



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIAN PATRÍCIA OLIVEIRA DE MORAES-MANÉCOLO

**CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR DE
DIFERENTES ESPÉCIES DOS GÊNEROS *Heptapterus*,
Rhamdella E *Pimelodella* (SILURIFORMES,
HEPTAPTERIDAE), DE DUAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO
RIO GRANDE DO SUL**

Londrina
2014

VIVIAN PATRÍCIA OLIVEIRA DE MORAES-MANÉCOLO

**CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR DE
DIFERENTES ESPÉCIES DOS GÊNEROS *Heptapterus*,
Rhamdella E *Pimelodella* (SILURIFORMES,
HEPTAPTERIDAE), DE DUAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO
RIO GRANDE DO SUL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor (a).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Dias

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M827c Moraes-Manécolo, Vivian Patrícia Oliveira de.
Citogenética convencional e molecular de diferentes espécies dos gêneros *Heptapterus*, *Rhamdella* e *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae), de duas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul / Vivian Patrícia Oliveira de Moraes-Manécolo. – Londrina, 2014.
86 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Cariótipos – Teses. 3. Heterocromatina – Teses. 4. Peixe – Rio Grande do Sul – Teses. I. Dias, Ana Lúcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. EMBRAPA. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. Título.

CDU 576.312.32:597

VIVIAN PATRÍCIA OLIVEIRA DE MORAES-MANÉCOLO

**CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR DE DIFERENTES
ESPÉCIES DOS GÊNEROS *Heptapterus*, *Rhamdella* E *Pimelodella*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), DE DUAS BACIAS
HIDROGRÁFICAS DO RIO GRANDE DO SUL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor (a).

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Swarça
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alberto Sergio Fenocchio
Universidad Nacional de Misiones – UNAM

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

Londrina, 21 de março de 2014.

*À Deus,
aos meus amores Iza e João,
aos meus irmãos Liliane Abner
e ao meu amado Rodrigo...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar sempre e por me capacitar a concluir mais esta etapa da minha vida. Obrigada, Pai!

Aos meus pais, Iza e João, por sonharem comigo e por me motivar e apoiar sempre. Sem vocês não seria quem sou. Amo vocês!

Ao meu esposo Rodrigo por se dispor a entrar nesta batalha comigo. Muito obrigada por ser o companheiro e o parceiro que é. Sou extremamente grata a Deus por ter colocado você em minha vida. Eu te amo!

Aos meus parceiros das maiores artes, das maiores broncas e das maiores alegrias, Lilian e Abner. Meus irmãos, minha vida não teria graça nenhuma sem vocês. Aos meus cunhados Luciano e Mirella. Muito obrigada por toda amizade e companheirismo. E ao João Arthur e a Luiza, por já trazerem tanta felicidade a nossa família.

À família Bolognese Manécolo por todo carinho e cuidado para comigo. Vocês são muito especiais!

À minha mãe postíça Dolores Matioli por todo carinho, companheirismo, risadas, conversas. Por ser uma amiga para a vida toda. Amei cada segundo dos anos que morei com você em Londrina. Seus conselhos e ensinamentos seguirão comigo sempre.

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia Dias. Ana, como expressar a minha gratidão a alguém que sempre confiou em mim e me deu oportunidades jamais sonhadas. Muito obrigada por me orientar nesta jornada, por toda paciência e apoio mesmo diante de decisões inusitadas.

À querida Dra. Lucia Giuliano Caetano por todo companheirismo e diálogos. Pela disposição em coletar os exemplares analisados neste trabalho. Certamente sem o seu auxílio esta tese não seria concluída.

À Dra. Renata da Rosa por toda disposição em ajudar, trocando ideias e muitas vezes dando outras que nem mesmo tinha pensado. Obrigada por sempre inovar e permitir que eu aprenda com essas inovações.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba pelo empréstimo de seu laboratório na UFRGS, que foi indispensável à realização da pesquisa, e pelo auxílio na identificação das espécies.

À Lara Ferracin e a Dra Maria Helena P. Fungaro por todo ensinamento e auxílio durante o ano de 2012.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em analisar este trabalho.

Ao programa de pós- graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina/PR, sem os quais não teria sido possível concluir o curso de doutorado.

Aos professores do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular por todo o conhecimento ofertado durante o curso.

Aos companheiros de laboratório Natália, Fábio, Angélica de Paula, Angélica Rossotti, Angélica Tiepo, Tatiane, Laura, Matheus, Ana Beatriz. E especialmente a Juceli, minha grande parceira de pesquisa. Muito obrigada pelos puxões de orelha e pelos incentivos e pela disposição em ir ao Rio Grande do Sul coletar os exemplares. Teria sido bem mais difícil sem você.

À Larissa Pires pela disposição em ajudar nas coletas no Rio Grande do Sul.

Às amigas conquistadas em outros laboratórios: Alessandra, Karen e Ana Paula Ricieto. Como conversar com vocês me faz bem!

Aos queridos técnicos Dário e Melissa, por toda disposição e dedicação.

À Sueli, secretária e amiga, por toda dedicação e paciência.

À todos os que de alguma forma contribuíam para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu. Há tempo de nascer,
e tempo de morrer; tempo de
plantar, e tempo de arrancar o que
se plantou”*

Eclesiastes 3:1-2

Moraes-Manécolo, Vivian Patrícia Oliveira. **Citogenética convencional e molecular de diferentes espécies dos gêneros *Heptapterus*, *Rhamdella* e *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae), deduas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul**. 2014. 86 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

RESUMO

A ordem Siluriformes é formada por peixes de água doce com ampla distribuição por toda a região Neotropical, possuindo cerca de 3088 espécies válidas, distribuídas em 477 gêneros e 36 famílias. Dentre as famílias que compõem os siluriformes encontra-se a família Heptapteridae, formada por peixes de pequeno porte organizados em 24 gêneros e cerca de 207 espécies válidas. Neste estudo, foi realizado um levantamento de dados citogenéticos na família Heptapteridae, utilizando-se 113 populações de 30 espécies e oito gêneros. A composição dos conjuntos cromossômicos das espécies variou de 42 a 58 cromossomos sendo estes, preferencialmente, dos tipos metacêntricos e submetacêntricos. Foi observada a ocorrência de polimorfismos numéricos, evidenciados pela descrição de três indivíduos triploides do gênero *Rhamdia* e a presença de cromossomos B. A localização dos cístrons ribossômicos 5S e 18S, bem como a quantidade e distribuição da heterocromatina foram identificadas nas espécies descritas. O presente estudo também trouxe a análise de cinco espécies de peixes de três gêneros da família Heptapteridae, coletadas em duas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul: duas populações de *Heptapterus mustelinus* e uma população de *Rhamdella eriarcha* (topotipo) foram coletadas na Laguna dos Patos; indivíduos de *Heptapterus* sp A e *Rhamdella* sp foram obtidos na Bacia do Tramandaí e exemplares de *Pimelodella australis* foram coletados nas duas bacias hidrográficas. A população de *H. mustelinus* do Arroio Colombo apresentou $2n=54$ ($32m+8sm+10st+4a$) e todas as demais espécies/populações um $2n = 58$: *H. mustelinus* do Rio Forquetinha e *Heptapterus* sp A coletada no Rio Maquiné apresentaram $32m+12sm+4st+10a$; *P. australis*, tanto do Arroio Ribeiro como da Lagoa dos Quadros, possuíam a mesma fórmula cariotípica, $34m+10sm+8st+6a$, *R. eriarchae* *Rhamdella* sp com $46m/sm+8st+4a$. Os cístrons ribossômicos 18S apresentaram-se em quatro cromossomos nos exemplares de *H. mustelinus* das duas populações, enquanto que em *Heptapterus* sp A e nas demais espécies aqui estudadas foram observados em apenas um par de cromossomos. A localização da sequência gênica de DNAR 5S foi realizada apenas em *Heptapterus* e revelou, para as duas populações de *H. mustelinus*, apenas um par de cromossomos portador desta sequência, localizada na região terminal na população do Arroio Colombo e em posição intersticial na população do Rio Forquetinha; em *Heptapterus* sp A este sítio foi observado em apenas um cromossomo, em região intersticial. A coloração com fluorocromos base específicos evidenciou nas duas populações de *H. mustelinus* regiões ricas em G-C nas porções terminais dos braços de alguns cromossomos e intersticial no par 26, porém, em *Heptapterus* sp A apenas um par portador de região CMA_3^+ foi evidenciado. Nas populações dos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdella* apenas as RONS apresentaram-se ricas em GC. A distribuição e composição da heterocromatina mostraram-se de forma diferenciada nas populações analisadas, especialmente nas do gênero *Heptapterus*, onde em *H. mustelinus* a heterocromatina localizada na região terminal dos cromossomos, nas duas populações, apresentou-se rica em bases GC, porém, a que estava localizada na região centromérica mostrou-se rica em pares AT na população do Arroio Colombo, enquanto que na população do rio Forquetinha a heterocromatina estava composta por pares de bases GC e AT. Em *Heptapterus* sp A foi possível observar que algumas regiões heterocromáticas

