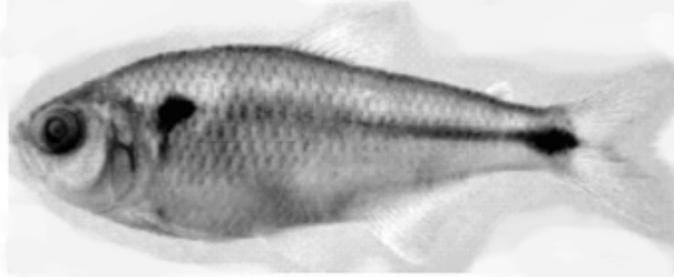


DANIEL LUIS ZANELLA KANTEK

**ESTUDO CITOGENÉTICO COMPARATIVO ENTRE POPULAÇÕES
DE UMA ESPÉCIE DE *Astyanax* (CHARACIDAE,
TETRAGONOPTERINAE) ENDÊMICA DO RIO IGUAÇU.**



Dissertação apresentada como requisito parcial à concessão do título de mestre em Genética no Programa de Pós-Graduação em Genética – Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari.

CURITIBA

2005

O caminho para a sabedoria?
Bem, é simples explicar:
Erre, erre e erre de novo
Mas cada vez menos, menos e menos
-Piet Hein

AGRADECIMENTOS

O meu ingresso e interesse na área de citogenética animal deve-se à oportunidade fornecida pela Profa. Dra. Marta Margarete Cestari. Agradeço a eles pelos ensinamentos, pela paciência e pelo convívio durante os cinco anos em que estive no laboratório. Sem isto não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço também ao professor Prof. Dr. Alberto Sérgio Fenocchio, um dos principais responsáveis pela minha formação científica.

Aos membros banca avaliadora: Prof. Dr. Alberto Sérgio Fenocchio, Prof. Dr. João Carlos Magalhães e Prof. Dr. Roberto F. Artoni, pelas sugestões e correções que melhoraram em muito a qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR pelo auxílio e estrutura oferecidos.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A Vinicius Abilhoa, do Grupo de Pesquisas em Ictiofauna (GPIc) do Museu de História Natural do Capão da Imbuia - Curitiba, pelo auxílio nas coletas, identificação do material e também pela troca de idéias que muito contribuíram para este trabalho.

Aos meus pais, Juan e Iria, pelo apoio e incentivo constantes durante toda minha vida acadêmica.

A todos que passaram e que ainda estão no laboratório de citogética animal da UFPR: Adriano, Andréa, Déborah, Elizabete, Fábio, Fátima, Fernanda, Iris, Ju, Manoela, Marcos, Maria Cláudia, Maria Cristina, Priscila, Rafael (Polly), Rafael, Roger, Roxane, Tavane, Tchacka, Thaynah, Thaís e Wanessa.

Agradecimento especial a Wanessa, pela sua amizade, companheirismo e principalmente às nossas conversas de bar. Você é uma pessoa especial para mim.

Agradecimento especial também ao grande amigo, porém pequeno Adriano, uma das pessoas mais engraçadas que conheci. Nossas conversas me enriqueceram muito.

Ao Roger e Rafael, pelo companheirismo de anos de laboratório e de estradas pelo Nordeste.

A todos os alunos do PPG-Genética – UFPR, pela excelente convivência e principalmente pelas conversas na associação dos professores.

Ao professor Erasto, o qual devo muito de minha formação como biólogo evolutivo.

Aos muitos e grandes amigos do curso de biologia que fiz durante a graduação: Flávia, Micheli, Renato, Felipe, Pedro, Bello, Gil Caveira, Letícia, Bruno, Miodeli, Sardinha, Léo, Barata, Shanna, Virginia, Karin, Priscila, Carol, Cris e muitos outros. Agradecimento especial à Flávia e Gil Caveira, colegas para todos os momentos.

Aos amigos da Água verde, que me acompanham desde minha infância.

A todos que de alguma forma me ajudaram a compreender melhor o pensamento biológico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ASPECTOS GERAIS DA CITOGENÉTICA DE PEIXES	1
1.2. ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE.....	4
1.3. ICTIOFAUNA DO RIO IGUAÇU	7
1.3.1. <i>Astyanax</i> sp.D DO RIO IGUAÇU.....	9
1.4. CITOGENÉTICA DOS PEIXES DO RIO IGUAÇU.....	11
1.5. INVERSÕES CROMOSSÔMICAS POLIMÓRFICAS	15
1.4. VARIAÇÕES ESTRUTURAIS E GENÉTICA DE POPULAÇÕES	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. MATERIAL	20
3.2. MÉTODOS.....	23
3.2.1. OBTENÇÃO DE METÁFASES MITÓTICAS	23
3.2.2. MÉTODO DA COLORAÇÃO CONVENCIONAL – GIEMSA.....	24
3.2.3. BANDAMENTO C	24
3.2.7. FOTOMICROGRAFIA.....	25
3.2.8. IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS.....	25
3.2.9. ANÁLISES POPULACIONAIS.....	26
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO.....	40
5.1. ANÁLISE CARIOTÍPICA.....	40
5.1. ANÁLISE POPULACIONAL DAS FREQUÊNCIAS.....	43
5.1. ANÁLISE POPULACIONAL E CARIOTÍPICA.....	46
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar de <i>Astyanax</i> sp.D.....	20
Figura 2 – Mapa dos locais de coleta. Os números 1, 2 e 3 indicam os locais de amostragens populacionais.....	21
Figura 3 – Locais de coleta: (a) Balsa Nova, (b) Bugre e (c)Lapa....	22
Figura 4 – Histograma representativo das freqüências dos números diplóides da população de <i>Astyanax</i> sp. D de Balsa Nova.....	28
Figura 5 – Histograma representativo das freqüências dos números diplóides da população de <i>Astyanax</i> sp. D do Bugre.....	29
Figura 6 – Histograma representativo das freqüências dos números diplóides da população de <i>Astyanax</i> sp. D da Lapa.....	29
Figura 7 – Cariótipos em Giemsa de <i>Astyanax</i> sp. D provenientes de cabeceiras da margem direita do rio Iguaçu: Balsa Nova (a)(ponto 1) e Bugre (b)(ponto 2) (4M; 24SM; 6ST; 16A), NF=84.....	30
Figura 8 – Cariótipo em Giemsa de <i>Astyanax</i> sp. D proveniente de cabeceira da margem esquerda do rio Iguaçu, município de Lapa (ponto 3)(4M; 24SM; 6ST; 16A), NF=84.....	31
Figura 9 – Cariótipo em Banda – C de <i>Astyanax</i> sp. D.....	32
Figura 10 – Variação inter-individual dos blocos heterocromáticos em <i>Astyanax</i> sp. D da população de Balsa Nova (ponto 1).....	33
Figura 11 – Variação inter-individual dos blocos heterocromáticos em <i>Astyanax</i> sp. D da população do Bugre (ponto 2).....	34
Figura 12 – Variantes polimórficas para Banda C por inversão paracêntrica nos pares 18 e 19.....	34
Figura 13 – Variação inter-individual dos blocos heterocromáticos em <i>Astyanax</i> sp. D da população da Lapa (ponto 3).....	35
Figura 14 - Presença de heterocromatina telomérica nos braços longos dos cromossomos dos pares 1 e 3.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados citogenéticos de peixes do rio Iguaçu.....	12
Tabela 2 – Frequências cromossômicas e valor- P referentes ao equilíbrio de H-W	36
Tabela 3 – Diferenciação “alélica” entre populações de <i>Astyanax</i> sp.D.....	37
Tabela 4 – Diferenciação “genotípica” entre populações de <i>Astyanax</i> sp.D.....	37
Tabela 5 - Estatística- F para os diferentes pares cromossômicos (18 e 19) e localidades estudadas. Os valores de F_{is} não se mostraram significativamente diferente de zero ($\alpha=0.05$).....	38
Tabela 6 – Desequilíbrio gamético entre os pares 18 e 19 referente às localidades estudadas para <i>Astyanax</i> sp. D.....	39

RESUMO

O rio Iguaçu, caracterizado pelo alto endemismo relacionado à ictiofauna, possui pelo menos 8 espécies do gênero *Astyanax*: *A. sp.A*, *A. sp. B*, *A. sp. C*, *A. sp. D*, *A. sp. E*, *A. sp. F* e *A. altiparanae*. A espécie *Astyanax sp. D* vive em cabeceiras de pequenos rios. Foram feitas análises cromossômicas em *A. sp.D* de três populações provenientes de dois riachos da margem direita e um da margem esquerda do alto rio Iguaçu. Nas três localidades, os indivíduos analisados apresentaram um número diplóide modal de 50 cromossomos, distribuídos em 2 pares de cromossomos metacêntricos, 12 de submetacêntricos, 3 de subtelo-cêntricos e 8 de acrocêntricos (NF=84). Não foi detectado dimorfismo sexual cromossômico. Dentro de todas as populações foi verificada uma variação interindividual com relação ao número e localização de bandas heterocromáticas. Ao comparar os blocos C positivos das três localidades, estes se mostraram semelhantes. Através da mensuração das variações cromossômicas estruturais (inversões paracêntricas) identificadas pelo bandamento C, foi possível obter freqüências “alélicas” e “genotípicas” de dois pares cromossômicos polimórficos (18 e 19), sendo que cada par possui dois morfotipos. As freqüências, em todas as localidades, se mostraram concordantes com as proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando comparadas, as populações apresentaram freqüências “alélicas” e “genotípicas” estatisticamente similares, evidenciando semelhanças populacionais. A estatística-*F* foi usada para descrever uma possível estruturação entre as populações. Os valores obtidos através da análise de F_{st} referente a dois pares cromossômicos polimórficos indicam que não há estruturação populacional, e que as populações provavelmente se comportam como uma só.

ABSTRACT

Iguaçu river, characterized by the high endemism related to its ictiofauna, has at least eight species of the *Astyanax* genus: *A. sp. A*, *A. sp. B*, *A. sp. C*, *A. sp. D*, *A. sp. E*, *A. sp. F* and *A. altiparanae*. The *Astyanax sp. D* lives in headwaters of small rivers. A karyotypic analysis were made on three populations of *A. sp. D* from two rivers from the right and one from the left banks of the upper Iguaçu river. In the three localities, the analyzed individuals presented a diploid modal number of 50 chromosomes, arranged in two pairs of metacentric chromosomes, 12 submetacentrics, three subtelocentrics and eight acrocentrics (NF=84). No sexual chromosome system dimorphism was detected. It was verified, within all the populations, an interindividual variation on the number and position of the heterochromatic block. The positive C blocks from the three localities were similar. Through the measurement of the structural variation (paracentric inversions) indentified by the C banding, it was possible to obtain "allelic" and "genotypic" frequencies from two polymorphic chromosomes (18 and 19), and each pair has two morphotypes. The frequencies, on all localities, are in accord with the proportions expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. When compared, the population presented "allelic" and "genotypic" frequencies statistically similar, evidencing populational similarities. The F -statistics was applied to describe a possible structuration between the populations. The numbers obtained through F_{st} , referring to two polymorphic chromosomic pairs, indicate that there is no populational structuration, and that all the populations behave as one.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DA CITOGENÉTICA DE PEIXES

A partir da segunda metade do século XIX, iniciaram-se os estudos citogenéticos onde certas características cromossômicas poderiam individualizar algumas espécies de animais e vegetais. Entretanto, o número e a morfologia cromossômica só foram utilizados como instrumentos de apoio à taxonomia de peixes quando puderam ser comparados entre diferentes espécies, ou entre populações da mesma espécie (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978).

Segundo GUERRA (1988), as análises citotaxonômicas contribuem para o estudo da evolução pelo fato do material genético estar contido nos cromossomos. Portanto, alterações dessa natureza são quase sempre significativas para poder inferir o rumo evolutivo das espécies. Os dados citogenéticos mais utilizados na citotaxonomia são o número cromossômico, a morfologia dos cromossomos e o padrão de bandas, bem como a quantidade, a posição e o heteromorfismo das RONS e o comportamento meiótico dos cromossomos.

Os primeiros estudos citogenéticos em peixes foram publicados por RETZIUS e KASTSCHENKO em 1890 (apud DENTON, 1973); contudo, até a descoberta da aplicação dos tratamentos hipotonizantes para estudo das células em divisão, pouco foi feito nesta área. Somente após o início da década de 60, os trabalhos em citogenética de peixes puderam apresentar dados precisos a respeito do número e da forma dos cromossomos.

O desenvolvimento geral da citogenética de peixes tem sido bastante grande nas últimas décadas, entretanto, segundo GOLD et al. (1990), o número de cromossomos e/ou cariótipos são conhecidos para menos de 10% das mais de 25.000 espécies de peixes existentes.

A citotaxonomia de peixes ainda pode apresentar dificuldades em classificar espécies de ampla distribuição. O gênero *Astyanax*, particularmente *Astyanax scabripinnis*, tem mostrado ampla diversidade cariotípica interpopulacional e variedade no número diplóide, $2n=46$, 48 ou 50 (MORELLI et al.,1983; MARTINS et al.,1984; MAISTRO, 1991; SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; entre outros). Diferentes padrões de bandas cromossômicas também foram observados (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO , 1991; MAISTRO, 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr, 1996; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; entre outros), sugerindo que este táxon pode ser um complexo de espécies denominado por MOREIRA-FILHO e BERTOLLO (op. cit.) como “complexo” *scabripinnis*.

Estudos citogenéticos têm revelado a presença de alguns cromossomos adicionais não homólogos no complemento, sendo denominados de supranumerários ou cromossomos B. Cromossomos supranumerários ocorrem em frequências variáveis em diferentes espécies e populações de plantas e animais e podem ser instáveis durante a mitose e/ou a meiose (JONES, 1991). Em peixes neotropicais, cromossomos B foram detectados pela primeira vez em *Prochilodus lineatus* (PAULS; BERTOLLO, 1983). Após este estudo inicial eles foram descritos em muitas famílias, dentre elas a família Characidae (MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997; entre outros), a qual pertence o gênero *Astyanax*.

A ictiofauna de águas continentais da região neotropical foi quantificada por SCHAEFER (1998) em aproximadamente 8.000 espécies. Dentre estas apenas 921 espécies pertencentes a 252 gêneros e 44 famílias já foram cariotipadas. O número e/ou a localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram descritos para 821 espécies e/ou populações, variando de 1 a 13 pares de cromossomos portadores destes marcadores (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000). Estudos realizados em certos grupos de peixes mostram que em diversas bacias ou diferentes

tributários pode-se encontrar espécies citogeneticamente distintas, embora a taxonomia tradicional em alguns casos não acompanhe estas observações (BERTOLLO et al., 2000).

Evidências ou sinais de alguns processos de diferenciação cariotípica envolvidos na evolução desses animais têm sido obtidos por outros meios como análises numéricas, quantitativas e de variabilidade de localização de regiões heterocromáticas e das RONS (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALLETTI Jr., 1984).

