289-293.
- Fernandes, C. A. & Martins-Santos, I. C. (2004). Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* **141**, 328-332.
- Ferraris Junior, C. J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* **1418**, 1-628.
- Ferreira Neto, M., Vicari, M. R., Camargo, E. F. Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. (2009). Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology* **32**, 792-796.
- Ferro, D. A. M., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica* **110**, 55-62.
- Foresti, F., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* **49**, 810-813.
- Froese, R. & Pauly, D. Editors. (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <http://www.fishbase.org/search.php> (último acesso 20 outubro 2010).
- Galetti Junior, P. M. (1998). Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology* **65**, 53-56.
- Garcia, C., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* **9**, 365-384.

- Garcia, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2010). Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* **63**, 32-40.
- Garutti, V. (1988). Distribuição longitudinal da ictiofauna de um córrego da região noroeste do Estado de São Paulo, Bacia do Rio Paraná. *Revista Brasileira de Biologia* **48**, 747-759.
- Garutti, V. & Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS, Série Zoológica*, **13**, 65-88.
- Graça, W. J., & C. S. Pavanelli. (2007). *Peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM. 241 p.
- Gubiani, E. A., Daga, V. S., Frana, V. A. & Graça, W. J. (2010). Fish, Toledo urban streams, São Francisco Verdadeiro River drainage, upper Paraná River basin, state of Paraná, Brazil. *Check List* **6**, 45-48.
- Günther, A. (1864). *Catalogue of the fishes in the British Museum*. 5^aed. London. 455p.
- Gurgel, H. de C. B. (2004). Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **21**, 131-135.
- Hashimoto, D. T., Gonçalves, V. R., Bortolozzi, J., Foresti, F. & Porto-Foresti, F. (2008). First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 275-278.
- Hochberg, V. B. M. & Erdtmann, B. (1988). Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Brazilian Journal of Genetics* **11**, 563-576.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**, 1014-1915.
- Jim, S. M., & Toledo, V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Ciência e Cultura* **27**, 1122-1124.
- Kantek, D. L. Z., Peres, W. A. M., Buckup, P. A. & Moreira-Filho, O. (2009). Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainage, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *Zoologia* **26**, 733-738.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2007). Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* **30**, 329-335.
- Langeani, F., Castro, R. M. C., Oyakawa, O. T., Shibatta, O. A., Pavanelli, C. S. & Casatti, L. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* **7**(3), 1-17.

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

Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Silva, J. F. P., Vari, R. P., Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O., Pavanelli, C. S., Menezes, N. A., Lucena, C. A. S., Malabarba, M. C. S. L., Lucena, Z. M. S., Reis, R. E., Langeani, F., Casatti, L., Bertaco, V. A., Moreira, C. and Lucinda, P. H. F. Characidae. (2003). In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris Junior, C. J. ed.), pp. 106-169. Porto Alegre: Edipucrs.

Lowe-McConnell, R. H. (1969). Speciation in tropical fresh-water fishes. *Biological Journal of the Linnean Society* **1**, 51-75.

Maistro, E. L., Foresti, F. & Oliveira, C. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* **21**, 201-206.

Maistro, E. L., Foresti, F., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2000). Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **23**, 365–369.

Maistro, L. M.; Oliveira, C. & Foresti, F. (2002). Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, Silver Nitrate and CMA3 staining and Restriction Endonucleases Banding. *Cytologia* **67**, 25-31.

Malabarba, L. R. (1998). Monophyly of Cheirodontinae, characters and major clades. P.193-233. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S. ed.), pp. 193-233. Porto Alegre: Edipucrs.

Mantovani, M., Abel, L. D. S., Mestriner, C. A. & Moreira-Filho, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* **109**, 161-168.

Mantovani, M., Abel, L. D. S., Mestriner, C. A. & Moreira-Filho, O. (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **27**, 536-542.

Margarido, V. P. & Galetti Junior, P. M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology* **23**, 569-573.

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

Mazzuchelli, J., Swarça, A. C. & Dias, A. L. (2007). Structural chromosome polymorphism in a *Pimelodus maculatus* La Cepède, 1803 population (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paranapanema River Basin, PR, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **67**, 935-937.

- Medrado, A. S., Figueiredo, A. V. A., Waldschmidt, A. M., Affonso, P. R. A. M. & Carneiro, P. L. S. (2008). Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 208 - 214.
- Mirande, J. M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* **8** (3): 385-568.
- Mizoguchi, S. M. H. N. & Martins-Santos, I. C. (1998). Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **21**, 55-61
- Moraes, V. P., Cereali, S. S., Froehlich, O. & Dias, A. L. (2007). Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research* **6**, 627-633.
- Moreira-filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a “species complex”. *Brazilian Journal of Genetics* **14**, 331-357.
- Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti, F., Moreira-Filho, O. & Toledo, S. F. A. (1983). Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I: Karyotypic variability. *Cariologia* **36**, 235-244.
- Nelson, G. J. (2006). *Fishes of the world*. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 601p.
- Néo, M. D, Moreira-Filho, O. & Camacho, J. P. M. (2000). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* **85**, 136-141.
- Oliveira, C. & Gosztonyi, A. E. (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. *Caryologia* **53**, 1-37.
- Oliveira, C., Foresti, F. & Hilsdorf, A. W. S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**, 81-100.
- Ortí, G. & Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* **46**, 75-100.
- Ortí, G. & Vari, R. P. (1997). Characiformes. Tetras, piranhas, hatchetfishes, headstanders, pencilfishes, and their relatives. Version 27 January 1997 (under construction). <http://tolweb.org/Characiformes/15062/1997.01.27> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Orsi, M. L., Shibatta, O. A. & Silva-Souza, A. T. (2002). Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertãoópolis.. In *A bacia do rio Tibagi*. (Medri, M. E., Bianchini, E., Shibatta, O. A. & Pimenta, J. A. ed.). pp. 425-432 Londrina: Eduel.