terminais mostraram-se CMA₃⁺/DAPI⁺ e outras regiões mostraram-se compostas apenas por bases AT. Em *P. australis* da Lagoa dos Quadros, a heterocromatina foi observada na região terminal de alguns cromossomos. A que estava associada à constrição secundária e RON mostrou-se CMA₃⁺/DAPI⁻, já a heterocromatina pericentromérica presente neste mesmo par apresentou-se apenas DAPI⁺; na população do Arroio Ribeiro heterocromatina associada a RON também mostrou-se CMA₃⁺, enquanto que as regiões heterocromáticas terminais dos cromossomos e algumas intersticiais apresentaram-se ricas em AT. As espécies do gênero *Rhamdella* também apresentaram diferenciação quanto à heterocromatina, sendo que em *R. eriarchaesta* foi evidenciada nas regiões centroméricas e terminais de vários cromossomos, em um ou ambos braços cromossômicos porém, apenas a heterocromatina associada à RON mostrou-se CMA₃⁺. Em *Rhamdella* *sp.* heterocromatina foi observada nas regiões terminais de alguns cromossomos, a RON apresentou-se rica em GC, além de alguns blocos heterocromáticos serem DAPI⁺. Embora similaridades tenham sido observadas, diferenças tanto inter como intraespecíficas em relação à macro e microestrutura cromossômica das espécies estudadas, revelam um dinamismo dos processos que tem agido sobre a evolução e diferenciação cariotípicas na família Heptapteridae.

Palavras-chave: Cistrons ribossômicos. Descrição cariotípica. *Heptapteridae*. Heterocromatina. Rio Grande do Sul – Brasil. Topotipo.

Moraes-Manécolo, Vivian Patrícia Oliveira. **Citogenética convencional e molecular de diferentes espécies dos gêneros *Heptapterus*, *Rhamdella* e *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae), de duas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul**. 2014. 86 p. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

ABSTRACT

The order Siluriformes is composed by freshwater fishes widely distributed throughout the Neotropics, with about 3088 species recognized as valid, organized in 477 genera and 36 families. Among the families that compose the Siluriformes there is the Heptapteridae family, formed by small fish arranged in 24 genera and about 207 valid species. In this study, a data collection of Heptapteridae family was performed using cytogenetic data of eight genera, 30 species and 113 populations. The chromosome sets of heptapterids ranged 42-58 chromosomes and that usually are metacentric and submetacentric. The occurrence of numeric polymorphisms was revealed by the description of three *Rhamdia* individuals triploid and the presence of B chromosomes. The 18S and 5S ribosomal cistrons location was also described as well as the amount and distribution of heterochromatin in the described species was observed. This study also brought the analysis of five fishes species from three genera of the Heptapteridae family collected in two hydrographic basins from Rio Grande do Sul state: two populations of *Heptapterus mustelinus* and one population of *Rhamdella eriarcha* from Laguna dos Patos Hydrographic Basin; specimens of *Heptapterus* sp. A and *Rhamdella* sp. from Tramandaí Hydrographic basin and *Pimelodella australis* individuals were collected of both hydrographic basins. The *H. mustelinus* from Colombo stream had $2n = 54$ (32m + 8 sm + 10 st + 4 a) and all other species/populations presented $2n = 58$: *H. mustelinus* (Forquetinha river) and *Heptapterus* sp. A (Maquiné river) presented 32m + 12 sm + 4 st + 10 a, *P. australis* from Ribeiro stream and Quadros Lagoon had the same karyotype formula, 34m + 10 sm + 8 st + 6 a. *R. eriarcha* (topotype) and *Rhamdella* sp. also presented the same karyotype formula (46m/sm + 8 st + 4 a). A detectable 18S rDNA hybridization region occurs in four chromosomes in the *H. mustelinus* populations, while in *Heptapterus* sp. A and in the other species studied were observed in only one chromosome pair. The 5S rDNA gene sequence location was performed only in *Heptapterus* and revealed, for the two populations of *H. mustelinus*, only a chromosome pair with this sequence in the terminal region of Colombo stream population and interstitial position in the population from the Forquetinha river; in *Heptapterus* sp. it was observed in only one chromosome with this gene sequence in the interstitial region. Staining with CMA₃ fluorochrome revealed in the *H. mustelinus* populations, some chromosomes with GC – rich regions located in the terminal portions of the chromosomes arms and interstitial sign in the pair 26. In *Heptapterus* sp. A just one pair with a CMA₃⁺ region was evidenced. In *Pimelodella* and *Rhamdella* populations only NORs was GC – rich. The two *H. mustelinus* populations presented the heterochromatin located in the terminal region of chromosomes and it was GC-rich, the centromeric heterochromatin proved to be AT – rich in Colombo stream population, while in the Forquetinha river population the centromeric heterochromatin was composed AT and GC. In *Heptapterus* sp. A was observed some terminal heterochromatic blocks CMA₃⁺/DAPI⁺ and other regions proved to be composed only of AT bases. In *P. australis* (Quadros Lagoon), the heterochromatin was observed in the terminal region of some chromosomes. The heterochromatin that was coincident with the secondary constriction and NOR was CMA₃⁺/DAPI⁺ and the pericentromeric heterochromatin present in the same pair was only DAPI⁺; in the Ribeiro stream population the heterochromatin associated with the

NOR also was CMA₃⁺, whereas the terminal and interstitial heterochromatic regions presented rich in AT. In *R.eriarcha* the heterochromatin was evidenced in the centromeric and terminal regions of several chromosomes, in one or both chromosome arms but only the heterochromatin associated with RON was CMA₃⁺. In *Rhamdellasp* the heterochromatin was observed in some terminal regions of chromosomes, the RON presented GC-rich, and some heterochromatic blocks are DAPI⁺. Although similarities have been noted, both inter and intraspecific differences for the chromosomal macro and microstructure of the species studied, reiterating the dynamic nature of the processes that act on the karyotypic evolution and differentiation of the family Heptapteridae.