A citogenética de peixes tem realizado estudos, principalmente, através de técnicas convencionais, como Giemsa, banda-C e Ag-RONs. Muitas destas informações vêm sendo interpretadas com um enfoque evolutivo, representando uma boa ferramenta para a sistemática e evolução de diversos grupos de peixes (BERTOLLO et al., 1978; MOREIRA-FILHO et al., 1991, GALETTI et al., 1998). Recentemente, métodos mais apurados como corantes fluorescentes (MAYR; RÀB; KALAT, 1985, ARTONI; MOLINA; BERTOLLO, 1999), enzimas de restrição (ERs)(SÁNCHEZ et al., 1991; HARTLEY, 1991; MAISTRO, 1996; SWARÇA; CAETANO; DIAS, 1999, DA SILVA CORTINHAS, M.C. et al., 2003, entre outros) e hibridação *in situ* (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VASQUEZ, 1994; GALETTI Jr. et al., 1995; entre outros) tem fornecido contribuições importantes para o entendimento da composição e estrutura dos cromossomos.

1.2. ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE

A família Characidae quando comparada com as demais famílias da ordem Characiformes é a maior e a mais complexa, nela estão peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Espécies pertencentes a esta família ocorrem em praticamente todos os ambientes de água doce e distribuem-se nos continentes americanos, desde a fronteira México-Estados Unidos até o Sul da Argentina, e africano (LUCENA, 1993). Segundo FROESE e PAULY (2004), esta família possui 1406 espécies.

Os peixes da família Characidae, geralmente apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e incluem a maioria dos peixes de escamas bem conhecidos pelos brasileiros, como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, entre outros. Estes variam de tamanho desde 2 cm, como os pequiras, até mais de um metro, como o dourado (BRITSKI, 1972).

O grande número de espécies incluídas nessa família, associado à imensa variedade de formas que ela comporta, tem dificultado proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro dela, de modo que os estudos das relações de parentesco com as demais famílias de Characiformes têm sido muito prejudicadas devido a dúvidas sobre o monofiletismo da família Characidae (LUCENA, 1993). Segundo WEITZMAN e FINK (1983), a referida família é um vasto grupo de peixes completamente heterogêneo e aparentemente polifilético. Os estudos citogenéticos na família Characidae tiveram seu início com POST (1965)(apud DANIEL-SILVA, 1996), que relatou os números cromossômicos para várias espécies. FALCÃO (1988) relacionou 135 espécies cujos números haplóides e/ou diplóides já eram conhecidos, evidenciando uma extensa variabilidade cromossômica compreendida entre $2n=28$ para

Hemigrammus (SCHEEL,1973) e $2n=64$ para *Serrasalmus holandi* (MURAMOTO; OHNO; ATKIN, 1968). A maioria das espécies, no entanto, mostra um valor compreendido entre $2n=48$ e 54 cromossomos (OLIVEIRA et al., 1988). Os Characidae apresentam uma variabilidade de número e forma cariotípica tanto entre espécies de um mesmo gênero (MORELLI et al.,1983; FALCÃO et al., 1984), como entre populações da mesma espécie (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). Apesar da diversidade cariotípica desta família, ela apresenta uma característica citotaxonômica importante que, em geral, tem se mantido constante na maior parte das espécies estudadas até o momento, ou seja, o primeiro par de cromossomos é um metacêntrico grande que se destaca dos outros metacêntricos (SCHEEL, op.cit.; MORELLI et al.,1983; entre outros).

Estudos citogenéticos têm demonstrado que algumas subfamílias de Characidae apresentam um cariótipo com tendências evolutivas conservativas quanto a macroestrutura, como é o caso, por exemplo, das subfamílias Salmininae (MARCO, 1986) e Bryconinae (VASCON; PILEGGI; MOREIRA-FILHO, 1984). Entretanto, outras subfamílias têm demonstrado grande diversidade cromossômica junto a consideráveis problemas taxonômicos, como é o caso dos Serrasalminae (AREFJEV, 1990a; CESTARI; GALETTI Jr., 1992), Cheirodontinae (AREFJEV, 1990b; WASKO; GALETTI Jr., 1994) e Tetragonopterinae (PORTELA; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 1988).

A subfamília Tetragonopterinae, dentre os Characidae, é um grupo bastante diversificado, com muitos gêneros e espécies, podendo ser encontradas ao longo da América do Sul e da América Central. São conhecidos como lambaris na região Sul, e como piabas na região Central (BRITSKI, 1972). Compreende gêneros pobremente definidos morfológicamente e provavelmente não é um grupo monofilético (PORTELA; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 1988). Por esta razão, acredita-se que estudos citogenéticos mais aprofundados possam

auxiliar de maneira importante numa melhor definição das relações taxonômicas e evolutivas deste grupo.

O gênero *Astyanax* (Tetragonopterinae) tem recebido atenção especial por parte de alguns pesquisadores devido às suas características biológicas e citogenéticas, existindo casos onde diferentes populações de uma mesma espécie tem mostrado diferenças morfológicas e citogenéticas. O referido gênero mostra ampla variabilidade cariotípica, sendo observados desde $2n=36$ em *A. schubarti* (MORELLI et al., 1983), até $2n=50$ em outras espécies do gênero (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995). Variações no número diplóide também foram detectadas para uma mesma espécie de *Astyanax*, como é o caso de *A. fasciatus* (MORELLI et al., 1983; JUSTI, 1993; HERAS, 1998) e *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO, 1989; entre outros)

A posição taxonômica da família Characidae, segundo FINK e FINK (1981), é a seguinte:

CLASSE - Osteichthyes

SUBCLASSE - Actinopterygii

INFRACLASSE - Teleostei

SUPERORDEM - Osthariophysi

SÉRIE - Otophysi

SUBSÉRIE - Characiphysi

ORDEM - Characiformes

FAMÍLIA – Characidae

1.3. ICTIOFAUNA DO RIO IGUAÇU

Com o soerguimento das Cataratas do Iguaçu (70 metros de desnível) ocorrido a aproximadamente 22 milhões de anos (período Oligo-Mioceno), as populações de peixes da Bacia do Iguaçu foram isoladas das do rio Paraná (MDK/CENCO, 1987). Tal fato favoreceu um processo de especiação, que seria responsável pelo considerável grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna. Segundo NELSON e PLATNICK (1981), dois processos distintos devem ser destacados na diversificação da atual fauna da bacia do Iguaçu: vicariância (a ictiofauna atual da bacia descende de uma ictiofauna iguaçuana ancestral que ficou isolada do resto da bacia do Paraná após a formação das cataratas) ou dispersão (a fauna atual descende de espécies ancestrais de outras bacias que dispersaram para o Iguaçu após a formação da barreira).

HASEMAN (1911) (apud SEVERI; CORDEIRO, 1994) estimou a ictiofauna da bacia do Iguaçu em 25 espécies, tendo descrito 11 das mesmas. Outros autores elevaram posteriormente para 35 o número de espécies, sendo 19 endêmicas e 2 exóticas. AGOSTINHO e GOMES (1997), apresentam uma relação de 64 espécies e 37 gêneros para a bacia do rio Iguaçu. Dessas espécies, 22 são descritas originalmente para a bacia, três são exóticas e as 39 restantes dividem-se entre espécies não descritas ou introduzidas de outras bacias, ou ainda identificadas de maneira equivocada. Em um monitoramento da ictiofauna ao longo de três anos, implementado após a inauguração da Hidrelétrica de Segredo, houve um acréscimo de 16 espécies (AGOSTINHO e GOMES, op. cit). Atualmente são conhecidas 84 espécies de Teleostei para a bacia do Iguaçu (INGENITO et al. 2004).

Estudos taxonômicos feitos por SAMPAIO (1988), mostram que existem pelo menos 7 espécies do gênero *Astyanax* no rio Iguaçu, das quais apenas uma está nominada (*Astyanax gymnogenys* = sp A).

As outras receberam a denominação de *Astyanax* sp. B; C, D, E e F. Segundo AGOSTINHO e GOMES (1997), existe mais uma espécie denominada *Astyanax* sp. G. Além disso, GARUTTI e BRITSKI (2000), descreveram a ocorrência de *Astyanax altiparanae* no rio Iguaçu.

1.3.1. *Astyanax* sp. D DO RIO IGUAÇU

Pequenos cursos d'água têm sido objeto de amplos estudos em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (MATTHEWS, 1982; MEFFE & SHELDON, 1988; ANGERMEIER, 1989; MATTHEWS, 1998). Mais suscetível à ação antrópica em função de seu volume reduzido e maior interface com o meio terrestre, estes ambientes estão entre os primeiros a sofrerem impacto no processo de colonização de novas áreas (MENEZES *et al.*, 1990). As comunidades destes pequenos córregos são, em função do regime de chuvas, submetidas a mudanças drásticas nas condições limnológicas, fato que lhes confere complexidade no seu estudo e conseqüente conservação. Estas comunidades são afetadas de modo marcante por mudanças estacionais decorrentes da expansão e contração do ambiente aquático durante as variações climáticas (LOWE-McCONNELL, 1975), sendo que as espécies que vivem nestes ambientes resistem a grandes mudanças nas condições ecológicas, com o ambiente variando de riachos correntosos, durante a época de chuva, a poças isoladas, nas épocas de baixa pluviosidade (UIEDA, 1983).

Para os peixes, este regime estacional reflete-se principalmente em mudanças na alimentação, reprodução e tamanho das populações (LOWE-McCONNELL, 1967). Estas condições levam ao desenvolvimento de uma comunidade peculiar, possivelmente isolada de outros riachos pelas águas mais volumosas dos trechos inferiores de sua bacia, sendo o endemismo uma decorrência provável (BUCKUP, 1999; CASTRO, 1999).

O principal habitat da espécie *Astyanax* sp. D são as cabeceiras do rio Iguaçu (SAMPAIO, 1988) e a distribuição dessa espécie estende-se do alto até o médio rio Iguaçu, onde é considerada rara nas amostragens (AGOSTINHO; GOMES, 1997).

A intensa degradação causada pela ocupação humana na bacia do alto rio Iguaçu, especialmente na Região Metropolitana de Curitiba, aliada aos sucessivos represamentos no seu trecho médio,

criam uma demanda emergencial de informações sobre esta e outras espécies endêmicas. Neste contexto, o presente trabalho visa a obtenção de informações a respeito da biologia de *Astyanax* sp. D em riachos localizados na Região Metropolitana de Curitiba, que contribuam para a elaboração de estratégias de conservação deste ecossistema, visando à preservação da espécie.

1.4. CITOGENÉTICA DOS PEIXES DO RIO IGUAÇU

Os estudos citogenéticos em peixes do rio Iguaçu são ainda incipientes. A maioria dos dados ainda provém de resumos publicados em anais de simpósios e congressos. Segundo INGENITO *et al.* (2004), das 81 espécies reconhecidas atualmente para o rio Iguaçu, apenas 34 já foram estudadas citogeneticamente (Tabela 1). Entretanto, este número é provavelmente um pouco maior, pois em alguns trabalhos, os indivíduos não foram identificados ao nível específico, ou o organismo ainda carece de descrição taxonômica.

A exemplo de outras bacias, os dados citogenéticos de várias espécies evidenciam problemas taxonômicos. Como exemplo, podemos citar as espécies do gênero *Astyanax*: *A. altiparanae*, *A. sp.C* e *A. sp.B* possuem cariótipos e/ou bandamentos diferenciados entre as diversas populações, fato que poderia estar isolando-as reprodutivamente.

SAMPAIO (1988), ao analisar morfologicamente a espécie *Astyanax sp. D* do alto rio Iguaçu a considerou próxima de *Astyanax scabripinnis*, a qual representa um ótimo modelo para estudos de evolução cromossômica devido a variabilidade cariotípica e morfológica observada em algumas populações (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

Estudos citogenéticos em *Astyanax sp. D* (KANTEK; 2002) também revelaram um alto grau de similaridade entre *A. sp. D* e *Astyanax scabripinnis*. Dados do mesmo trabalho indicaram a existência de polimorfismos cromossômicos em alguns dos pares de cromossomos homólogos, sendo que algumas destas variações são decorrentes de inversões paracêntricas detectadas pela banda C.

Tabela 1 – Dados citogenéticos de peixes do rio Iguaçu

Espécie	Localidade	2n	NF	Fórmula Cariotípica				crom.B	RON	3n	Ref.
				M	SM	ST	A				
Characiformes											
Characidae											
Tetragonopterinae											
<i>Astyanax altiparanae</i>	São José dos Pinhais (PR)	50	84	8	34	2	6	--	simples	--	1
<i>Astyanax altiparanae</i>	Nova Prata do Iguaçu (PR)	50	88	12	10	16	12	--	múltipla	--	2
<i>Astyanax</i> sp.	--	50	86	6	26	4	14	--	múltipla	--	3
<i>Astyanax</i> sp.B	Nova Prata do Iguaçu (PR)	50	86	12	12	12	14	--	múltipla	--	4
<i>Astyanax</i> sp.B	São Mateus do Sul (PR)	50	86	6	24	6	14	--	simples	--	5
<i>Astyanax</i> sp.B	Reservatório de Salto Segredo (PR)	50	84	6	16	12	16	--	simples	--	6
<i>Astyanax</i> sp.B	Rio Guarani (PR)	50	84/88	6	28 (32)		16 (12)	--	múltipla	--	5
<i>Astyanax</i> sp.B	Reservatório de Salto Caxias (PR)	50	86	6	24	6	14	X	--	--	7
<i>Astyanax</i> sp.C	Rio da Várzea (PR)	50	84	6		28	16	--	múltipla	--	8
<i>Astyanax</i> sp.C	Piraquara (PR)	50	84	4	22	8	16	--	simples	--	9
<i>Astyanax</i> sp.C	São José dos Pinhais (PR)	50	84	4	22	8	16	--	múltipla	--	9
<i>Astyanax</i> sp.D	Rio Bicudo – Alto Iguaçu (PR)	50	84	4	24	6	16	--	--	--	10
<i>Astyanax</i> sp.D	Rio Poço Claro (PR)	50	84	4	24	6	16	--	--	--	10
<i>Astyanax</i> sp.D	Piraquara (PR)	50	84	4	24	6	16	--	múltipla	X	11
<i>Astyanax</i> sp.D	Alto Iguaçu	50	84	4	24	6	16				10
<i>Astyanax</i> sp.E	Rio da Várzea (PR)	50	84	6		28	16	--	múltipla	--	8
<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	São Mateus do Sul (PR)	50	100					--	--	--	12
Acestrorhynchinae											
<i>Oligosarcus longirostris</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	50	80	4	10	16	20	--	simples	--	45
<i>Oligosarcus longirostris</i>	Parque Nacional do Iguaçu (PR)	50	84	6	16	12	16	--	simples, par22, A	--	13
<i>Oligosarcus longirostris</i>	--	50	82	2	20	10	18	--	múltipla	--	14
<i>Oligosarcus longirostris</i>	Rio Guarani (PR)	50	80	4		26	20	--	múltipla	--	15
Galnduloclaudinae											
<i>Mimagoniates microlepis</i>	Rios Piraquara e Pequeno	52	94	12	18	14	8	--	--	--	46
Erythrinidae											
<i>Hoplias malabaricus</i>	São José dos Pinhais (PR)	42	84	24	16(17)	02(01)	--	--	múltipla	--	16
<i>Hoplias malabaricus</i>	Piraquara (PR)	42	84	10	22	--	--	--	múltipla	--	16
<i>Hoplias malabaricus</i>	Palmeira (PR)	42	84	24	18	--	--	--	múltipla	--	17
<i>Hoplias malabaricus</i>	Nova Prata do Iguaçu (PR)	42	84	24	18	--	--	--	múltipla	--	18
Siluriformes											
Auchenipteridae											
<i>Glanidium ribeiroi</i>	Reservatório Salto Caxias (PR)	58	112	28	16	10	4	--	simples, par17, SM	--	19
<i>Glanidium ribeiroi</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	58	116	24	14	12	8	--	simples, par1, M	--	20