Oyakawa, O. T., Akama, A., Mautari, K. C. & Nolasco, J. C. (2006). *Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo*. São Paulo: Neotrópica, 201p.

Pacheco, R. B, Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L (2001). Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). *Chromosome Science* **5**, 109-114.

Pacheco, R. B., Giuliano-Caetano, L., Julio Junior, H. F. & Dias, A. L. (2010). Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotropical Ichthyology* **8**, 667-671.

Pazza, R., Kavalco, K. F. & Bertollo, L. A. C. (2006) Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research* **112**, 313-319.

Pazza, R., Kavalco, S. A. F., Penteado, P. R., Kavalco, K. F. & Almeida-Toledo, L. F. (2008). The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): A multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology* **72**, 2002-2010.

Pinna, M. C. (1998). Phylogenetic relationships of neotropical siluriforms (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Vari, R. E., Lucena, Z. M. & Lucena, C.A. ed.), pp. 279 - 330. Porto Alegre: Edipucrs.

Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Maistro, E. L. & Foresti, F. (1997). Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazilian Journal of Genetics* **20**, 377–380.

Programa Hidrológico Internacional (HELP Program). Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco Verdadeiro. Disponível em: <http://saofrancisco.hidroinformatica.org/br/basin.html>. Acesso em: 10 de set. 2010.

Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris Junior, C. J. (2003). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 742 p.

Sallun, A. E. M., Suguio, K. & Stevaux, J. C. (2007). Proposição formal do Alogrupo Alto Rio Paraná (SP, PR e MS). *Geologia USP: Série Científica* **7**, 49-70.

Salvador, L. B. & Moreira-Filho, O. (1992). B Chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* **69**, 50-56.

Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**, 190-193.

Shurin, J. B., Cottenie, K. & Hillebrand, H. (2009). Spatial autocorrelation and dispersal limitation in freshwater Organisms. *Oecologia* **159**, 151-159.

- Souza, I. L. & Moreira-Filho, O. (1995). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* **60**, 1-11.
- Souza, I. L., Moreira-Filho, O. & Galetti Junior, P. M. (1996). Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazilian Journal of Genetics* **19**, 405-410.
- Souza, I. L., Galian, J., De la Rua, P., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O. (2001). Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia* **66**, 85-91.
- Stange, E. A. R. & Almeida-Toledo, L. F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal Genetic* **16**, 601-615.
- Stevaux, J. C., Souza Filho, E. E. & Jabur, I. C. (1997). A história quaternária do Rio Paraná em seu alto curso. In *A planície de inundação do Rio Paraná* (Vazzoler, A. E. A. M., Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. eds.) pp. 3-46. UEM-Nupelia, Maringá: EDUEM.
- Stevaux, J. C. (2000). Climatic events during the Late Pleistocene and Holocene in the Upper Parana River: Correlation with NE Argentina and South-Central Brazil. *Quaternary International* **72**, 73-85.
- Stivari, M. K. & Martins-Santos, I. C., (2004). Karyotype Diversity in two Populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* **69**, 25-34.
- Stolf, R., Swarça, A. C., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2004). Analyses of karyotype and nucleolar organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. *Caryologia* **57**, 348-352.
- Suárez, Y. R. & Lima-Junior, S. E. (2009). Variação espacial e temporal nas assembléias de peixes de riachos na bacia do rio Guiráí, Alto Rio Paraná. *Biota Neotropica* **9**, 101-111.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**, 304-306.
- Swarça, A. C., Vidotto A. P. & Dias, A. L. (2003a). Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia* **56**, 421-425.
- Taylor, C. M. & Warren, M. L. (2001). Dynamics in species composition of stream Wsh assemblages: Environmental variability and nested subsets. *Ecology* **82**, 2320-2330.
- Toledo, V. & Ferrari, I. (1976). Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica* **4**, 120-123.
- Uieda, V. S. (1995). Comunidade de peixes de um riacho litorâneo: composição, habitat e hábitos. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas. Campinas, SP.

Unesco. Sao Francisco Verdadeiro (Brazil). Disponível em: http://portal.unesco.org/science/es/ev.php-URL_ID=3807&URL_DO=DO_PRINTPAGE&URL_SECTION=201.html. Acesso em: 10 de set. 2010.

Valcarcel, A., Brunner, P. & Maggese, M. C. (1993). B-Chromosome polymorphism in South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture* **110**, 111-118.

Vasconcelos, C., & Martins-Santos, I. C. (2000). Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* **132**, 103–109.

Vicari, M. R., Noleto, R. B., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (2008). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 173-179.

Vidotto, A. P., Swarça, A. C., Fenocchio, A. S. & Dias A. L. (2004). Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity* **95**, 517-520.

Vissotto, P. C.; Foresti, F. & Oliveira C. (1997). A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia* **62**, 61-66.

Vissotto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* **3**, 1-7.

Vissotto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C., 2001. Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Science* **5**, 97-103.

Weitzman, S. H.; & Malabarba, L. R. (1998). Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S., ed.). pp. 161–169. Porto Alegre: EDIPUCRS.

Weitzman, S. H., Menezes, N. A., Evers, H. G. & Burns, J. R. (2005). Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **3**, 329-360.

Wheeler, A. P., Angermeier, P. L. & Rosenberger, A. E. (2005). Impacts of new highways and subsequent landscape urbanization on stream habitat and biota. *Reviews in Fisheries Science* **13**, 141–164.