Key words: Heptapteridae. Heterochromatin. Karyotypic description. Ribosomal cistrons. Rio Grande do Sul state – Brazil. Topotype.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fotos das espécies coletadas: *Heptapterus mustelinus* (a), *Heptapterus* sp A (b), *Rhamdella eriarcha* (c), *Rhamdella* sp (d), *Pimelodella australis* (e). A foto de *P. australis* foi cedida pelo prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba. (barra 10 mm) 21
- Figura 2** – Mapa da América do Sul evidenciando o estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os boxes indicam os locais de coleta: a) Rio Forquetinha, b) Arroio Colombo, c) Arroio Ribeiro, d) Rio Maquiné, e) Lagoa dos Quadros 22

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Locais de coleta dos espécimes analisados. Mapa do Brasil indicando, do lado direito, o estado do Rio Grande do Sul mostrando em: a) Arroio Colombo; b) Rio Forquetinha; c) Rio Maquine 51
- Figura 2** – Cariótipos de: a) *Heptapterus. mustelinus* (Arroio Colombo), b) *H. mustelinus* (Rio Forquetinha), c) *Heptapterus* sp A (Rio Maquiné) 52
- Figura 3** – Metáfases somáticas com AgRON, FISH com sonda de rDNA 18S, CMA₃e FISH com sonda de rDNA 5S, respectivamente, em: a, b, c, d) *H. mustelinus* (Arroio Colombo); e, f, g, h) *H. mustelinus* (Rio Forquetinha); i, j, k, l) *Heptapterus* sp A (Rio Maquiné)..... 53
- Figura 4** – Metáfases somáticas com Banda C coradas com Giemsa, CMA₃e DAPI, respectivamente, em: a,b,c) *H. mustelinus* (Arroio Colombo); d,e,f) *H. mustelinus* (Rio Forquetinha); g, h, i) *Heptapterus* sp A (Rio Maquiné; as setas em (d), (e), (f) indicam a constrição secundária banda C positiva 54

CAPÍTULO 3

- Figura 1** – Locais de Coleta – Mapa do Brasil indicando, no lado direito o estado do Rio Grande do Sul mostrando em:a) Rio Forquetinha; b) Arroio Ribeiro; c) Rio Maquiné; d) Lagoa dos Quadros..... 70
- Figura 2** – Cariótipos de: A) *Pimelodellaaustralis* (Lagoa dos Quadros); B) *Pimelodellasp* (Arroio Ribeiro). Boxes mostrando o par portador da região organizadora de nucléolos 71

- Figura 3** – Metáfases somáticas de *Pimelodella australis* com BC coradas com Giemsa, CMA₃ e DAPI, respectivamente, em: a, b,c) Lagoa dos Quadros; d,e,f) Arroio Ribeiro. Setas indicam o par portador da região organizadora de nucléolos 72
- Figura 4** – Cariótipos de: A) *Rhamdella eriarcha* (Rio Forquetinha), B) *Rhamdellasp* (Rio Maquiné). Boxes mostrando o par portador da região organizadora de nucléolo 73
- Figura 5** – Metáfases somáticas com BC coradas com Giemsa, CMA₃ e DAPI, respectivamente, em: a, b,c) *R. eriarcha* (Rio Forquetinha); d,e,f) *Rhamdellasp* (Rio Maquiné). Setas indicam o par da RON e as cabeças de seta em **f** indicam blocos AT ricos. 74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela I – Dados citogenéticos em espécies da família Heptapteridae. *m*metacêntrico; *sm* submetacêntrico; *st* subtelocêntrico; *a* acrocêntrico; *p* braço curto; *q* braço longo; *2n* número diplóide; *Bs* cromossomo supranumerário; *crs* cromossomo/cromossomos; *NF* número fundamental; *BC* banda C; *RON* região organizadora de nucléolo; *Lg* lagoa; *R* rio; *Rb* ribeirão; *Rv* reservatório. * *NF* recalculado pelos autores, onde cromossomos metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com dois braços e subtelocêntricos e acrocêntricos como portadores de um braço..... 30

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies dos gêneros *Pimelodellae Rhamdella*. *m*metacêntrico; *sm* submetacêntrico; *st*subtelocêntrico; *a*acrocêntrico; *p* braço curto; *q* braço longo; *2n* número diplóide; *NF* número fundamental. *Rf* = referências 69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16	
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS E CITOGENÉTICAS SOBRE A FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE.....	16	
2	OBJETIVOS	19	
2.1	OBJETIVO GERAL	19	
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19	
3	ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETA	20	
CAPÍTULO 1: NOVO LEVANTAMENTO DE DADOS CITOGENÉTICOS EM			
ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE			23
	RESUMO	24	
	INTRODUÇÃO	25	
	MATERIAL E MÉTODOS	25	
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26	
	REFERÊNCIAS	37	
CAPÍTULO 2: DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA ENTRE DUAS ESPÉCIES E			
POPULAÇÕES DO GÊNERO <i>HEPTAPTERUS</i>			
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), COM ÊNFASE PARA A			
LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE GENES			
RIBOSSOMAIS 18S E 5S			41
	RESUMO	42	
	INTRODUÇÃO	43	
	MATERIAL E MÉTODOS	44	
	RESULTADOS	46	
	DISCUSSÃO	47	
	REFERÊNCIAS	55	

CAPÍTULO 3: CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE <i>PIMELODELLA AUSTRALIS</i> E DUAS ESPÉCIES DE <i>RHAMDELLA</i> (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)	59
RESUMO	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	63
RESULTADOS	64
DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS	75
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIA	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E CITOGENÉTICAS SOBRE A FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE

A família Heptapteridae é constituída por um grupo de peixes de couro pertencente à ordem Siluriformes e é composta por 26 gêneros (Ferraris, 2007): *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparales*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Phreatobius*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunaya*, (Bockmann e Guazelli, 2003) constando, até o momento, 207 espécies válidas (Eschmeyer, 2013). Esta família era considerada uma subfamília da família Pimelodidae, juntamente com Pimelodinae e Pseudopimelodinae, sendo todas elevadas a famílias por Bockmann e Guazelli (2003).

As espécies de peixes que compõem a família Heptapteridae são endêmicas dos Neotrópicos, com uma ampla distribuição em cursos d'água da América Central e do Sul, sendo que vários representantes são encontrados em localidades específicas, em áreas de endemismo ictiológico já reconhecidas.

Os heptapterídeos possuem características anatômicas bem específicas, o que facilita a identificação dos indivíduos que integram esta família, tais como: corpo alongado recoberto por pele espessa e lisa ausente de escamas; canais laterosensoriais cutâneos simples; narinas bem separadas e sem barbilhões; três pares de barbilhões (maxilar, mental interno e externo); nadadeira adiposa sempre presente e bem desenvolvida; nadadeira caudal profundamente bifurcada, entalhada, arredondada ou lanceolada; nadadeira dorsal bem desenvolvida, podendo ou não apresentar acúleos; os olhos podem ser grandes ou pequenos, localizados preferencialmente em região anterior e possuem boca terminal (Bockmann e Guazelli, 2003; Burgess, 1989). Suas espécies são de pequeno porte, sendo que seus exemplares adultos raramente ultrapassam o tamanho de 20cm, como espécies dos gêneros *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Pimelodella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, e cerca de 60% das espécies consideradas possuem comprimento médio de 10 cm. Algumas espécies de heptapterídeos foram incluídas na lista de peixes em miniatura por possuírem de 2 à 2,6 cm, como por exemplo, *Horiomyzon retropinnatus*, *Gladioglanis*, *Imparales* (Weitzman e Vari, 1998).