Callichthyidae											
<i>Corydoras paleatus</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	44	88		44	--	--	--	múltipla	--	21
<i>Corydoras paleatus</i>	Reservatório Salto Caxias (PR)	44	88		18	24	2	--	múltipla	--	22
<i>Corydoras paleatus</i>	Alto Rio Iguaçu - Curitiba (PR)	44	88	20	24	--	--	--	múltipla	--	23
Pimelodidae											
<i>Pariolius hollandi</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	42	78	22	10	4	6	--	simples, par13, SM	--	24
<i>Pimelodus ortmanni</i>	Palmeira - Alto Iguaçu (PR)	56	--	--	--	--	--	--	simples - SM	--	25
<i>Pimelodus ortmanni</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	56	102	20	12	14	10	--	simples, par18, ST	--	26
<i>Pimelodus ortmanni</i>	Reservatório de Salto Caxias	56	106	24	18	8	6	X	simples, par4, ST	--	27
<i>Pimelodus sp.</i>	Reservatório de Salto Caxias	56	110	24	26	4	2	--	simples, ST	--	28
<i>Pimelodus sp.</i>	Reservatório de Salto Caxias	56	108	30	14	8	4	X	simples, par4, ST	--	27
<i>Rhamdia branneri</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	58	112	30	10	14	4	X	simples	X	29
<i>Rhamdia quelen</i>	Guarapuava (PR)	58	112	36	14	4	4	X	múltipla	--	30
<i>Rhamdia quelen</i>	Alto Iguaçu	58	116	32	16	6	4	X	simples, ST	--	31
<i>Rhamdia sp.</i>	Guarapuava (PR)	58	112	36	14	4	4	X	múltipla		30
<i>Rhamdia voulezi</i>	Guarapuava (PR)	58	112	36	14	4	4	X	simples, par29, A		30
<i>Rhamdia voulezi</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	58	112	30	10	14	4	--	simples, par28, M		32
<i>Steindachneridion sp.</i>	Foz do Jordão (PR)	56	102	20(21)	24(23)	2	10		simples, par24, A	--	33
Trichomyteridae											
<i>Trichomycterus davisii</i>	Três Barras (PR)	54	108	40	12	2	--	--	simples, par2, M	X	34/35
<i>Trichomycterus davisii</i>	Lapa (PR)	54	108	42	10	2	--	--	simples, par2, M	--	36
<i>Trichomycterus stawiarski</i>	Três Barras (PR)	54	108	42	8	4	--	--	simples, par2, M	--	34
<i>Trichomycterus sp.</i>	Três Barras (PR)	54	108	42	10	2	--	--	simples, par2, M	--	34
Loricariidae											
<i>Ancistrus sp.</i>	Salto Segredo (PR)	48	92	18	14	12	4	--	simples, ST	--	37
<i>Ancistrus sp.</i>	Salto Caxias (PR)	50	--		oito citótipos			--	simples, ST	--	37
<i>Ancistrus sp.</i>	Rio Alto Alegre (PR)	50	88	12	14	12	12	--	simples, par21, A	--	38
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio São João (PR)	74	114	8	18	14	34	--	simples	--	39
<i>Hypostomus commersoni</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	68	104	10	18	8	32	--	múltipla	--	39
<i>Hypostomus derby</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	68	102	10	8	16	34	--	múltipla	--	39
<i>Hypostomus myersi</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	74	118	12	14	18	30	--	simples	--	39
Perciformes											
Cichlidae											
<i>Cichlasoma facetum</i>	São Mateus do Sul (PR)	48	58			10	38	--	simples, A	--	40
<i>Crenicichla iguassuensis</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	48	66	2	4	12	30	--	simples, par2, SM	--	41
<i>Crenicichla iguassuensis</i>	Parque Nacional do Iguaçu (PR)	48	66	2	4	12	30	--	simples, par2, SM	--	41
<i>Crenicichla iguassuensis</i>	Reservatório Salto Caxias (PR)	48	56	4			20	--	simples, par1, M	--	42
<i>Geophagus brasiliensis</i>	São Mateus do Sul (PR)	48	54	--	6		42	--	simples, A	--	40
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Reservatório Salto Caxias (PR)	48	52	4			22	--	simples, A	--	43

<i>Tilapia rendalli</i>	Reservatório Salto Caxias (PR)	44	54	10	34	--	simples, SM	--	43		
<i>Tilapia rendalli</i>	--	44	62	--	10	8	26	--	múltipla	--	44

Referências: 1 = KANTEK et al. (2004); 2 = CENCI; MARGARIDO (1999); 3 = FAUAZ; CESTARI; MOREIRA-FILHO (1990); 4 = BARROS; MARGARIDO (1999); 5 = ROBAINA; CESTARI (1998a); 6 = DIAS; JÚLIO Jr. (1996); 7 = FAZOLI et al. (2003); 8 = DALABONA; CESTARI (1995); 9 = KANTEK, FENOCCHIO; CESTARI (2003); 10 = presente trabalho 11 = KANTEK (2002); 12 = ROBAINA; CESTARI (1998b); 13 = CUNHA; PEGORARO; MARGARIDO et al. (2001); 14 = MARTINEZ; JÚLIO Jr. (2003); 15 = CESTARI (1996); 16 = LEMOS et al. (2002); 17 = VICARI; ARTONI; BERTOLLO (2003); 18 = PAZZA; MARGARIDO; JÚLIO Jr.(1999); 19 = RAVEDUTTI; JÚLIO Jr. (2001); 20 = ROMAN; MARGARIDO (2000); 21 = KAVALCO, MARGARIDO (2000); 22 = SANTI; MARTINS-SANTOS (2001); 23 = OLIVEIRA et al. (1993); 24 = ROMAN; MARGARIDO (2002); 25 = TERRENCIO; ALMEIDA; ARTONI (2001); 26 = MARGARIDO, GAVASSO (2000); 27 = MARTINS-SANTOS; BORIN (2004); 28 = SOUZA (2003); 29 = ROMAN; MOREIRA-FILHO (2002); 30 = ABUCARMA; MARTINS-SANTOS (2001); 31 = FENOCCHIO et al. (2003); 32 = MARGARIDO; ROMAN (2000); 33 = SWARÇA et al. (2003); 34 = BORIN; MARTINS-SANTOS (1999)/BORIN; MARTINS-SANTOS (2002); 35 = BORIN; MARTINS-SANTOS (2000) 36 = SATO; FORESTI (2004); 37 = LARA (1998); 38 = TCHAICKA; MARGARIDO (2000); 39 = CASALE et al. (2002); 40 = QUIJADA; CESTARI (1999); 41 = MARGARIDO; ROSA; PEGORARO (2001); 42 = MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS (1999); 43 = MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS (2000); 44 = MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS; PORTELA-CASTRO (2002); 45 = RUBERT; MARGARIDO (2004); 46 = NARDINO et al. (2004). Obs: *Hoplias malabaricus* de São José dos Pinhais (referência 16) e *Steindachneridion* sp. (referência 33) possuem sistema sexual cromossômico.

1.5. INVERSÕES CROMOSSÔMICAS POLIMÓRFICAS

Inversões cromossômicas normalmente são decorrentes de inversões paracentricas (não envolvem o centrômero) (KRIMBAS; POWELL, 1992), as quais têm sido detectadas em estado polimórfico (devido à presença simultânea de cromossomos no estado invertido e não invertido) em diversos grupos taxonômicos, como plantas, insetos, moluscos, mamíferos, répteis e peixes.

Quando as inversões polimórficas foram estudadas pela primeira vez, foi sugerido que as inversões eram provavelmente caracteres “neutros” quanto à seleção natural. Esta verificação logo foi abandonada, quando se verificou que em algumas espécies de *Drosophila*, certas inversões mostram variações regulares de freqüência com a elevação do nível do mar, e alterações sazonais de freqüência, sugerindo que forças seletivas estavam operando (WHITE, 1973).

A base usual do polimorfismo cromossômico em uma espécie é, sem dúvida, a heterose, que é a superioridade adaptativa dos heterozigotos em relação a ambos os homozigotos. As inversões quando em heterozigose, podem diminuir a fertilidade devido à ocorrência de permuta, que neste contexto, pode gerar cromossomos inviáveis na gametogênese. Deste modo, a seleção natural tende a agir em favor da supressão da permuta e assim impedir a formação de gametas inviáveis (WHITE, 1973).

O alicerse da heterose é a coadaptação. O conteúdo alélico em cada tipo cromossômico (invertido e não invertido) evoluiria no sentido da melhor combinação de alelos. A seleção favoreceria a coadaptação ao ponto de formar conjuntos extremamente adaptados em um único cromossomo. Da mesma forma, existiria outra co-adaptação entre cada tipo cromossômico, possibilitando o aumento do valor adaptativo dos indivíduos heterozigotos para a inversão. Esses

conjuntos adaptados não se misturariam devido à supressão da permuta (DOBZHANSKY, 1970). Esse mecanismo têm sido verificado na natureza, principalmente, através dos estudos realizados com *Drosophila*.

Variações nas frequências das inversões podem estar associadas a fatores climáticos como gradientes de altitude e latitude. Fato este que poderia ser decorrente de uma seleção natural agindo nos diversos tipos cromossômicos de acordo com a variável ambiental, a qual muitas vezes varia de um modo não abrupto, propiciando assim o surgimento de polimorfismo cromossômico. Alguns destes rearranjos foram ligados a viabilidade da larva em *Drosophila*, resistência a extremos de temperatura, fecundidade, tamanho do corpo e outros traços (HOFFMAN; SGRÒ; WEEKS, in press).

Entretanto, numerosos casos de sistemas polimórficos derivados destas inversões ainda estão por ser desvendados e melhor compreendidos.

1.6. VARIAÇÕES ESTRUTURAIS E GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Variações heterocromáticas entre cromossomos homólogos são raramente descritas na literatura. Em peixes a verificação desta variação em nível populacional é pouco freqüente, provavelmente devido às dificuldades técnicas de repetição da metodologia com boa qualidade, e muitas vezes, pelo número reduzido de animais amostrados.

Indivíduos da espécie *Astyanax* sp.D se mostram como um bom modelo para o estudo destas variações. Além de serem abundantes em alguns rios, estes organismos apresentam inversões paracêntricas em dois pares cromossômicos, as quais foram identificadas pelo bandamento C (KANTEK; 2002). Desta maneira, torna-se possível a verificação de freqüências “genotípicas” e “alélicas” e das demais previsões teóricas provenientes da genética de populações, como o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Sendo isto possível graças a utilização de cada morfotipo cromossômico homólogo como um “alelo”, já que cromossomos e alelos se comportam de uma maneira muito parecida do ponto de vista segregacional.

SAMPAIO (1988), ao descrever *Astyanax* sp. D, relatou que esta espécie vive em cabeceiras de pequenos rios, formando pequenas populações isoladas. Fato este que possibilitaria a ocorrência de diferenciações cromossômicas e morfológicas entre as populações.

A estatística F de Wright vem sendo usada para comparar populações de uma mesma espécie. Estimativas de F_{ST} (deficiência de heterozigotos causada pela subdivisão da população), F_{IS} (deficiência de heterozigotos causada pela não aleatoriedade dos cruzamentos no interior dos demes) e F_{IT} (coeficiente de endocruzamento total da metapopulação devido às duas causas) têm

sido largamente usadas para mensurar estruturas populacionais e desvios de panmixia. A verificação de estruturação genética em populações naturais pode ser feita a partir das variâncias das frequências alélicas (WRIGHT, 1978) ou pela perda de heterozigiosidade das subpopulações em relação a heterozigiosidade total (NEI, 1973). O coeficiente total de endocruzamento (todas as populações em conjunto = metapopulação) é dado por F_{IT} , e pode variar de +1,0 a -1,0, com valores negativos indicando excesso de heterozigotos e positivos indicando deficiência de heterozigotos. Desvios de F_{IT} de zero significam um afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando que a população está estruturada (subdividida) e/ou existe endocruzamento no interior dos demes. A contribuição relativa de cruzamentos preferenciais no interior dos demes é mensurada por F_{IS} através da comparação da proporção de heterozigotos observados nas subpopulações com o número esperado de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Desvios positivos do equilíbrio indicam ocorrência de endocruzamento no interior dos demes. A diferenciação relativa das subpopulações é mensurada pelo F_{ST} , o qual pode variar de 0 a 1,0. Este valor representa a deficiência de heterozigotos causada pela subdivisão, e pode ser usado como parâmetro para verificar diferenças populacionais. Grandes valores de F_{ST} indicam grandes diferenças entre as subpopulações.

Possuidora de variações cromossômicas estruturais passíveis de mensurações e de uma sugerida estrutura populacional devido ao isolamento de subpopulações em pequenos rios, a espécie *Astyanax* sp. D demonstra potencial para a aplicação da estatística F , a fim de verificar tal estruturação.

2.OBJETIVOS

- Caracterizar cariotipicamente diferentes populações de *Astyanax* sp.D do alto rio Iguaçu, através da utilização de coloração convencional e bandamento-C.
- Verificação da possibilidade da utilização de previsões teóricas advindas da genética de populações (equilíbrio de Hardy-Weinberg e diferenciação genética entre populações) nas variações estruturais cromossômicas encontradas em *Astyanax* sp. D.
- Discutir os resultados obtidos comparando-os com os encontrados na literatura para peixes neotropicais.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.MATERIAL

Foram estudadas três populações de *Astyanax* sp. D (Figura 1), coletadas em Balsa Nova (ponto 1, 22J0635133/7171020 – rio Bicudo, margem direita do rio Iguaçu)(41 indivíduos, 4 machos e 37 fêmeas), Bugre (ponto 2, 22J0635327/7179957 – rio Poço Claro, margem direita do rio Iguaçu)(44 indivíduos, 12 machos e 32 fêmeas)(figura 3) e em Lapa (ponto 3, 22J0633551/7166935 - riacho sem nome localizado na margem esquerda do rio Iguaçu)(33 indivíduos, 12 machos e 21 fêmeas) (Figuras 2 e 3).

As distâncias geográficas (aproximadas) entre os pontos de coletas são:

ponto 1 – ponto 2 = 16,5 km

ponto 1 – ponto 3 = 12,8 km

ponto 2 – ponto 3 = 29,3 km

Figura 1 – Exemplar de *Astyanax* sp.D

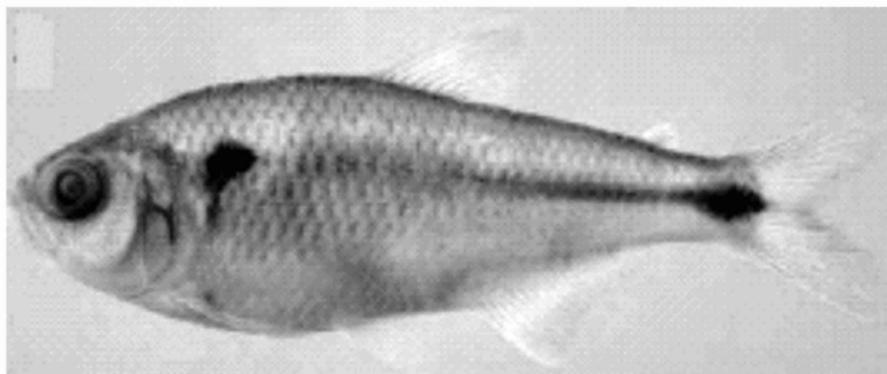


Figura 2 – Mapa dos locais de coleta. Os números 1, 2 e 3 indicam os locais de amostragens populacionais.

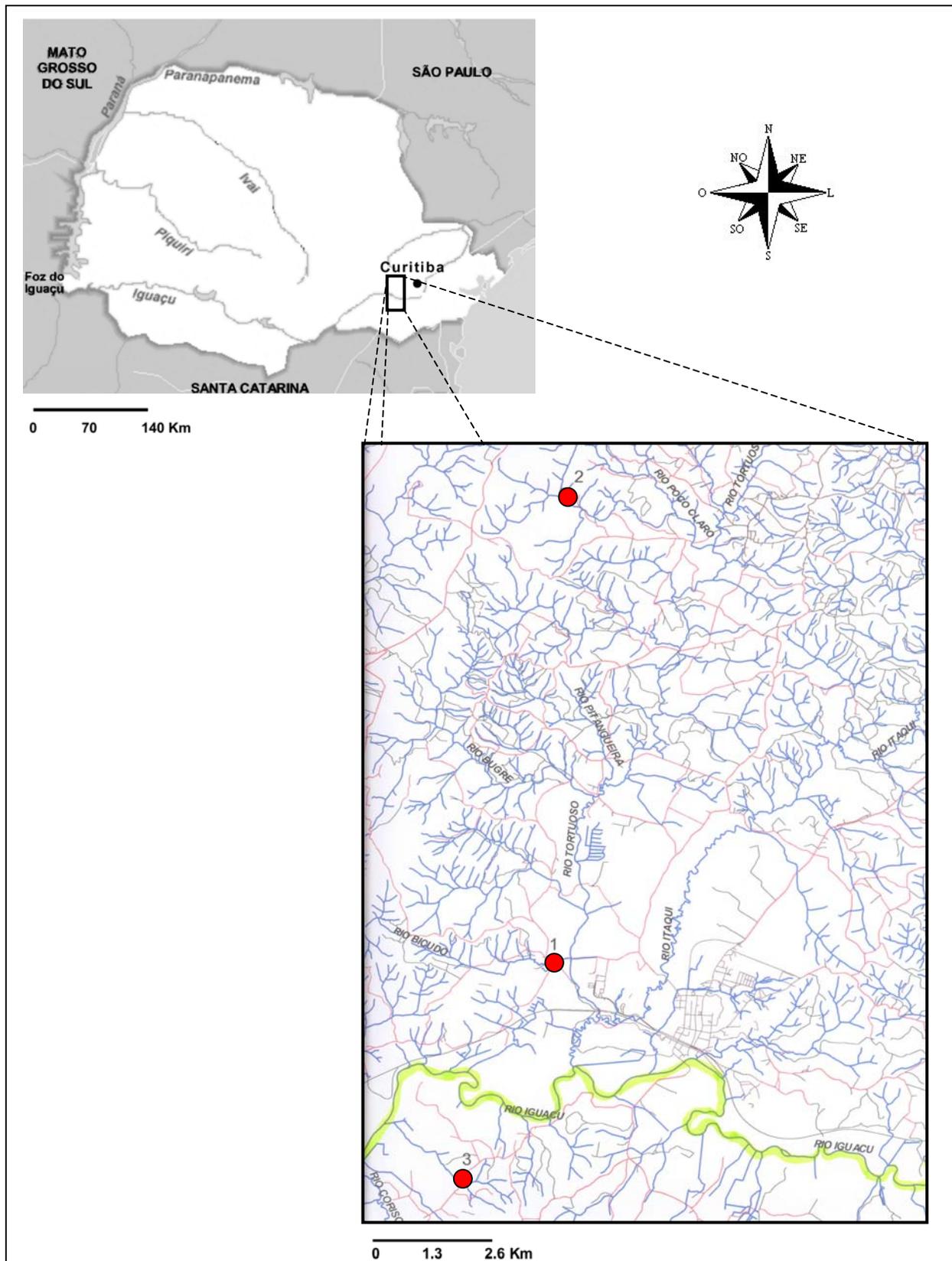
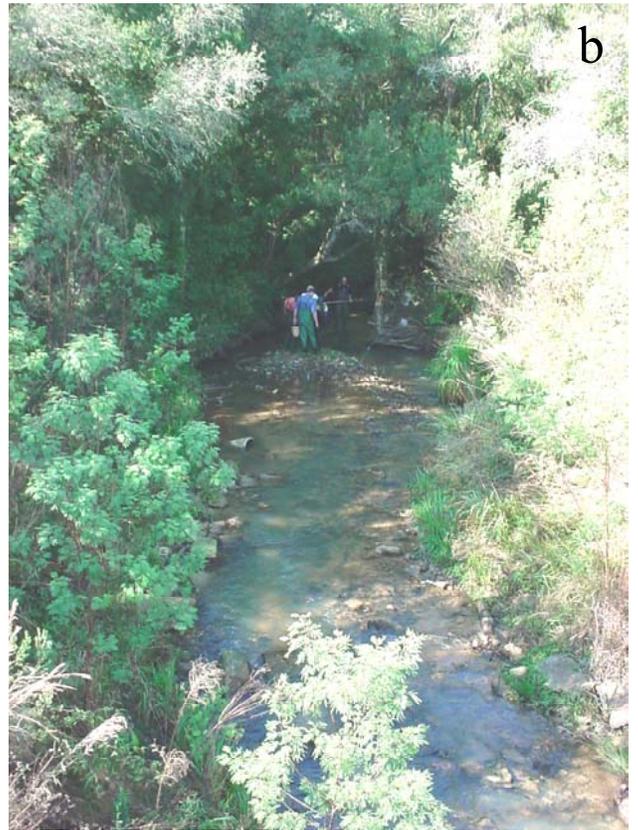


Figura 3 – Locais de coleta: (a) Balsa Nova, (b) Bugre e (c) Lapa.



3.2.MÉTODOS

3.2.1.OBTENÇÃO DE METÁFASES MITÓTICAS

Antes do sacrifício dos animais, os mesmos foram anestesiados com MS222.

As preparações foram obtidas com a porção anterior do rim, através da utilização do método de cultura de tecidos sólidos de curto tempo, descrito por FENOCCHIO et al. (1991), com algumas modificações:

- Foram retiradas as porções anterior e posterior do rim (aproximadamente 3 mm³) e transferida para uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal.
- O material foi desagregado com pinças de ponta fina com posterior asperção e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha.
- A suspensão de células obtida foi então incubada em estufa a 29°C por 6 a 7 horas em média.
- 25 minutos antes de completar o tempo, pingou-se 3 gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. A placa de Petri foi então gentilmente agitada para homogeneizar o material e este mantido em estufa até o tempo final.
- Passado este tempo, a cultura foi interrompida e transferida para um tubo de ensaio que foi centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- O sobrenadante foi descartado e completa-se o tubo de ensaio até 8ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). A solução foi ressuspendida e ficou por cerca de 30 minutos a uma temperatura de 37°C.

- O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração. Dado o tempo da hipotonização, foram pingadas algumas gotas do fixador em cada tubo. Foi feita a ressuspenção do material até ficar homogêneo, e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- O sobrenadante foi descartado e em seguida o tubo foi completado com fixador até o volume de 8 ml. Novamente o material foi ressuspendido e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- A etapa anterior foi repetida por duas vezes.
- Descartado o sobrenadante, 1,5 ml de fixador foi colocado e o material foi ressuspendido. Esta solução foi então armazenada em tubo do tipo Eppendorf em freezer à -20°C .

3.2.2.MÉTODO DA COLORAÇÃO CONVENCIONAL – GIEMSA

Para análise do número e morfologia dos cromossomos, as lâminas foram colocadas sobre um Becker em um banho Maria a 60°C . A suspensão de células foram gotejadas sobre as lâminas. Após serem secas ao ar, as lâminas foram coradas com Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) a 5%. O corante ficou sobre a lâmina por aproximadamente 10 minutos e em seguida foi retirado em água corrente e secas ao ar.

3.2.3. BANDAMENTO C

Os estudos de heterocromatina constitutiva foram realizados em todos os indivíduos das três amostras, segundo a técnica de SUMNER (1972) com pequenas modificações, descrita como se segue:

- A lâmina pingada no dia foi colocada em solução de HCl 0,2N em temperatura ambiente por 15 minutos;
- Em seguida a lâmina foi lavada com água destilada e deixada secar ao ar;
- A lâmina foi colocada em solução de Hidróxido de Bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 45°C por aproximadamente 2 minutos;
- A lâmina foi rapidamente colocada no HCl 0,2N para retirar o excesso de bário e após isso foi lavada com um jato de água destilada;
- Em seguida a lâmina foi colocada em uma solução de 2xSSC (15,53g de NaCl + 8,82g de Citrato Trissódico + Água deionizada) durante uma hora à 60°C ;
- Decorrido este tempo a lâmina foi lavada em água destilada e deixada secar ao ar;
- A lâmina foi corada com Giemsa diluído a 10% em tampão fosfato pH 6,8 durante 20 minutos.

3.2.4. FOTOMICROGRAFIA

As metáfases que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram analisadas, em sua maior parte através de captura eletrônica de imagens, utilizando-se o programa BandViewTM Expo 2.0.

3.2.5. IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS

Após a escolha das melhores metáfases para a montagem dos cariótipos, a ordenação dos pares cromossômicos foi feita em ordem decrescente de tamanho, as medidas cromossômicas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro para a determinação da

relação entre os braços. A classificação dos cromossomos conforme os valores da relação de braços (RB) foi estabelecida segundo LEVAN, FREGDA e SANDBERG (1964):

Metacêntricos (M)	RB= 1,00 a 1,70
Submetacêntricos (SM)	RB= 1,71 a 3,00
Subtelocêntricos (ST)	RB= 3,01 a 7,00
Acrocêntricos (A)	RB= maior do que 7,01

3.2.6. ANÁLISES POPULACIONAIS

As inversões foram quantificadas segundo o morfotipo cromossômico nos pares 18 e 19, utilizando a seguinte classificação: Par 18, ausência da inversão – A¹⁸, presença da inversão – P¹⁸; Par 19, ausência da inversão – A¹⁹, presença da inversão – P¹⁹. A fim de identificar com maior precisão as inversões, foram analisadas o mínimo de 8 metáfases por indivíduo de acordo com a qualidade das preparações obtidas. Sendo essa necessidade decorrente da similaridade morfológica entre os pares 18 e 19. O critério adotado para classificar o cromossomo como invertido foi a presença de um largo bloco de heterocromatina intersticial, enquanto que para o não invertido foi a localização telomérica do mesmo. Além de possuírem o largo bloco citado acima, alguns cromossomos portadores da inversão possuem outras bandas heterocromáticas, localizadas nos telômeros abaixo dos largos blocos intersticiais. Na contagem para a obtenção das frequências dos tipos cromossômicos, foi adotada a posição de igualdade entre invertidos sem e com marcas teloméricas. O tratamento das lâminas com a técnica da banda C permitiu a visualização e identificação das marcas heterocromáticas citadas acima.

A verificação das proporções esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos cromossômicos, e o método da

cadeia de Markov para estimar a ausência de alguma tendência do valor- P foi realizado segundo GUO e THOMPSON (1992). A verificação de diferenciação das frequências “alélicas” e “genotípicas” entre as populações foi realizada através do teste probabilístico sugerido por RAYMOND E ROUSSET (1995) e GOUDET et al. (1996), respectivamente. Para descrever a heterogeneidade entre as populações foi usada a estatística- F , sendo que as estimativas de F_{is} , e F_{st} foram empregadas segundo WEIR e COCKERHAM (1984). Os valores referentes ao equilíbrio gamético foram obtidos através do teste exato de Fisher, usando a cadeia de Markov. As análises referidas foram feitas através do programa GENEPOP. A significância estatística dos valores de F_{is} e F_{st} foi obtida de acordo com NEI e CHESSEY (1983).

4.RESULTADOS

Os peixes analisados dos pontos 1, 2 e 3 possuem um número diplóide modal de 50 cromossomos (Figuras 4, 5 e 6) e se mostraram cariotipicamente similares, sendo o cariótipo composto por 2 pares de cromossomos metacêntricos (M), 12 pares de submetacêntricos (SM), 3 pares de subtlocêntricos (ST), 8 de acrocêntricos (A) e um NF=84. Não foi detectado dimorfismo sexual cromossômico (Figuras 7 e 8).

Figura 4 – Histograma representativo das freqüências dos números diplóides da população de *Astyanax* sp. D de Balsa Nova.