Quanto à ecologia do grupo, os heptapterídeos vivem no fundo de rios pequenos e médios, principalmente em riachos, podendo ser encontrados em águas clara e escura, fria e moderada, em profundidades média e pequena, tendo alguns de seus gêneros, como

Pimelodella e *Rhamdia*, entre os siluriformes mais comuns de água doce da América do Sul. Em sua maioria, possui hábitos noturnos (cf Costa, 1987; Caramaschi, 1991; Casatti e Castro, 1998 *apud* Bockmann e Guazzeli, 2001), tendendo a ser solitários ou ainda formar pequenos grupos de até 10 indivíduos. Os hábitos alimentares de seus exemplares são variados (de onívoros a carnívoros) e não apresentam cuidado parental (Bockmann e Guazzeli, 2003). Dimorfismo sexual geralmente é ausente ou escassamente desenvolvido, visto que os juvenis da maioria das espécies são réplicas em miniatura dos adultos. Espécies dos gêneros *Pimelodella* e *Brachyrhamdia* são apreciadas como peixes ornamentais (Bockmann e Guazzeli, 2003), no entanto, devido ao tamanho pequeno da maioria das suas espécies, esta família possui pequena importância comercial em pesqueiros e no comércio em geral.

Análises cariotípicas foram descritas em apenas oito gêneros da família Heptapteridae: *Cetopsorhamdia* (Vissotto *et al.*, 1999a; Fenocchio *et al.*, 2003a), *Heptapterus* (Yano e Margarido, 2012), *Imparfinis* (Vissotto *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2012), *Phenacorhamdia* (Martinez *et al.*, 2011), *Pimelodella* (Gouveia *et al.*, 2012; Garcia e Almeida-Toledo, 2010), *Rhamdella* (Fonseca *et al.*, 2003), *Rhamdia* (Moraes *et al.*, 2007; Maistro *et al.*, 2003) e *Taunaya* (Borba *et al.*, 2012). No entanto, apesar do baixo número de espécies analisadas, é possível notar neste grupo de peixes algumas características marcantes, tais como a ampla variabilidade cariotípica em relação a número diploide, alto número fundamental ($NF > 80$) devido à grande quantidade de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, e padrão de RONS simples (Swarça *et al.*, 2007; Borba *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2012).

Pimelodella é um dos gêneros de Heptapteridae mais especioso (cerca de 70 espécies), entretanto, apenas sete das espécies descritas apresentam estudos citogenéticos, sendo que estes revelam uma grande variabilidade cariotípica, tanto em relação ao número diploide, que pode ser encontrado igual 46, 52 e 58, como em relação à macroestrutura cromossômica. Neste gênero também já foi observado polimorfismo cromossômico numérico e estrutural, como a presença de cromossomo supranumerário em *Pimelodella* sp do Rio Pardo/SP (Garcia e Almeida-Toledo, 2010) e de sistema cromossômico sexual do tipo XX/XY em *Pimelodella* sp (Dias e Foresti, 1993) e em *Pimelodella boschmai* (Garcia e Almeida Toledo, 2010), ambas do Rio Mogi-Guaçu/SP. A região organizadora de nucléolos, em todas as espécies de *Pimelodella* analisadas até o momento, se localiza em posição terminal do braço curto em um par de cromossomos, como relacionado em diferentes espécies na tabela 1 (capítulo 1).

No gênero *Rhamdella*, Bockmann e Miquelarena (2008) descreveram cinco espécies (*R. aymarae*, *R. cainguae*, *R. eriarcha*, *R. longiuscula* e *R. rusbyi*) e os estudos citogenéticos são restritos a apenas uma espécie, *Rhamdella microcephala*, proveniente do rio Machado/MG, analisada por Fonseca *et al.* (2003), com 56 cromossomos (18m+30sm+8st-a) e aAgRON em posição intersticial no braço longo de um par submetacêntrico.

Em relação ao gênero *Heptapterus*, os primeiros dados cariotípicos foram descritos, recentemente, por Yano e Margarido (2012) em uma população de *Heptapterus mustelinus*, espécie coletada num tributário do Rio São Francisco Verdadeiro, bacia do Alto Paraná, sendo observado $2n = 54$.

Dados citogenéticos de todas as espécies/populações da família Heptapteridae analisadas, até o momento, estão relacionados em uma tabela no capítulo 1 deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral realizar um levantamento dos dados citogenéticos na família Heptapteridae e caracterizar os cariótipos de novas espécies e/ou populações desta família, visando contribuir para uma melhor compreensão da estrutura e evolução cariotípica deste grupo de peixes, bem como suas relações filogenéticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ analisar e comparar os cariótipos de espécies de peixes da família Heptapteridae, coletadas nas bacias do rio Tramandaí e Laguna dos Patos, ambas localizadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.
- ✓ analisar a organização cromossômica por diferentes marcadores citogenéticos, afim de elucidar os padrões de distribuição de diferentes sequencias gênicas.
- ✓ comparar os dados obtidos entre as populações de heptapterídeos das duas bacias, assim como com os dados descritos na literatura, visando compreender os processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica na família, bem como fornecer dados que permitam auxiliar em estudos citotaxonômicos das espécies estudadas.

3 ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETA

Para este estudo foram analisadas cinco espécies de peixes da família Heptapteridae, pertencendo a três diferentes gêneros: *Heptapterus*, *Rhamdella* e *Pimelodella* (figura 1).

Estes exemplares foram coletados no Rio Grande do Sul, estado brasileiro que possui um sistema hídrico muito rico, onde se encontram a Bacia do Tramandaí e Bacia Hidrográfica da Laguna dos Patos (figura 2)

Na Bacia do Tramandaí foram coletadas as seguintes espécies:

- Rio Maquiné: *Rhamdella* sp e *Heptapterus* sp A
- Lagoa dos Quadros: *Pimelodella australis*

Na bacia Hidrográfica da Laguna dos Patos foram coletadas três espécies:

- Arroio Colombo: *Heptapterus mustelinus*
- Arroio Ribeiro: *Pimelodella australis*
- Rio Forquetinha: *Rhamdella aeriarchae* *Heptapterus mustelinus*

Figura 1 – Fotos de exemplares das espécies estudadas: *Heptapterus mustelinus*(a), *Heptapterus* sp A (b), *Rhamdella eriarcha* (c), *Rhamdella* sp (d), *Pimelodella australis* (e). A foto de *P. australis* foi cedida pelo prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba. (barra = 10 mm)