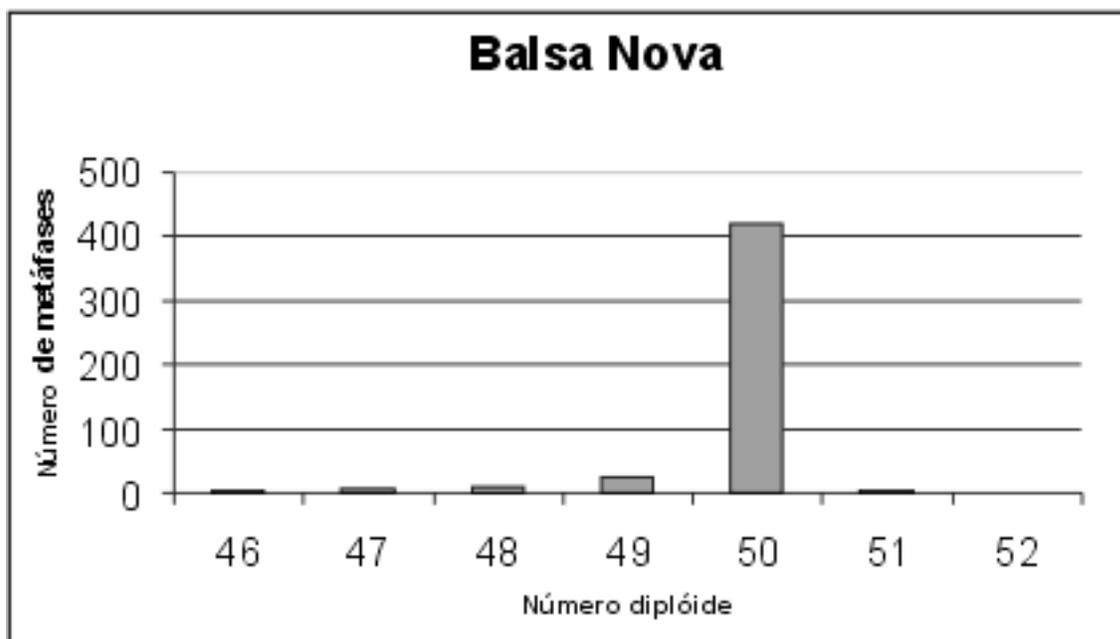


Figura 5 – Histograma representativo das freqüências dos números diplóides da população de *Astyanax* sp. D do Bugre.

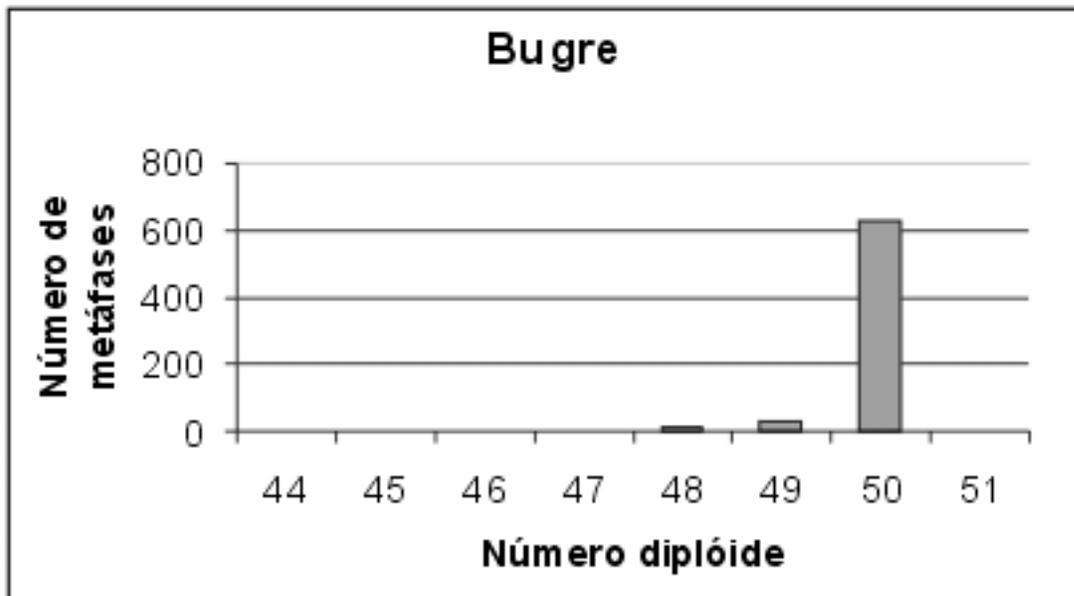


Figura 6 – Histograma representativo das freqüências dos números diplóides da população de *Astyanax* sp. D da Lapa.

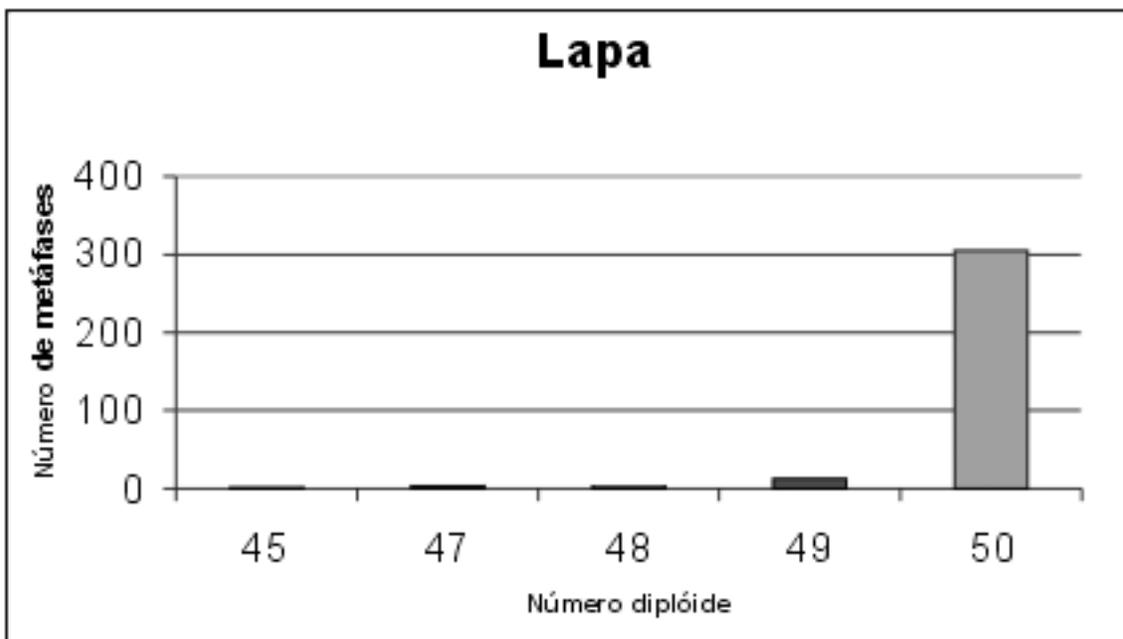


Figura 7 – Cariótipos m Giemsa de *Astyanax* sp. D provenientes de cabeceiras da margem direita do rio Iguaçu: Balsa Nova (a)(ponto 1) e Bugre (b)(ponto 2) (4M; 24SM; 6ST; 16A), NF=84.

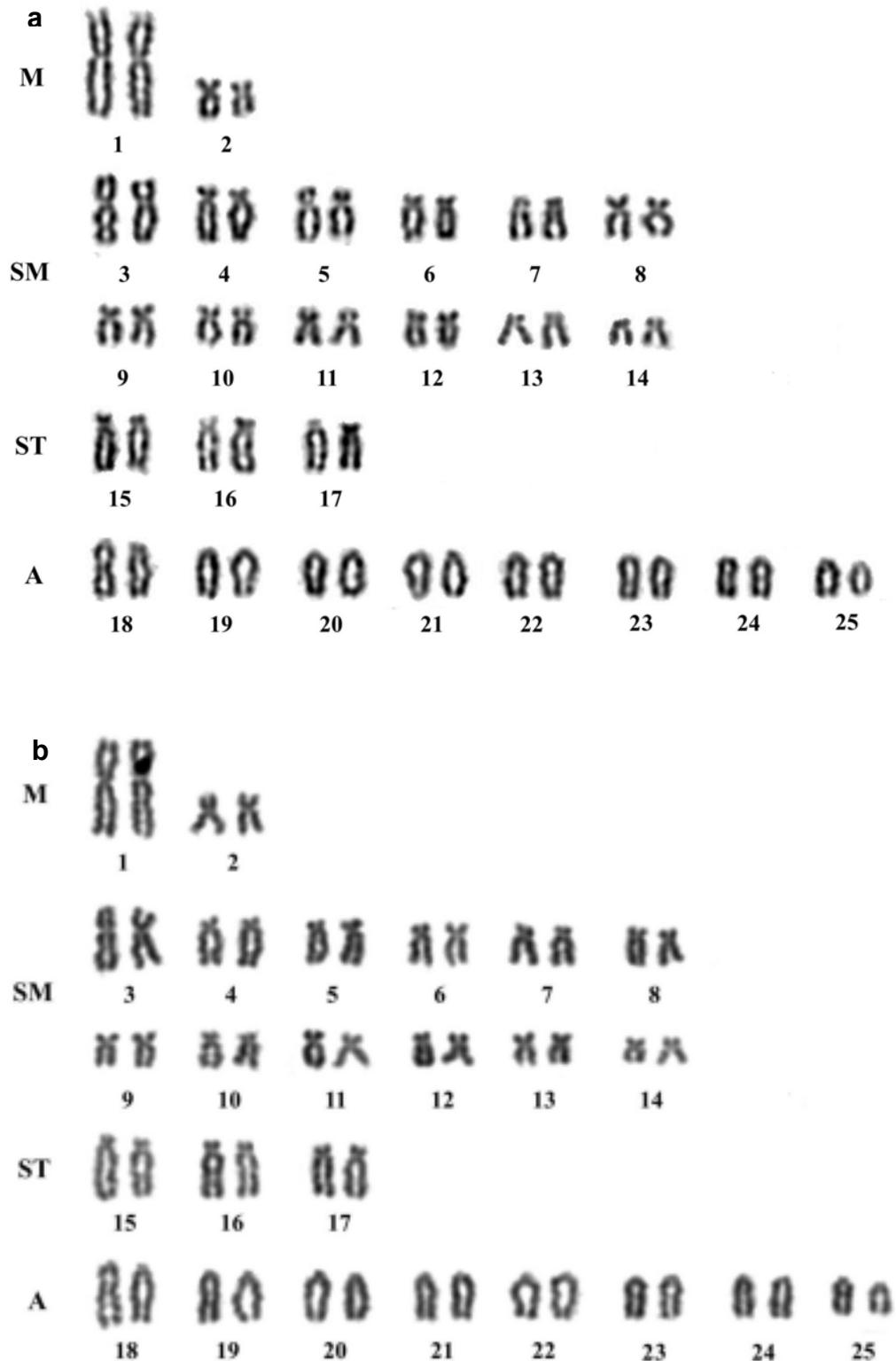
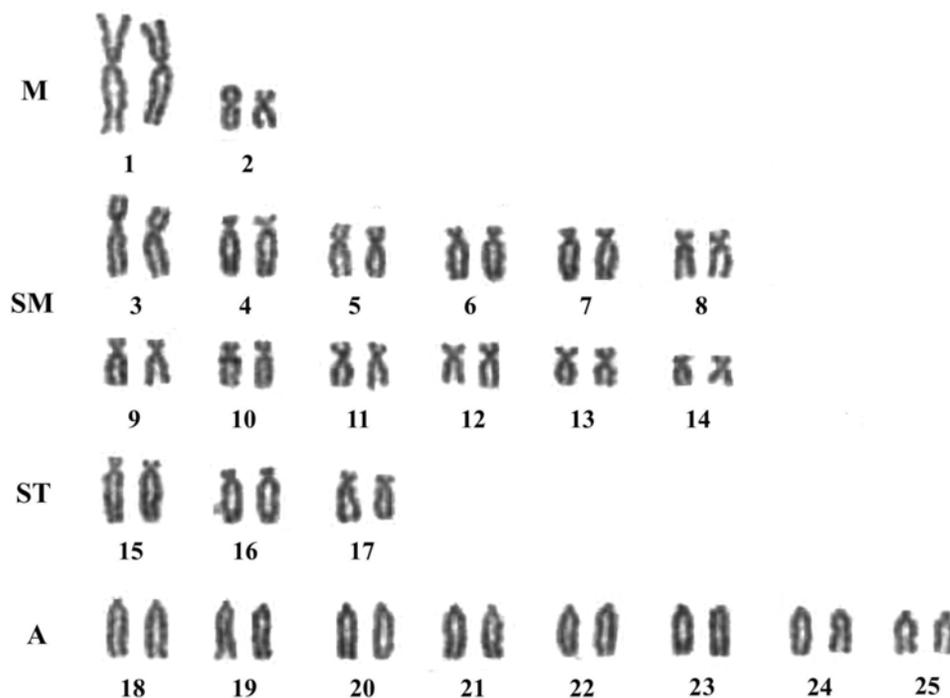


Figura 8 – Cariótipo em Giemsa de *Astyanax* sp. D proveniente de cabeceira da margem esquerda do rio Iguaçu, município de Lapa (ponto 3)(4M; 24SM; 6ST; 16A), NF=84.



Através da análise da distribuição das regiões heterocromáticas evidenciadas pelo bandamento C, foi possível obter um padrão geral para as populações 1, 2 e 3 (Figura 9). Entretanto, dentro de cada população ocorrem variações inter-individuais. Através da comparação entre os cromossomos acrocêntricos de diferentes indivíduos é possível verificar a variação no número e na localização dos blocos heterocromáticos (Figuras 10, 11 e 13). Nestas figuras, onde estão representados apenas alguns dos indivíduos analisados, podem ser visualizadas as inversões paracêntricas que ocorrem nos pares 18 e 19, onde cada letra representa um exemplar diferente.

Nestes observa-se que alguns dos cromossomos dotados de inversões, possuem uma outra banda C positiva telomérica. Em alguns exemplares, foi verificada a presença de heterocromatina no telômero dos braços longos de cromossomos dos pares 1 e 3 (Figura 14).

Figura 9 – Cariótipo em Banda – C de *Astyanax* sp. D.

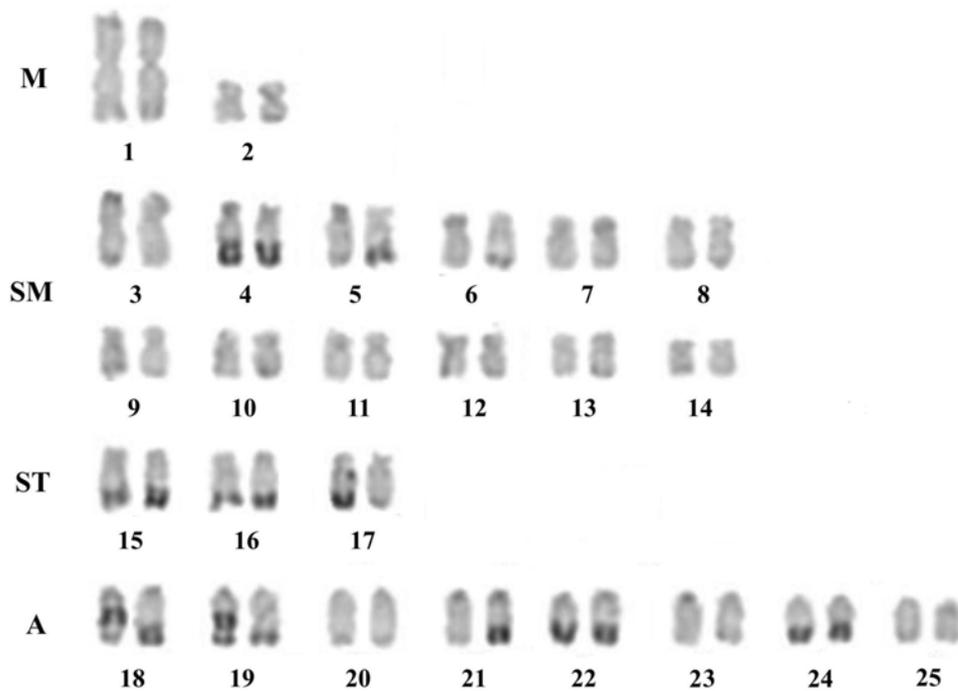


Figura 10 – Variação inter-individual dos blocos heterocromáticos em *Astyanax* sp. D da população de Balsa Nova (ponto 1). Os números representam pares cromossômicos. As letras indicam diferentes indivíduos.