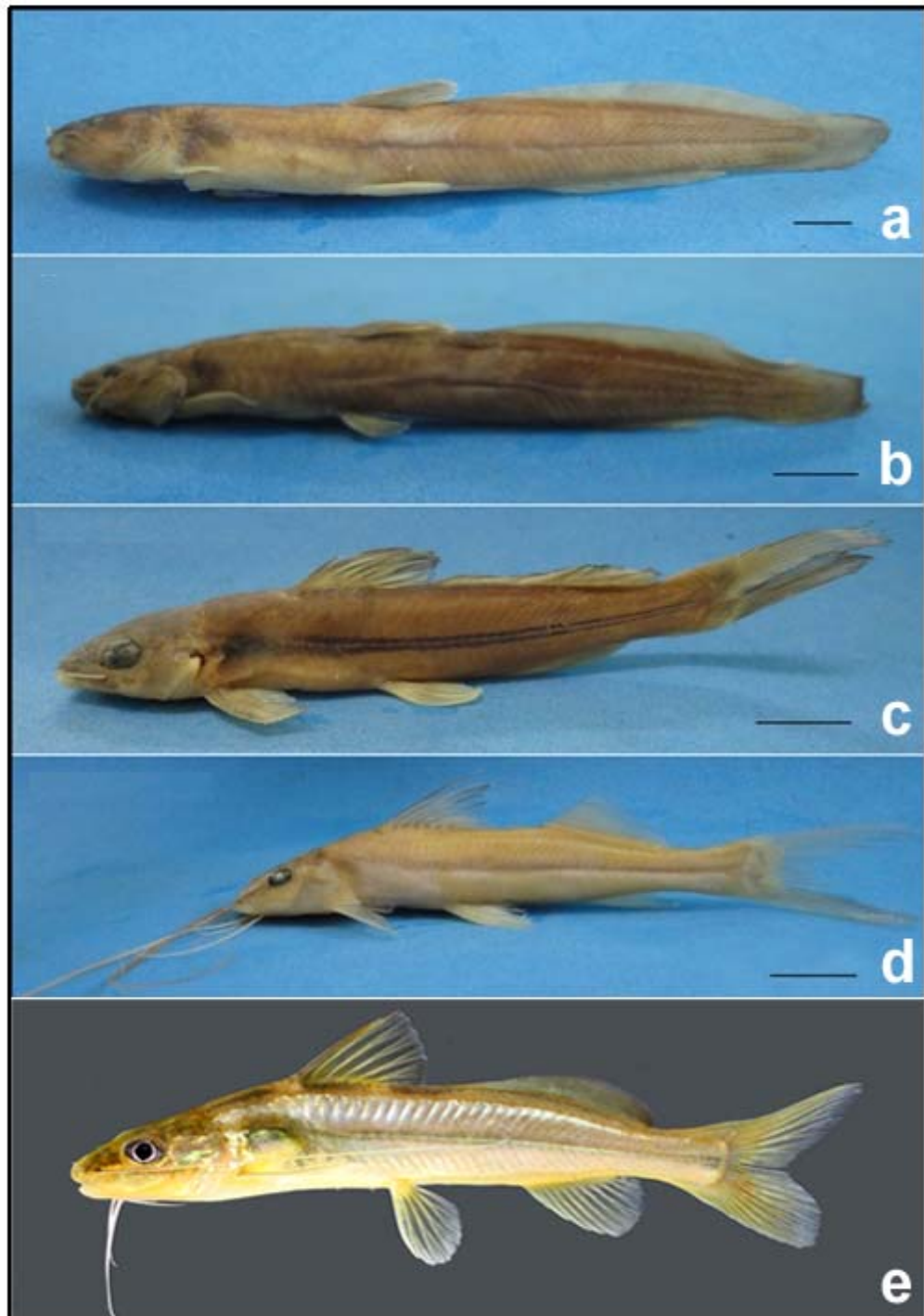
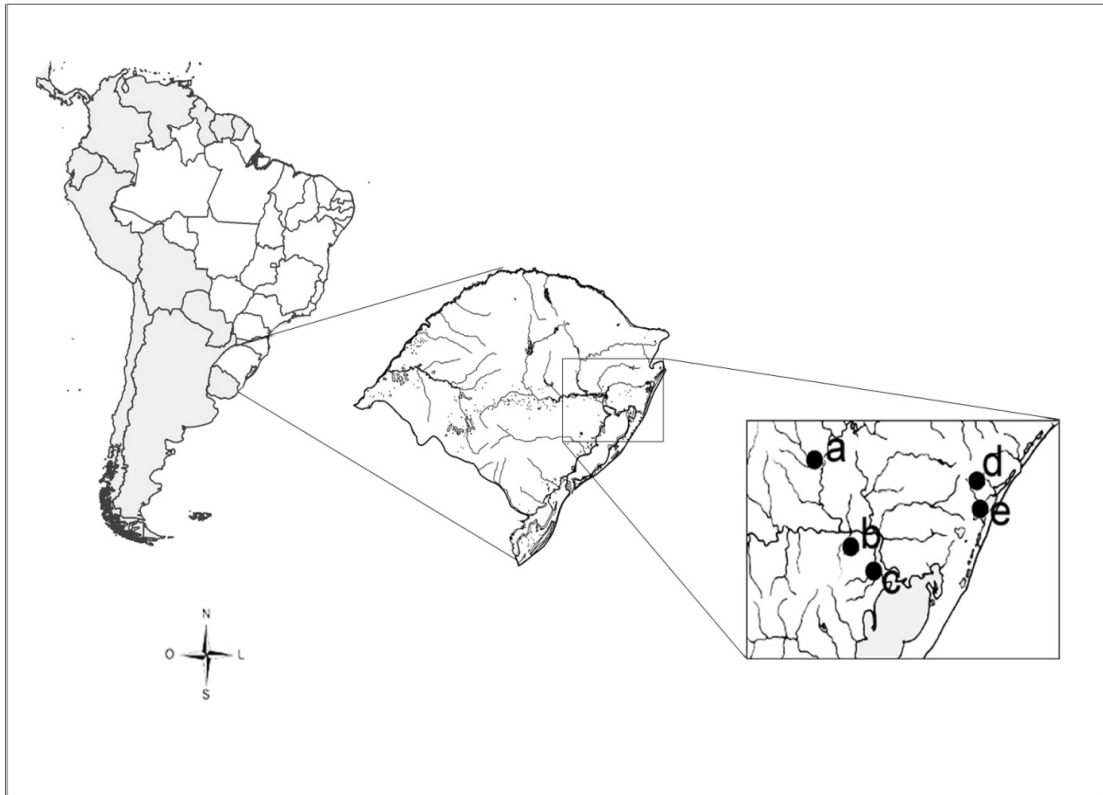


Figura 2 – Mapa da América do Sul evidenciando o estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os boxes indicam os locais de coleta: a) Rio Forquetinha, b) Arroio Colombo, c) Arroio Ribeiro, d) Rio Maquiné, e) Lagoa dos Quadros.



REVISÃO DA LITERATURA

CAPÍTULO I

**NOVO LEVANTAMENTO DE DADOS CITOGENÉTICOS EM
ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIAHEPTAPTERIDAE***

* Este capítulo será enviado para Journal of Fish Biology

NOVO LEVANTAMENTO DE DADOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE

Vivian P. O. de Moraes-Manécolo; Juceli G. Gouveia; Ana Lucia Dias*

RESUMO:

No presente estudo foram organizados dados citogenéticos da literatura, envolvendo 31 espécies de oitos gêneros da família Heptapteridae. Foram observadas diferenças de número diploide entre as espécies analisadas, no entanto, ficou evidente a predominância de citótipos com $2n$ maior que 52 para a maioria dos exemplares, com exceção do gênero *Pimelodella*, onde 46 cromossomos foi o número mais frequente. A presença de cromossomos B, sistemas de cromossomos sexuais, bem como casos de triploidia foram descritos nesta família. Além destes, outros dados relevantes como o padrão das AgRONS, localização dos cístrons ribossômicos 18S, 5S e distribuição da heterocromatina foram relatados nos representantes deste grupo de peixes. Os dados apresentados evidenciaram um aumento considerável de espécies e novas populações analisadas, desde a última revisão feita na família Heptapteridae, e mais uma vez confirmam a presença de uma ampla variabilidade cariotípica na família que podem estar sendo gerada por eventos evolutivos distintos.

Palavras-chave: Dados cariotípicos. Heptapteridae. Siluriformes.

* Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná CEP 86051-970, Brasil
Autor Correspondente: A.L. Dias; e-mail: anadias@uel.br, Telefone e Fax: +55 043 33714417

INTRODUÇÃO

A ordem Siluriformes é formada por peixes de água doce com ampla distribuição por toda a região Neotropical. Segundo levantamento realizado por Ferraris (2007), fazem parte desta ordem cerca de 3088 espécies reconhecidas como válidas, distribuídas em 477 gêneros e 36 famílias. Dentre as famílias que compõem os Siluriformes encontra-se a família Heptapteridae, formada por peixes de pequeno porte organizados em 24 gêneros (Ferraris, 2007) e cerca de 207 espécies válidas (Eschemeyer, 2014). Estudos morfológicos e filogenéticos envolvendo representantes desta família confirmam o monofiletismo da mesma, e a incluem na Superfamília Pimelodoidea Swainson 1838 juntamente com as famílias Pimelodidae e Pseudopimelodidae e o gênero *Conorhynchos* (Sullivan *et al.*, 2006).