Figura 11 – Variação inter-individual dos blocos heterocromáticos em *Astyanax* sp. D da população do Bugre (ponto 2). Os números representam pares cromossômicos. As letras indicam diferentes indivíduos. Note que o indivíduo “c” possui uma inversão no par 22.



Figura 12 – Variantes polimórficas para Banda C por inversão paracêntrica nos pares 18 e 19.



Figura 13 – Variação inter-individual dos blocos heterocromáticos em *Astyanax* sp. D da população da Lapa (ponto 3). Os números representam pares cromossômicos. As letras indicam diferentes indivíduos.

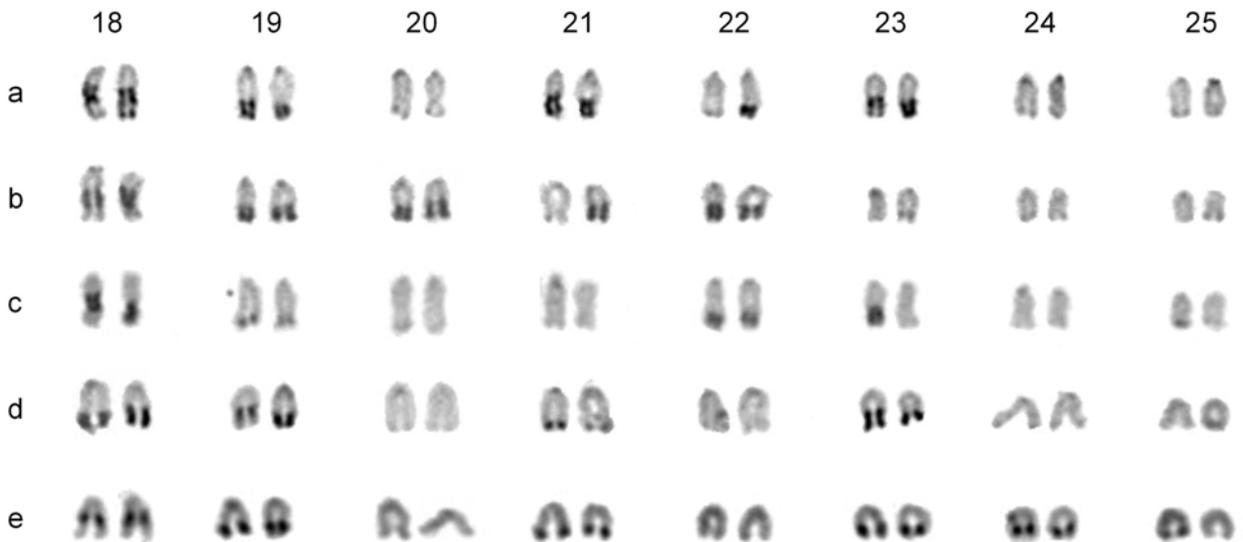
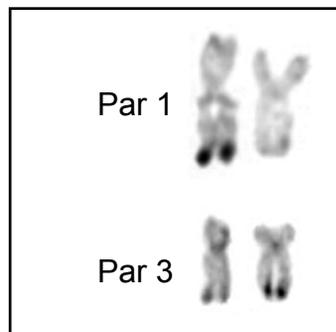


Figura 14 - Presença de heterocromatina telomérica nos braços longos dos cromossomos dos pares 1 e 3.



As análises populacionais permitiram a identificação das freqüências “alélicas” e “genotípicas” referentes aos pares polimórficos. No par 18, o cromossomo do tipo invertido predominou nos pontos 1 ($P^{18}=0,646$ e $A^{18}=0,345$) e 2 ($P^{18}=0,557$ e $A^{18}=0,443$), e no ponto 3 o tipo não invertido predominou ($P^{18}=0,485$ e $A^{18}=0,515$). No outro par (19) a predominância foi de não invertidos nos três pontos: pop. 1: $P^{19}=0,146$, $A^{19}= 0,854$; pop. 2: $P^{19}=0,205$, $A^{19}=0,795$; pop 3: $P^{19}=0,136$, $A^{19}= 0,864$. As análises estatísticas do equilíbrio de Hardy-Weinberg são mostrados na Tabela 2. Nota-se que os genótipos dos dois “loci” das três populações estão nas proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\alpha=0.05$).

Tabela 2 – Freqüências cromossômicas e valor- P referentes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Par	Alelo	Freqüências			Valor- P (H-W)			Total
		B.N.	Bugre	Lapa	B.N.	Bugre	Lapa	
18	P	0.646	0.557	0.485	0.7309	1	0.1623	0.6327
	A	0.354	0.443	0.515				
19	P	0.146	0.205	0.136	1	0.1676	1	0.7343
	A	0.854	0.795	0.864				

B.N. = referente ao município Balsa Nova.

Os testes estatísticos realizados para detectar diferenciação das freqüências “alélica” e “genotípica” entre as populações, nos dois “loci” analisados, demonstraram que não existem diferenças significativas, entre as localidades estudadas ($\alpha=0.05$)(Tabelas 3 e 4).

A estatística- F não detectou estruturação entre as populações. Os valores de F_{st} , os quais indicam uma possível estruturação, não são significativos ao nível de 0.05 (Tabela 5). Segundo estes dados, estaria ocorrendo fluxo gênico entre as populações, e as mesmas estariam se comportando como uma única população. Os resultados obtidos para a mensuração do endocruzamento dentro de cada população (F_{is})(tabela 5) também não são significativamente diferentes de zero ($\alpha=0.05$).

Tabela 5 - Estatística- F para os diferentes pares cromossômicos (18 e 19) e localidades estudadas. Os valores de F_{is} não se mostraram significativamente diferente de zero ($\alpha=0.05$).

Par	F_{st}		F_{is}
18	0.0051	Bugre	0.0444
		Balsa Nova	-0.1082
19	0.0013	Bugre	-0.2464
		Balsa Nova	0.0361
Comb. 18 e 19	0.0037	_____	_____
18	0.0378	Lapa	0.2862
		Balsa Nova	-0.1082
19	-0.0129	Lapa	-0.2462
		Balsa Nova	0.0361
Comb. 18 e 19	0.0212	_____	_____
18	-0.0050	Lapa	0.2862
		Bugre	0.0444
19	0.0055	Lapa	-0.1429
		Bugre	-0.2464
Comb. 18 e 19	-0.0011	_____	_____

A análise de desequilíbrio gamético revelou que a segunda amostra estudada (Bugre – ponto 2) está desequilibrada, diferentemente das outras duas amostras.

Tabela 6 – Desequilíbrio gamético entre os pares 18 e 19 referente às localidades estudadas para *Astyanax* sp. D.

Populações	valor- <i>P</i>
Balsa Nova	0.1024
Bugre	0.0081
Lapa	0.1388

5. DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE CARIOTÍPICA

O número diplóide observado para as amostras de *Astyanax* sp. D aqui estudadas, $2n=50$ cromossomos, é o mais frequente em espécies do gênero *Astyanax*, sendo descrito para *A. bimaculatus* (SCHEEL, 1973; PAGANELLI; GALETTI JR., MOREIRA-FILHO, 1986;), *A. taeniatus* (PAGANELLI, 1990), *A. eigenmanniorum* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994), *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MAISTRO, 1991; SOUZA et al., 1995; entre outros), *A. giton*, *A. parahybae* (KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), entre outras.

Apesar da diversidade cariotípica dos Characidae, *Astyanax* apresenta características básicas da família como o número diplóide de 50 cromossomos e o primeiro par de metacêntricos como o maior do complemento. *Astyanax* sp. D compartilha estas duas semelhanças cariotípicas com outras espécies do gênero.

A ocorrência de inversões paracêntricas em três pares cromossômicos (18, 19 e 22) pode ser considerado como um exemplo de ortoseleção cariotípica. Esta constitui a tendência que o mesmo tipo de alteração estrutural apresenta de ocorrer repetidamente em uma determinada linhagem evolutiva (LACADENA, 1996). Assim, em um determinado táxon, as inversões são particularmente bem sucedidas, como em *Astyanax* sp. D. Em outros, como por exemplo na gimnosperma *Welwitschia mirabilis* do sudoeste da África, o sucesso adaptativo aconteceu no sentido de formar apenas cromossomos acrocêntricos (tipo muito raro nos vegetais) (WHITE, 1973).

O padrão de distribuição de heterocromatina observado para *Astyanax* sp. D pode ser considerado equilocal, ou seja, os blocos C+

observados são eqüidistantes em relação ao centrômero em cromossomos não homólogos do mesmo conjunto cromossômico.

Uma possível explicação para este padrão seria através da dispersão de heterocromatina entre braços de cromossomos não homólogos. Esta proposta é baseada no modelo sugerido por SCHWEIZER e LOIDL (1987), o qual diz respeito a orientação dos cromossomos durante a interfase meiótica (Orientação de Rabl). Esta conformação permitiria a transferência de heterocromatina entre locais eqüidistantes de cromossomos não homólogos.

Em um primeiro momento, antes da ocorrência da inversão, teria ocorrido tranlocação de heterocromatina entre diversos cromossomos, formando os vários blocos C positivos relatados para *Astyanax* sp. D. A semelhança entre os blocos evidenciada por KANTEK (2002) através de enzima de restrição *AluI* e CMA_3 , e o padrão eqüidistante das marcações apóiam a referida hipótese. Outra evidência da transferência de heterocromatina proposta no modelo citado seria a presença de blocos C positivos teloméricos nos cromossomos invertidos. Após o surgimento das inversões, os blocos heterocromáticos teloméricos poderiam transferir heterocromatina ao telômero dos cromossomos invertidos, formando o padrão descrito para alguns indivíduos (Fig. 10 – par 19, Fig. 11 – indivíduos a e f, par 18). Além disso, a presença de heterocromatina telomérica nos pares 1 e 3 de alguns exemplares, seria outro indício da ocorrência de transferência de cromatina entre cromossomos não homólogos.

Bons exemplos de distribuição de heterocromatina equilocal em peixes neotropicais foram primeiramente apresentados por SOUZA *et al.* (1996) e ARTONI e BERTOLLO (1999).

A variação no número e na localização dos blocos C positivos também foi verificada por KANTEK (op. cit.). Uma possibilidade para explicar esta variação seria que algum fenômeno geológico teria dividido a espécie em várias populações isoladas entre si, permitindo

deste modo diferenciações ao nível heterocromático. Em algum momento da história evolutiva recente da espécie, essa barreira teria desaparecido e os indivíduos das várias localidades voltaram a se cruzar, impedindo a ocorrência de um evento de especiação.

Variações climáticas, por ocasião dos períodos glaciais quaternários, influenciaram a distribuição da cobertura vegetal na região da bacia do rio Iguaçu. Elas causaram, em períodos glaciais curtos, a expansão e retração sucessivas, tanto das florestas, quanto das áreas de vegetação aberta. Durante os períodos glaciais, ocorreu a expansão dos núcleos de aridez e semi-aridez (áreas de vegetação aberta) e conseqüente retração das florestas. Durante os períodos interglaciais, ocorreu a expansão das florestas e retração das áreas áridas (AB´SÁBER, 1977; BIGARELLA; ANDRADE-LIMA, 1982; VAN DER HAMMEM, 1974). Essas mudanças paleoclimáticas teriam causado a interrupção da distribuição geográfica contínua de muitos táxons (através da alteração de vários fatores limitantes à distribuição, como: alteração do nível da água, temperatura e composição química da água). A fragmentação de áreas de distribuição geográfica levaria ao isolamento de várias de suas populações. Isto criaria condições propícias a diferenciações locais e mesmo a especiações, dependendo do tempo geológico envolvido (BIGARELLA; ANDRADE-LIMA, 1982; WEITZMAN; WEITZMAN, 1982; LUCINDA, 1995). Essas variações climáticas poderiam ter isolado *Astyanax* sp. D em muitas populações isoladas, favorecendo o surgimento de diferenciações cromossômicas. Atualmente (período interglacial), com a expansão das florestas, aumento da precipitação e diminuição das áreas áridas, o rio Iguaçu teria se tornado menos severo para estes organismos, e assim as populações anteriormente separadas tornaram a se cruzar.

Devido à similaridade entre *Astyanax* sp. D e *Astyanax scabripinnis* proposta por SAMPAIO (1988) e KANTEK (2002), e

considerando-se a intensa variabilidade cariotípica entre populações relatada na literatura para *A. scabripinnis* (KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), esperava-se que, do ponto de vista cromossômico, as populações de *Astyanax* sp. D fossem diferentes entre si. O presente trabalho demonstrou que não existem diferenças entre as populações, as variações são intra-populacionais.

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com os de KANTEK (2002), verifica-se que os cariótipos em Giemsa e banda-C são idênticos. A população analisada por KANTEK (op. cit.) foi coletada em um rio localizado no município de Piraquara, o qual fica a leste de Curitiba. Apesar da grande distância entre as localidades (Bugre, Balsa Nova e Lapa estão à oeste de Curitiba), o padrão cariotípico se repetiu fielmente, inclusive com a presença de inversões e da intensa variação intra-populacional.

5.2. ANÁLISE POPULACIONAL DAS FREQUÊNCIAS

São raros os artigos existentes na literatura que objetivam a mensuração de variáveis cromossômicas em peixes com a finalidade de tratar os dados sob o enfoque da genética de populações. Os principais trabalhos que quantificam variações cromossômicas, como por exemplo as inversões, referem-se ao gênero *Drosophila*. Além deste grupo de organismos, outros taxa como o gênero *Anopheles* e a ordem Ortóptera também têm sido extensamente analisados sob a ótica populacional. Esses estudos revelaram que as frequências, em uma população, dos vários morfotipos cromossômicos estão sob influência da seleção natural. A associação entre mudança gradual nas frequências e fatores climáticos como altitude e latitude fornecem uma indicação de como a seleção natural estaria agindo nestes organismos para “gerar” polimorfismo (HOFFMAN; SGRÒ; WEEKS, in press). Outros modelos para o estabelecimento de polimorfismos

seriam a seleção a favor do heterozigoto (heterose) (DOBZHANSKY, 1970) e a interação entre dois pares cromossômicos polimórficos (LEWONTIN; WHITE, 1960). A manutenção do polimorfismo em *Astyanax* sp. D poderia estar associada a algum destes eventos.

Ao propor como habitat para *Astyanax* sp. D as cabeceiras do Rio Iguaçu, SAMPAIO (1988) possibilita a suposição de que as populações estejam isoladas, de maneira a impedir, pelo menos parcialmente, o fluxo gênico entre elas.

Devido à verificação das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 1) referentes aos dois pares (18 e 19) nas três populações, não foi possível detectar algum tipo de seleção agindo sobre os diferentes estados cromossômicos. Presume-se que os fatores evolutivos não estariam agindo intensamente a ponto de serem detectados. Deve-se atentar ao fato de que o teste aplicado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg pode não detectar seleção se ela não for relativamente intensa.

Em uma população finita onde a seleção natural, a migração e a mutação não estão atuando, as frequências alélicas e genotípicas não permanecerão estáticas de uma geração para outra, pois ocorrem flutuações causais nestas frequências. Qualquer geração de uma população de tamanho N é formada por uma amostra de $2N$ gametas, doados pela geração precedente. Apenas quando $2N$ é infinito os gametas podem representar o conjunto gênico da geração precedente sem distorção. Quando a contribuição gamética parental for finita, ocorrerão flutuações casuais nas frequências, fenômeno este chamado deriva genética, o qual só pode ser previsto quanto à quantidade, jamais quanto à direção (SHORROCKS, 1978).

Ao admitir que não estaria ocorrendo seleção a favor de algum tipo cromossômico, que as inversões não estariam surgindo na população à partir de mutações novas, e que as populações de *Astyanax* sp. D estão isoladas entre si, conclui-se que o principal

fator evolutivo responsável por eventuais flutuações nas freqüências “alélicas” e “genotípicas” seria a deriva genética.

Se as populações de *Astyanax* sp. D estivessem realmente isoladas (ausência de migração), e o rio Iguaçu representasse uma barreira ecológica entre populações de margens opostas, esperaria-se que, devido à imprevisibilidade quanto a direção das possíveis variações decorrentes da deriva genética, cada cabeceira alterasse suas freqüências independentemente uma da outra, permitindo a ocorrência de diferenciação entre populações.

Entretanto, quando as freqüências “genotípicas” e “alélicas” dos dois “loci” em estudo (pares 18 e 19) das três localidades foram comparadas, não foi possível detectar nenhuma diferença estatística, as três amostras possuem freqüências parecidas. Desta constatação conclui-se que o fluxo gênico está ocorrendo e seria o responsável pela similaridade entre as freqüências. A ocorrência de tal fluxo é concordante com a proposta do atual estado de cruzamento entre as populações, hipotetizada na análise cromossômica.

Cabe aqui mencionar a dificuldade na identificação das inversões. Muitas vezes, a classificação correta da inversão, com relação a qual dos pares ela pertence foi dificultada pela similaridade morfológica dos pares cromossômicos analisados (18 e 19). Porém, devido à consciência de tal fato, aqueles organismos que apresentavam dificuldades de identificação nos referidos pares, foram criteriosamente analisados, diminuindo assim, a probabilidade de engano na classificação cromossômica.

A outra metodologia utilizada para detectar algum grau de estruturação foi a estatística- F , e os resultados demonstram que as as três localidades estudadas estão se comportando como uma única população (metapopulação).

Porém, ao observar cuidadosamente as freqüências “alélicas” e “genotípicas”, nota-se que a população da Lapa (3) parece diferir das

outras (tabelas 3 e 4). Mesmo que, estatisticamente, não seja possível diferenciar os peixes das localidades analisadas, a frequência de cromossomos invertidos no par 18 é consideravelmente menor na amostra da população da margem esquerda. Seria possível supor um leve grau de diferenciação entre as cabeceiras estudadas. Outra observação a respeito de uma possível diferenciação regional seria a ocorrência de desequilíbrio gamético apenas nos organismos coletados no Bugre (Tabela 5).

Apesar da estrutura cariotípica semelhante entre *A. sp.D* e *A. scabripinnis*, os dados populacionais aqui obtidos indicam que a calha do rio Iguaçu, não deve funcionar como barreira ecológica à dispersão e fluxo gênico, contrariamente ao que acontece com *A. scabripinnis* em outras bacias hidrográficas.

5.3 ANÁLISE POPULACIONAL E CARIOTÍPICA

Os dois tipos de análise realizados acima são concordantes. Os dados sobre frequência populacional apontam para uma conclusão que é perfeitamente aceitável se levarmos em consideração que os cariótipos também são muito parecidos, o que possibilitaria fluxo gênico. Provavelmente os indivíduos de Balsa Nova (1), Bugre (2), e da Lapa (3) são componentes de apenas uma só população original.

Segundo ABILHOA (comunicação pessoal), *Astyanax sp.D* também são coletados na calha do rio Iguaçu, entretanto em menor quantidade quando comparado às coletas feitas em cabeceiras. Este fato dá suporte à suposição de fluxo gênico entre os pontos analisados.

Entretanto, à partir dos dados e conclusões obtidas neste trabalho, é possível, devido às próprias características do método científico, formular uma nova pergunta à respeito da espécie *Astyanax sp.D*: Será a igualdade entre as frequências cromossômicas

das diferentes populações estudadas neste trabalho reflexo de algum tipo de seleção cromossômica? (o teste do equilíbrio de H-W pode não detectar seleção se ela não for intensa) Uma das maneiras de esclarecer o real alcance do fluxo gênico entre as populações seria através da medição de tal fluxo da utilização de marcadores moleculares.

A predominância de cursos d'água relativamente pequenos na bacia do alto rio Iguaçu eleva a importância do estudo da ictiofauna destas cabeceiras. Informações sobre a diferenciação entre populações, como a realizada neste estudo, podem ser significativas em futuros planos de manejo e conservação.

6. CONCLUSÕES

- A análise da heterocromatina dos exemplares de *Astyanax* sp.D analisados no presente trabalho fornece indícios de que estaria ocorrendo transferência de heterocromatina entre cromossomos não homólogos.
- O polimorfismo (não apenas dos pares 18 e 19) encontrado pode ser resultante dos períodos glaciais quaternários, os quais teriam subdividido a espécie em várias populações isoladas, com posterior junção das mesmas.
- Através do estudo cariotípico e populacional realizado, é possível sugerir que as várias amostras estudadas neste trabalho sejam parte de uma só população de *Astyanax* sp.D.

7. REFFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SÁBER, N.A. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, v.3, p.1-11, 1977.

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguacu basin. **Cytologia**, v.66, n.3, p.299-306, 2001.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997

ANGERMEIER, P.L. Species-area relationships for stream fishes. **Ecology**, v. 70, n. 5, p.1450-1462, 1989.

AREFJEV, V.A. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). **Caryologia**, v.43, n.3/4, p.291-304, 1990a.

AREFJEV, V.A. Problems of Karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six especies of tetras. **Caryologia**, v.43, n.3/4, p.305-319, 1990b.

ARTONI, R.F.; MOLINA, W.F.; BERTOLLO, L.A.C. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (siluriformes) and *Liporinus elongatus* (characiformes). **Genet. Mol. Biol.**, v.22, p.39-44, 1999).

BARROS, N.M.T.; MARGARIDO, V.P. Estudos cariotípicos em *Astyanax* sp.B (PISCES, CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE)

coletado no rio Vorá - bacia do Iguaçu. (1999). In: 45 Congresso Nacional de Genética, Gramado, RS, **Resumos**, 1999.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations of *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.1, n.2, p.103-102, 1978.

BERTOLLO, L.A.C; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A. S.; MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Res.**, v.8, p.603-613, 2000.

BIGARELLA, J.J.; ANDRADE-LIMA, D. Paleoenvironmental changes in Brazil. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM OF THE ASSOCIATION FOR TROPICAL BIOLOGY, 5, 1982, Caracas. **Proceedings of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology**. New York: Columbia University Press, 1982. p27-40.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (TELEOSTEI, SILURIFORMES) from the Iguaçu river basin. **Genética**, v.106, p215-221, 1999.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Intra-individual polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from Iguaçu River basin in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.3, p605-607, 2000.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (SILURIFORMES, TRICHOMYCTERIDAE): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analysis. **Genética** v.115, p.253-258, 2002.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Iguaçu river. **Heredytas**, v.140, p201-209, 2004.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática**. Poluição e Piscicultura, São Paulo, 1972.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3ª ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1998.

BUCKUP, P.A. **Sistemática e biogeografia de peixes de riachos**. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R. & P. R. PERES – NETO. Ecologia de Peixes de Riachos. Rio de Janeiro: Série Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, vol.VI, p.91-138, 1999.

CASALE, V.C.; TCHAICKA, L.; PEGORARO, J.L.; MARGARIDO, V.P. Relações Filogenéticas em quatro espécies de *Hypostomus* (PISCES, SILURIFORMES, LOCARIIDAE) baseadas em análise citogenética, dados de isozimas e coloração de corpo. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, PR, **Resumos**, 2002.

CASTRO, R. M. C. **Evolução da ictiofauna de riachos Sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais**. In:

CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R. & P. R. PERES – NETO. Ecologia de Peixes de Riachos. Rio de Janeiro: Série Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, vol.VI, p.139-155, 1999.

CENCI, M.A.; MARGARIDO, V.P. Estudos citogenéticos comparativos de duas populações de *Astyanax bimaculatus* (PISCES, CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE) coletados nas bacias dos rios Iguaçu e Piquiri. In: 45 Congresso Nacional de Genética, 1999.

CESTARI, M.M.; GALETTI JR., P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from de Paraná-Paraguai rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, v.1, p.108-112, 1992.

CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos preliminares de peixes pertencentes à Bacia do Rio Iguaçu. In: III Encontro Paranaense de Genética. Curitiba (PR). **Resumos** 3.1.1.9, 1996.

CUNHA, E.B.; PEGORARO, J.L. MARGARIDO, V.P. Análise comparativa em duas espécies de *Oligosarcus* (PISCES, CHARACIDAE, ACESTRORHYNCHINAE). In: 47 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, 2001.

DA SILVA CORTINHAS, M.C.; CESTARI, M.M.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO A.S. First Chromosome Data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the South coast of Brazil. Conventional C-NOR and CMA3 bandings and FISH studies. **Caryologia**, v.56, n.2, p187-191, 2003.

DALABONA, G.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos preliminares em peixes do gênero *Astyanax* do Rio Iguaçu (PR). In: CONGRESSO

NACIONAL DE GENÉTICA, 41, 1995. Caxambu. **Resumos**. p.454, 1995.

DANIEL-SILVA, M. de F.Z. **Estudos Citogenéticos Comparativos em Quatro Espécies do Gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1996. 176f. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

DENTON, T.E.. **Fish Chromosome Methodology**. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois. 1973.

DIAS, M.B.; JÚNIOR, H.F.J. Dados preliminares sobre o cariótipo e NORs de duas espécies de tetragonoptarinae: *Markiana nigripinnis* e *Astyanax* sp.B. In: VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, São Carlos, SP, **Resumos**, 1996.

DOBZHANSKY, T. **Genetics of the Evolutionary Process**. Columbia University Press, 1970, 453p.

FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. An additional chromosome in two fish species. **Revista Brasileira de Genética**. v.7, n.1, p.109-118, 1984.

FALCÃO, J.N. **Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae)**. Ribeirão Preto (SP), 1988. 137f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

FAUAZ, G.; CESTARI, M.M.; MOREIRA-FILHO, O. Estudos cariotípicos preliminares em *Astyanax* sp da Bacia do Rio Iguaçu (PR). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA

DE PEIXES NEOTROPICAIS, III. 1990, Botucatu (SP). **Resumos**. p.17, 1990.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B cromossomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (CHARACIDAE). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.2, p.157-163, 1994.

FAZOLLI, L.C.; SILVA, V.A.B.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JÚLIO-JUNIOR, H.F. Chromosome Characterization of *Astyanax* sp B (Characidae, Tetragonopterinae), na Endemic Species of the Iguaçu River, Paraná, Brazil. **Cytologia**, v.68, p.389-394, 2003.

FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P. C.; CESAR, A.C.G.; DIAS A.L.; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v.44, p.161-166, 1991.

FENOCCHIO, A.S.; SWARÇA A.C.; CESTARI, M.M.; DIAS, A.L. 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-Krakow** v.51, p.219-222, 2003.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.72, n.4, p.297-353, 1981.

FROESE, R.; PAULY, D. World Wide Web eletronic publication. FISHBASE. www.fishbase.org, version 12/2004.

GALETTI JR., P. M.; MESTRINER, C. A.; MONACO, P. J.; RASCH, E. M. Post-zygotic modifications and intra- and interindividual nucleolar organizing regions variations in fish: report of case involving *Leporinus friderici*. **Chrom. Res.**, v.3, p.285-290, 1995.

GALETTI JR., P. M. Chromosome diversity in Neotropical fish. NOR studies. **Ital. J. Zool.**, v.65, p.53-56, 1998.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Ser Zool**, v.13, p.65-88, 2000.

GOLD, J.R.; LI, C. SHIPLEY, N.S.; POWERS, P.K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, v.37, p.563-575, 1990.

GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DE MEEÛS, T.; ROUSSET, F. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v.144, p.1933-1940, 1996.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, Guanabara, 1988, 142p.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.

HARTLEY, S. E. C, Q and restriction enzyme banding of the chromosomes in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Artic charr (*Salvelinus alpinus*). **Hereditas**, v.114, p.253-261, 1991.

HERAS, M.P. **Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de alguns rios do Brasil.** São Carlos (PR). 1998. 86f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos.

HOFFMAN, A.A.; SGRÒ, C.M.; WEEKS, A.R. Chromosomal inversion polymorphism and adaptation. **Trends in Ecology and Evolution.** In press.

INGENITO, L.F.S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA V.. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arq. Ciênc. Vet. UNIPAR** , v.7, p.23-26, 2004.

JONES, R.N. B-chromosome drive. **Am. Nat.** , v.137, p.430-442, 1991.

JUSTI, A. J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas.** São Carlos (SP), 1993. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos.

KANTEK, D.L.Z. **Estudo das regiões heterocromáticas ricas em GC e aplicação de enzima de restrição *AluI* em duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae) pertencentes ao primeiro planalto do Rio Iguaçu(PR).** Curitiba (PR), 2002. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Campus Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná.

KANTEK, D.L.Z.; DOMINGUES, M.S.; ARTONI, R.F.; NOLETO, R.B.; CIPRIANO, R.R.; CESTARI M.M. Caracterização Citogenética de *Astyanax altiparanae* (PISCES, TETRAGONOPTERINAE) da lagoa da fazenda Canguiri, bacia do alto rio Iguaçu (PR). In: X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, **Resumos**, 2004.

KANTEK, D.L.Z.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Polimorfismo de Heterocromatina e Triploidia natural em *Astyanax* sp.D (CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE) da região do alto rio Iguaçu (PR). In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, PR, **Resumos**, 2002.

KANTEK, D.L.Z.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Cytogenetic Characterization and NOR Polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from First Plateau of Iguaçu River (Paraná State, Brazil). **Cytologia**, v.68, n.1, p19-24, 2003.