Estudos citogenéticos envolvendo exemplares da família Heptapteridae vem sendo realizados desde a década de 70, quando Toledo e Ferrari (1976) descreveram o número diploide em exemplares de *Rhamdia hilarii*. Desde então, muitas outras espécies vem sendo analisadas e, com o aperfeiçoamento das técnicas de citogenética clássica e molecular, novos dados têm sido obtidos, demonstrando variabilidade cariotípica neste grupo de peixes.

Swarça *et al.* (2007) realizaram um levantamento de dados citogenéticos em exemplares da família Heptapteridae e, desde então novos estudos foram realizados envolvendo espécies e/ou populações deste grupo de peixes. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi realizar, uma atualização dos dados citogenéticos obtidos para esta família, de modo que seja possível inferir sobre sua evolução e estruturas cariotípicas.

MATERIAL E MÉTODO

Para a realização desta revisão, dados citogenéticos foram coletados em artigos científicos (tabela I). Os dados considerados relevantes para esta análise foram número diploide, número fundamental, o tipo de cromossomo que compõe os kariogramas de cada espécie, presença de sistemas de cromossomos sexuais, bem como de cromossomos supranumerários ou Bs, além da distribuição da heterocromatina e localização das regiões organizadoras de nucléolos e dos cístrons ribossômicos 18S e 5S.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados cariotípicos foram comparados em oito dos 26 gêneros da família Heptapteridae: *Cetopsorhamdia*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Phenacorhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia* e *Taunaya*, onde é possível notar maior frequência de estudos nos gêneros *Rhamdia* e *Pimelodella* em menor quantidade nos demais gêneros, sendo que em *Heptapterus*, *Phenacorhamdia*, *Rhamdella* e *Taunaya* as análises restringem-se a apenas uma população, como relacionado na tabela I.

Apesar dos poucos gêneros analisados observa-se uma grande variação em relação ao número diploide, com algumas particularidades em alguns gêneros. O menor número diploide foi obtido por Margarido e Moreira-Filho (2008) em uma população de *Imparfinis hollandi* Haseman, 1911 do Rio Iguaçu, onde os pesquisadores encontraram $2n=42$ e o maior $2n$ foi descrito por Toledo e Ferrari (1976) em *Rhamdia hilarii* (Valenciennes 1840) com $2n=62$. Embora seja nítida esta amplitude do $2n$, nota-se que em sete destes oitos gêneros, $2n$ maior ou igual a 52 é o mais recorrente, mesmo para os gêneros onde há apenas um relato (tabela I). Nos gêneros *Cetopsorhamdia* e *Rhamdia* ocorre uma constância com $2n=58$ em seus exemplares. No gênero *Imparfinis* é possível observar este mesmo número de cromossomos para a maioria das espécies/populações estudadas, sendo que apenas três das 20 populações apresentaram número inferior à 58: *I. hollandi* com $2n=42$ (Margarido e Moreira-Filho, 2008), *I. borodini* Mees & Calas, 1989 com $2n=52$ (Vissotto *et al.*, 1999b) e *Imparfinis cf piperatus* Eigenmann & Norris, 1900 com $2n=56$ (Vissotto *et al.*, 2001 e Fenocchio *et al.*, 2003a). Outra particularidade em relação ao número diploide pode ser encontrada em *Pimelodella*, onde o número diploide mais recorrente é 46, sendo observado em 87% das 23 populações estudadas. Nota-se, também, que o cariótipo dos exemplares da família Heptapteridae é constituído, em sua maioria, por cromossomos com dois braços – metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, caracterizando um número fundamental elevado (>80). Além deste fato, observa-se diversidade na composição dos citótipos, mesmo em espécies que mantêm o número diploide constante, como em *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824 (tabela I), o que pode indicar, que rearranjos cromossômicos, do tipo inversão pericêntrica, são os mecanismos mais atuantes na diferenciação cromossômica nesta família.

Sullivan *et al.* (2006) em sua pesquisa utilizando genes nucleares *rag1* e *rag2* evidenciaram que as famílias Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Heptapteridae são grupos irmãos. Swarça *et al.* (2007) em sua revisão observaram que os exemplares da família Pimelodidae apresentam $2n=56$ e que em Pseudopimelodidae $2n=54$ é característico da

família. Mais recentemente, Gouveia *et al* (2014) realizando estudos citogenéticos com exemplares da família Pseudopimelodidae confirmaram esta conservação do número diplóide. Embora haja variação de $2n$ em Heptapteridae, o fato deste se manter constante em seus grupos irmãos pode ser um indício de que o $2n$ basal em Heptapteridae possivelmente é superior a 50 e que o $2n=46$ em *Pimelodella* pode ser um evento apomórfico.

No gênero *Rhamdia*, embora a quantidade de cromossomos seja bem conservada ($2n=58$), polimorfismos numéricos foram observados, revelando a capacidade de adaptação deste gênero. Há relatos de triploidia em exemplares deste grupo como *R. quelen* do Ribeirão Lindóia/PR (Tsuda *et al.*, 2010), *R. quelen* da Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR (Silva *et al.*, 2011) e em *Rhamdia* sp. do Ribeirão Grande/SP (Garcia *et al.*, 2003). Cromossomos supranumerários ou Bs também são recorrentes neste gênero, tendo sido encontrados em diversas populações (tabela I). Além deste gênero, a presença de cromossomo B também foi descrita em *Pimelodella* sp (Garcia e Almeida-Toledo, 2010).

Sistemas de cromossomos sexuais são poucos comuns em exemplares de heptapterídeos. Os dois únicos casos confirmados foram observados em *Pimelodellaboschmai* Van der Stigchel, 1964 (Garcia e Almeida-Toledo, 2010) e *Pimelodella* sp (Dias e Foresti, 1993), sendo que em ambas populações o sexo heterogamético foi observado nos machos, determinando portanto, um sistema cromossômico sexual XX/XY.

O padrão de distribuição das regiões organizadoras de nucléolo aparenta obedecer a um padrão simples, onde pode-se notar, para a maioria das espécies estudadas, apenas um par portador dos cístrons ribossômicos 18S e localizado, preferencialmente, na região terminal (tabela I), podendo ser esta uma característica pleisiomórfica para o grupo. Entretanto, nos gêneros *Imparfinis* e *Cetopsorhamdia*, a RON localiza-se em posição intersticial no braço longo do cromossomo portador desta região, indicando ser uma característica mais recente e que se fixou nestes gêneros. Estes fatos dão indícios de que rearranjos cromossômicos, do tipo inversão paracêntrica e/ou pericêntrica, fazem parte da dinâmica evolutiva nesta família e que vem contribuindo para a diferenciação de alguns gêneros.

Exceções ao padrão de RONS simples foram observadas em duas espécies do gênero *Rhamdia*: *R. branneri* Haseman, 1911b e *R. voulezi* Haseman, 1911b (Abucarma e Martins-Santos, 2001) e, mais recentemente, em *Heptapterus mustelinus* Valenciennes, 1835 (Yano e Margarido, 2012), onde foram evidenciados mais de um par cromossômico portador das RONS.

A localização dos cístrons ribossômicos 5S tem sido relatada em três dos oito gêneros analisados citogeneticamente. Em exemplares de *Rhamdia*, das 60 populações estudadas, 20

apresentam dados sobre a localização desta sequência (33,3%), sendo 18 populações de *Rhamdia quelen* e duas populações de *Rhamdia* sp. Em todas foi identificado apenas um par portador do DNAr 5S porém, em 14 populações de *R. quelen* estudadas por Garcia *et al.* (2010) e em duas populações de *Rhamdia* sp. descritas por Garcia *et al.* (2003) esta sequência localiza-se na região pericentromérica, em duas populações de *R. quelen* analisadas por Martinez *et al.* (2011) a sequência foi identificada em posição intersticial, já em outras duas populações de *R. quelen* estudadas por Silva *et al.* (2011) foi observada em posição terminal.