KAVALCO, K. F.; MARGARIDO, V. P. Dados cariotípicos de uma população de *Corydoras* cf. *paleatus* (PISCES, SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE) da região de Quedas do Iguaçu/PR, Bacia do rio Iguaçu. In: X Semana de Biologia e I Jornada de meio ambiente, Cascavel, PR, **Resumos**, 2000.

KAVALCO, K.F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analysis in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v.56, n.4, p453-461, 2003.

KRIMBAS, C.B.; POWELL, J.R. ***Drosophila* Inversion polymorphism**. CRC Press, 1992.

LACADENA, J.R. **Citogenética**. Editorial Complutense, S. A. Madri, Espanha. 1996, 928p.

LARA, M.C.S. **Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (SILURIFORMES, LOCARIIDAE) da bacia do rio Paraná**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 1998.

LE MOS, P.M.M.; FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; CESTARI, M.M. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguazu river basin. (Paraná state, Brazil). **Caryologia**, v.55, p.193-198, 2002.

LEVAN, A.; FREGDA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p210-220, 1964.

LEWONTIN, R.C.; WHITE, M.J.D. Interaction between inversion polymorphisms of two chromosome pairs in the grasshopper, *Morba scurra*. **Evolution**, 14, p.116-129, 1960.

LOWE-McCONNELL, R.H. **Fish communities in tropical freshwater: their distribution, ecology and evolution**. London: Longman, 1975. 337p.

LOWE-McCONNELL, R.H. Some factors affecting fish populations in Amazonian waters. **Atas Simp.**, v.7, p.177-186, 1967.

LUCENA, C.A.S. (1993) Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Telestei,

Ostariophysi, Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 125p.

LUCINDA, P.H.F. **Estudo taxonômico dos peixes Cyprinodontiformes da bacia do rio Iguaçu.** Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

MAISTRO, E.L. **Caracterização citogenética e morfológica de populações de *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae) das bacias do rio Tietê e Paranapanema.** Botucatu (SP), 1991. Dissertação (Mestrado em Genética) - Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

MAISTRO, E.L. **Caracterização morfológica e estrutural de cromossomos supranumerários em peixes.** Botucatu (SP), 1996, 152p. Tese (Doutorado em Genética) - Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

MARCO, D.A. **Estudos cromossômicos em peixes da subfamília Salmininae (Pisces, Characidae).** São Carlos (SP), 1986. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos.

MARGARIDO, V.; GAVASSO, P.E. Análise cariotípica em *Pimelodus ortmanni* (PISCES, SILURIFORMES, PIMELODIDAE) coletado no rio Iguaçu - bacia do Iguaçu. In: 46 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, 2000.

MARGARIDO, V.P.; ROMAN, M.P. Estudos citogenéticos em *Glanidium ribeiroi*, *Pariolius* sp. *Rhamdia voulezi* (PISCES, SILURIFORMES) coletados no rio Iguaçu - Quedas do Iguaçu -

Paraná. In: 46 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, 2000.

MARGARIDO, V.P.; ROSA, R.; PEGORARO, J.L. Estudos citogenéticos em duas populações de *Crenicichla iguassuensis* (PISCES, CICHLIDAE) do rio Iguaçu - Paraná. In: 47 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, 2001.

MARTINEZ, E.R.M.; JÚLIO Jr, H.F. Análise citogenética de *Rhaphiodon vulpinus* (CHARACIFORMES, CYNODONTIDAE) e *Oligosarcus longirostris* (CHARACIDAE, ACESTRORHYNCHINAE) da bacia do Paraná e do rio Iguaçu. In: VII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus, AM, **Resumos**, 2000.

MARTINS, N.S., OLIVEIRA, M.A., WALDRIGUES, A., GIULIANO, L.E.; ARAUJO, A.M.L.V. Estudo cariotípico de *Astyanax scabripinnis paranae* da região de Londrina, PR. **Ciênc. Cult.**, v.36, p.862-863, 1984.

MATTHEWS, W.J. Small fish community structure in Ozark streams: structured assembly patterns or random abundance of species? **Am. Midl. Nat.**, v. 107, n.1, p.42-54, 1982.

MATTHEWS, W. J. **Patterns in Freshwater Fish Ecology**. New York, Chapman & Hall, 1998.

MAYR, B.; RÀB, P.; KALAT, M. Localization of NORs and counteirstain-enhanced fluorescence in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). **Genetica**, v.67, p.51-56, 1985.

MDK/CENCO. **Usina Hidrelétrica de Segredo: Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Relatório de Impacto Ambiental.** Curitiba, 1987.

MEFFE, G.K.; SHELDON, A.L. The influence of habitat structure on fish assemblage composition in southeastern blackwater streams. **Am. Midl. Nat.**, v. 120, n. 2, p.225-239, 1988.

MENEZES, N. A.; CASTRO, R. M. C.; WEITZMAN, S. H.; WEITZMAN, M. J. Peixes de riacho da Floresta Costeira Atlântica Brasileira: um conjunto pouco conhecido e ameaçado de vertebrados. II SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA, ESTRUTURA, FUNÇÃO E MANEJO. Águas de Lindóia, 1990. **Anais...** São Paulo: Publicações Aciesp, n. 71, 1990.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, v.127, p.249-253, 1997.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá Region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.1, p.55-61, 1998.

MIZOGUCHI, S.M.H.; MARTINS-SANTOS, I.C. Análise citogenética de *Crenicichla iguassuensis* e *Tilapia rendalli* (PISCES, CICHLIDAE) da bacia do rio Iguaçu. In: 45 Congresso Nacional de Genética, Gramado, RS, **Resumos**, 1999.

MIZOGUCHI, S.M.H.; MARTINS-SANTOS, I.C. Caracterização cromossômica de três espécies da família Cichlidae (PISCES,

PERCIFORMES) do rio Iguaçu. In: VII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus, AM, **Resumos**, 2000.

MIZOGUCHI, S.M.N.; MARTINS-SANTOS, I.C.; PORTELA-CASTRO, A.L.B. Identificação das regiões organizadoras de nucléolos através das técnicas de Híbridação *in situ* e CMA3 em *Tilapia reandalli* (CICLHIDAE, PERCIFORMES) da bacia do rio Iguaçu, PR. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, PR, **Resumos**, 2002.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALLETI Jr., P.M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Can. J. Genetic. Cytol.**, v.26, n.5, p.564-568, 1984.

MOREIRA-FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. São Carlos (SP), 1989. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.331-357, 1991.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO FILHO, S.A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v.36, n.3, p.235-244, 1983.

MURAMOTO, J; OHNO, S.; ATKIN, N.B. On the diploid state of the fish order Ostariophysii. **Chromosoma**, v.24, p.59-66. 1968.

NARDINO, D.; MOTTA, T.S.; TORRES, R.A.; ADAM, M.L. Análise cromossômica em populações isoladas de *Mimagoniates microlepis* (CHARACIDAE, GLANDULOCAUDINAE) das nascentes do rio Iguaçu. In: X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Natal, RN, 2004.

NEI, M.; CHESSEK, R.K. Estimation of fixation index and gene diversities. . **Ann. Hum. Genet.**, V. 47, P.253-259, 1983.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.70, p.3321-3323, 1973.

NELSON, G; PLATNICK, N. **Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance**. Columbia University Press, New York, 593p, 1981.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; MORI, L.; TOLEDO-FILHO, S.A. Cytogenetic and DNA content studies of armoured catfishes of the genus *Corydoras* (PISCES, SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE) from the southeast coast of Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v16, p.617-629, 1993.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome formulae of Neotropical Freshwater Fishes. **Braz. J. Gen.**, v.11, n.3, p.577-624. 1988.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: Simpósio de Citogenética Evolutiva de Peixes Neotropicais VIII. **Resumos**. p.24, 2000.

PAGANELLI, H.H; GALETTI, P.M.; MOREIRA-FILHO, O. Análise cariotípica nos gêneros *Probolodus* e *Astyanax* (Pisces, Characidae). In: Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, I., 1986, São Carlos. **Resumos**. p.53, 1986.

PAGANELLI, H.H. **Diversidade Cromossômica do Gênero *Astyanax* com especial referência a *Astyanax bimaculatus* (Linneaus, 1758). Considerações Taxonomias e Evolutivas.** São Carlos, 1990. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de São Carlos.

PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa*. Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v.36, p.307-314, 1983.

PAZZA, R.; MARGARIDO, V.P.; JÚLIO Jr, H.F. Estudo citogenético de *Hoplias cf. malabaricus* do rio Vorá, bacia do rio Iguaçu. In: 45 Congresso Nacional de Genética, Gramado, RS, **Resumos**, 1999.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**, v.103, p.128-130, 1994.

PORTELA, A.L.B.S., GALETTI JR, M., BERTOLLO, L.A.C. Considerations on the Chromosome Evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazil. J. Genet.**, v.11 n.2, p.307-316, 1988.

QUIJADA, C.C.D.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos em *Cichlassoma facetum* e *Geophagus brasiliensis* (CICHLIDAE) da bacia do rio Iguaçu (PR). In: XII Encontro Brasileiro de Ictiologia, São Carlos, SP, **Resumos**, 1999.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280-1283, 1995.

RAVEDUTTI, C.G.; JÚLIO Jr., H.F. Cytogenetic analysis of three species of the neotropical family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Parana river basin, Brazil. **Cytologia**, v.66, n.1, p.65-70, 2001.

ROBAINA, T.F.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos preliminares de exemplares gênero *Astyanax* da bacia rio Iguaçu (PR). In: 44 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, 1998a.

ROBAINA, T.F.; CESTARI, M.M. Estudo citogenético das espécies *Hyphessobrycon reticulatus* e *Astyanax* sp. (CHARACIDAE, CHARACIFORMES), pertencentes a um lago da Petrocix - São Mateus do Sul (PR). In: 6 Evento de Iniciação Científica da UFPR, Curitiba, PR, **Resumos**, 1998b.

ROMAN, M.P.; MARGARIDO, V.P. Estudos citogenéticos em três gêneros de Siluriformes (PISCES) coletados no rio Iguaçu - Quedas do Iguaçu Paraná. In: X Semana de Biologia e I Jornada de meio ambiente, Cascavel, PR, **Resumos**, 2000.

ROMAN, M.P.; MARGARIDO, V.P. Análise citogenética em *Pariolius hollandi* (PISCES, SILURIFORMES, PIMELODIDAE) do rio Iguaçu. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, PR, **Resumos**, 2002.

ROMAN, M.P.; MOREIRA-FILHO, O. O Cariótipo de *Rhamdia branneri* (PISCES, SILURIFORMES, PIMELODIDAE) do rio Iguaçu e um caso de triploidia natural. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, PR, **Resumos**, 2002.

RUBERT, M.; MARGARIDO, V.P. Análise citogenética em três espécies do gênero *Oligosarcus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE, ACESTRORHYNCHINAE). In: X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Natal, RN, **Resumos**, 2004.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v.69, p.50-56, 1992.

SAMPAIO, F.A.A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysii) da Bacia do Rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo desta fauna.** São Carlos (SP), 1988. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos.

SÀNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, P.; BOUZA, C.; VIÑAS, A. Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* with restriction enzymes. **Heredity**, v.66, p.241-249, 1991.

SANTI, A.P.; MARTINS-SANTOS, I.C. Estudo citogenético em *Corydoras paleatus* e *Corydoras aeneus* (PISCES, SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE). In: 47 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, 2001.

SATO, L.R.; FORESTI, C.O.F. Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (TELEOSTEI: SILURIFORMES: TRICHOMYCTERIDAE). **Genetics and Molecular Biology** v.27, p.45-50, 2004.

SCHAEFER, S.A. Conflict and Resolution: Impact of New Taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical Cascudinos. In: MALABARBA, L.R; R.E. REIS; R.P. VARI, Z.M.S. LUCENA, & C.A.S. LUCENA (eds), **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998.

SCHEEL, J.J. Fish chromosomes and their evolution. **Internal Report of Danmarks Akvarium**. Charlottenlund (Denmark). p22, 1973.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes Today**, v.9, 1987.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A.A.M. **Catálogo de Peixes da Bacia do Rio Iguaçu**. Curitiba: IAP/GTZ, 1994. 128p.

SHORROCKS, B. **The genesis of diversity**. Hodder and Stoughton LTD, Kent, Inglaterra, 1978, 181p.

SOUZA, L. **Estudos citogenéticos em cinco espécies do gênero *Pimelodus* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) de duas bacias hidrográficas**. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2003.

SOUZA, I.L; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, v.60, p.1-11, 1995.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI JUNIOR, P.M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Bras. J. Gen.**, v.19, n.3, p.405-410, 1996.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.**, v.74, p.304-306, 1972.

SWARÇA, A.C.; CAETANO, L.G.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization through chromosomic banding of *Pinirampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin PR/Brasil. **Caryologia**, v.52, p.31-35, 1999.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M; DIAS, A.L. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). **Genetica**, v.119, p.87-92, 2003.

TCHAICKA, L.; MARGARIDO, V.P. Heterocromatina Constitutiva e Regiões G-C ricas em *Ancistrus* sp., (PISCES, LOCARIIDAE, ANCISTRINAE) do rio Alto Alegria, Boa Vista da Aparecida. X Semana de Biologia e I Jornada do Meio Ambiente, Cascavel, PR, **Resumos**, 2000.

TERENCIO, M.L.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F. Citogenética de *Pimelodus ortmanni*, uma espécie de mandí endêmica ao rio Iguaçu. In: 47 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, 2001.

UIEDA, V. S. **Regime alimentar, distribuição espacial e temporal de peixes (Teleostei) em um riacho na região de Limeira, São Paulo**. Campinas, 1983. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. 151p.

VAN DER HAMMEM, T. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. **J. Biogeogr.**, v.1, p.3-26, 1974.

VASCON, S.A.; PILEGGI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Estudos citogenéticos em *Brycon lundii* (Pisces, Characidae). **Cienc. Cult.**, v.36, p.813, 1994.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v.101, p.24-28, 2003.

WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. Citogenética de pequenos peixes caracideos do grupo Cheirodontinae. Cromossomos mitóticos de *Odontostilbe paranensis*, *O. claudiae* e *Holoshestes heterodon*. **Brazil J. Genet.**, v.17, n.3, p.122, 1994.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v.38, p.1358-1370, 1984.

WEITZMAN, S.H.; WEITZMAN, M.J. Biogeography and evolutionary diversification in neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ASSOCIATION FOR TROPICAL BIOLOGY, 5, 1982, Caracas. **Proceedings...**p.403-422, 1982.

WEITZMAN, S.H.; FINK, W.L. Relationship of the neon tetras, a group of South American freshwater fish (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiforms. **Bull Mus.Comp. Zool**, v.150, p.339-395, 1983.

WHITE, M.J.D. **The Chromosomes**. Chapman and Hall, Londres. 196p, 1973.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. The University of Chicago Press, London. 1978.