No gênero *Pimelodella*, sete das 10 espécies estudadas apresentam dados de hibridização com sonda de DNAr 5S, totalizando 12 das 23 populações estudadas (52%). Das cinco espécies descritas por Garcia e Almeida-Toledo (2010), três possuem marcação terminal e uma espécie marcação pericentromérica em apenas um par (tabela I). Os exemplares de *P. gracilis* Eigenmann, 1917 e *Pimelodella* sp apresentaram padrão distinto, sendo que na primeira espécie dois pares apresentaram sítio de DNAr 5S em posição terminal e um cromossomo marcação intersticial; e na segunda espécie três cromossomos apresentavam este sítio em posição terminal. Dazzani *et al.* (2012) analisaram seis populações deste mesmo gênero e detectaram em todas elas o sítio de DNAr5S em posição terminal no entanto, em *P. laurenti* Fowler, 1941 e em *Pimelodella* sp. (coletadas em Colina, Guapiara e Pirassununga) este DNAr foi visualizado em apenas um par de cromossomos, enquanto que em *Pimelodella* sp. (Botucatu) e em *P. spelaea* Trajano, Reis & Bichuette, 2004 esta sequência foi identificada em dois pares de cromossomos. A única descrição para localização de DNAr 5S em *Imparfinis schubarti* Gomes, 1956 foi realizada por Kantek *et al.* (2009) que identificaram esta sequência em sintenia com a sonda de DNAr 18S, localizadas no braço longo do par 10 (m).

A heterocromatina apresenta-se, principalmente, nas regiões terminais (ou teloméricas), centroméricas ou ainda pericentroméricas, sendo geralmente distribuída em blocos discretos (tabela I). No entanto, Gouveia *et al.* (2012) analisando exemplares de *Imparfinis mirini* Haseman, 1911 e *I. schubarti* observaram que estas espécies apresentam um grande bloco heterocromático no braço longo do par 1 (m), coincidente com a constrição secundária e que, além deste bloco, em *I. mirini* dos cromossomos do par 19 (sm) apresentavam-se completamente heterocromático apenas nos indivíduos machos. Segundo estes mesmos autores, este tipo de polimorfismo pode ser importante para o processo de evolução e diferenciação cromossômica destas espécies.

Desde a revisão realizada por Swarça *et al.* (2007), uma contribuição significativa para o aumento de dados citogenéticos para a família Heptapteridae pode ser notado. Em 2007,

estes autores relataram estudos cromossômicos em 77 populações de 29 espécies, sendo sete os gêneros estudados. Atualmente, este número aumentou para 113 populações de 30 espécies alocadas em oito gêneros distintos, ou seja, um aumento de 31,85% em relação ao número de populações. Embora a família Heptapteridae seja composta por 207 espécies válidas, somente 31 delas apresentam estudos citogenéticos, ou seja, apenas 15% deste total, evidenciando a necessidade de mais pesquisas voltadas para este grupo de peixes. Apesar disso, os dados apresentados acima revelam e confirmam uma ampla variedade cariotípica na família e que, eventos evolutivos que geram rearranjos cromossômicos estão ocorrendo de forma dinâmica neste grupo de peixes.

Tabela I – Dados citogenéticos em espécies da família Heptapteridae. *m*metacêntrico; *sm* submetacêntrico; *st* subtelocêntrico; *a* acrocêntrico; *p* braço curto; *q* braço longo; *2n*número diplóide; *Bs* cromossomo supranumerário; *crs* cromossomo; *NF*número fundamental; *BC*banda C; *RON*região organizadora de nucléolo; *Lg* lagoa; *R* rio; *Rb* ribeirão; *Rv* reservatório. * NF recalculado pelos autores, onde cromossomos metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com dois braços e subtelocêntricos e acrocêntricos como portadores de um braço.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	Bs	NF	RON	rDNA 18S	rDNA 5S	BC	Referência
<i>Cetopsorhamdia</i>										
<i>C. iheringi</i>	R. Capivara/SP	58	28m+24sm+6st	-	110*	1 par sm, q, intersticial	-	-	Centroméricas e teloméricas	Vissotto <i>et al.</i> (1999b)
<i>C. iheringi</i>	R.Pardo/SP	58	28m+24sm+6st	-	110*	1 par sm, q, intersticial	-	-	Centroméricas e teloméricas	Vissotto <i>et al.</i> (1999b)
<i>C. iheringi</i>	R. São Francisco/MG	58	22m+16sm+10st+10a	-	96*	1 par sm, q, intersticial	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>C. iheringi</i>	R. das Marrecas/PR	58	22m+16sm+10st+10a	-	96*	1 par sm, q, intersticial	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>Cetopsorhamdia</i> sp.	Rb. Canta Galo/SP	58	22m+16sm+10st+10a	-	96*	1 par m, bloco intersticial	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>Heptapterus</i>										
<i>H. mustelinus</i>	Rb. Pindorama/PR	54	26m +18sm + 4st + 6a	-	98*	Terminal p 1 crs par 2 m, p par 25 a, terminal q 1 crs par 1 m e par 18 sm	-	-	Centroméricas	Yano e Margarido (2012)
<i>Imparfinis</i>										
<i>I. borodini</i> (citado como <i>H. longicauda</i>)	Rb. Quinta/SP	52	22m+26sm+4st	-	100*	1 par m, p e 1 par st, p, terminal	-	-	Centromérica, intersticial e telomérica	Vissotto <i>et al.</i> (1999b)
<i>I. hollandi</i>	Salto Osório, R. Iguaçu/PR	42	22m+10sm+10st	-	74*	Par 18st terminal	-	-	Par 8m e 18st terminal e 12sm intersticial	Margarido e Moreira-Filho (2008)
<i>I. mirini</i>	Rb. Jacutinga/ PR	58	36m + 22sm	-	116*	Construção secundária, q, intersticial par 1	Intersticial q par 1	-	Terminal e intersticial em alguns crs; q par 19 macho	Gouveia <i>et al.</i> (2012)
<i>Imparfinis</i> cf. <i>piperatus</i>	R. Juquiá /SP	56	24m+12sm+20st	-	92*	1 par st, q, intersticial	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>Imparfinis</i> cf. <i>pipetarus</i>	R. Juquiá/SP	56	22m+26sm+4st+4a	-	104*	1 par a, q, intersticial	-	-	Pericentroméricas e teloméricas	Vissotto <i>et al.</i> (2001)
<i>I. piperatus</i>	R. Araras/SP	58	32m+26sm	-	116*	1 par m, q, intersticial	-	-	Pericentroméricas e teloméricas	Vissotto <i>et al.</i> (2001)
<i>I. piperatus</i>	R. Grande/SP	58	26m+22sm+8st+2a	-	106*	1 par m, q, intersticial	-	-	Pericentroméricas e teloméricas	Vissotto <i>et al.</i> (2001)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	Rb.Marrequinhas/ PR	58	28m+28sm+2st	-	114*	1 par m, q, intersticial	1 par m, q,	-	Escassa	Stolf <i>et al.</i> (2004)

							intersticial			
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb Três Bocas/ PR	58	28m+28sm+2st	-	114*	1 par m, q, intersticial	1 par m, q, intersticial	-	Escassa	Stolf <i>et al.</i> (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R. Água da Floresta/PR	58	28m+28sm+2st	-	114*	1 par m, q, intersticial	1 par m, q, intersticial	-	Escassa	Stolf <i>et al.</i> (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R. Vinicius/PR	58	28m+28sm+2st	-	114*	1 par m, q, intersticial	1 par m, q, intersticial	-	Escassa	Stolf <i>et al.</i> (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R. Taquari/PR	58	28m+28sm+2st	-	114*	1 par m, q, intersticial	1 par m, q, intersticial	-	Escassa	Stolf <i>et al.</i> (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R.Jataizinho/PR	58	28m+28sm+2st	-	114*	1 par m, q, intersticial	1 par m, q, intersticial	-	Escassa	Stolf <i>et al.</i> (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb. Canta Galo/SP	58	22m+18sm+10st+8a	-	98*	1 par m, q, intersticial	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb. Três Bocas/PR	58	22m+18sm+10st+8a	-	98*	1 par m, q, intersticial	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>I.cf. schubarti</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	24m+22sm+12st	-	104*	Par 14 sm, q, intersticial	Par 14 sm, q, intersticial	-	Intersticial par da RON e centrômeros de dois pares de crs	Borba <i>et al.</i> (2011)
<i>I.schubarti</i>	Drenagem Piumhi/MG	58	18m+34sm+6st	-	110*	Construção secundária, par 10, q, intersticial	Construção secundária, par 10, q, intersticial	Sintênica 18S Construção secundária, par 10, q, intersticial	Baixa quantidade, q intersticial no par da construção	Kantek <i>et al.</i> (2009)
<i>Imparfinis schubarti</i>	Rb. Três Bocas/PR	58	30m + 28sm	-	116*	Construção secundária, q, intersticial par 1	Intersticial q par 1	-	Terminal e intersticial em alguns crs	Gouveia <i>et al.</i> (2012)
<i>Imparfinis schubarti</i>	Rio Laranjinha/PR	58	30m + 28sm	-	116*	Construção secundária, q, intersticial par 1	Intersticial q par 1	-	Terminal e intersticial em alguns crs	Gouveia <i>et al.</i> (2012)
<i>Phenacorhamdia</i>										
<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	30m+22sm+6st	-	110*	Par 16 sm, q, terminal	-	-	Presentes em 4 pares de crs	Borba <i>et al.</i> (2011)
<i>Pimelodella</i>										
<i>P. avanhandavae</i>	R. Araquá/SP	46	20m+20sm+6st	-	86*	1 par st, p, terminal	-	-	Centroméricas	Vissotto <i>et al.</i> (1999b)
<i>P.avanhandavae</i>	R.Capivara/SP	46	20m+20sm+6st	-	86*	1 par st, p, terminal	-	-	Centroméricas	Vissotto <i>et al.</i> (1999b)
<i>Pimelodella aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	30m+22sm	-	104*	1 par m, p, terminal	-	-	Centromérica e telomérica	Swarça <i>et al.</i> (2003)
<i>P. boschmai</i>	Mogi-Guaçu Araras/SP	46	38m+8sm XY/XX	-	84*	Par 21, sm, p terminal	Par 21, p terminal	Par 20 sm, p, terminal	Centromérica e telomérica	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. gracialis</i>	Paraná Mariápolis/SP	46	34m+12sm	-	92*	Par 18, sm, p terminal	Par 18, p terminal	Pares 18 e 22 sm, p, terminal, 1 crs par 19, q, intersticial	Intersticial	Garcia; Almeida-Toledo (2010)

<i>P. griffini</i>	R. Miranda/MS	46	38 m-sm + 8 st-a	-	84*	-	-	-	-	Souza-Shibatta <i>et al.</i> (2013)
<i>P. meeki</i>	R. Limoeiro/PR	46	30m+12sm+4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	-	-	Vidotto <i>et al.</i> (2004)
<i>P. meeki</i>	R. Couro de Boi/PR	46	30m+12sm+4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	-	-	Vidotto <i>et al.</i> (2004)
<i>P. meeki</i>	R. Gabriel da Cunha/PR	46	30m+12sm+4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	-	-	Vidotto <i>et al.</i> (2004)
<i>P. meeki</i>	São Miguel Arcanjo/SP	46	28m+12sm+6st	-	86*	Par 20 sm, p, terminal	Par 20 sm, p, terminal	Par 19, sm, p terminal	Pericentroméricas	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	Pilar doSul/SP	46	28m+12sm+6st	-	86*	Par 20 sm, p, terminal	Par 20 sm, p, terminal	Par 19, sm, p terminal	Pericentroméricas	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	Rb. Jacutinga/PR	46	26m + 14sm + 6st	-	86*	Par 17 sm, p, terminal	Par 17 sm, p, terminal	-	Fracas marcações terminais e pericentroméricas	Gouveia <i>et al.</i> (2012)
<i>P. meeki</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	46	26m+16sm+4st	-	88*	Par 15 sm, q, terminal	Par 15 sm, q, terminal	-	Presentes em 2 pares de crs	Borba <i>et al.</i> (2011)
<i>P. lateristriga</i>	Paraíba do Sul Angra/RJ	58	36m+22sm	-	116*	Par 20, p terminal	Par 20, sm, p terminal	Par 14, m, q, pericentromérica	Pericentroméricas e teloméricas	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. laurenti</i>	Cordisburgo/MG	46	28m + 14sm + 4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p terminal	Pericentromérica	Dazzani <i>et al.</i> , 2012
<i>Pimelodella</i> sp.	R. Mogi-Guaçu/SP	46	40m-sm+6st-a XX/XY	-	86*	1 par m-sm, p, terminal	-	-	-	Dias e Foresti (1993)
<i>Pimelodella</i> sp.1	R. Paraná/PR	46	20m+20sm+6a	-	86*	1 par sm, p, terminal, BC+	-	-	Centroméricas e teloméricas	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodella</i> sp.2	R. Paraná/PR	52	22m+22sm+8st	-	96*	1 par sm, p, terminal, BC+	-	-	Centroméricas e teloméricas	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodella</i> sp.	Pardo Cardoso/SP	46	34m+12sm	4	92*	Par 21, sm, p, terminal e supranumerários	Par 21, sm, p, terminal	Par 22, sm, p, terminal e crs par 6, m, q terminal	Pericentromérica	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella</i> sp.	Botucatu/SP	46	28m +12 sm + 6st	-	86*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	1 par sm, 1 par m, p terminal	Pericentromérica	Dazzani <i>et al.</i> , 2012
<i>Pimelodella</i> sp.	Colina/SP	46	28m +12 sm + 6st	-	86*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p terminal	Pericentromérica	Dazzani <i>et al.</i> , 2012
<i>Pimelodella</i> sp.	Guapiara/SP	46	26m +16 sm + 4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p terminal	Pericentromérica	Dazzani <i>et al.</i> , 2012
<i>Pimelodella</i> sp.	Pirassununga/SP	46	28m +14 sm + 4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p terminal	Pericentromérica	Dazzani <i>et al.</i> , 2012
<i>Pimelodella spelaea</i>	S. Domingos/GO	46	28m +14 sm + 4st	-	88*	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	2 pairs sm, p terminal	Pericentromérica	Dazzani <i>et al.</i> , 2012

<i>P. taenioptera</i>	R. Miranda/ MS	52	42 m-sm + 10 st-a	-	94*	-	-	-	-	Souza-Shibatta <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhamdella</i>										
<i>R. microcephala</i>	R. Machado/MG	56	18m+30sm+8st-a	-	104*	1 par sm, q, intersticial, BC+	-	-	Pericentromérica	Fonseca <i>et al.</i> (2003)
<i>Rhamdia</i>										
<i>R. branneri</i>	Us. Salto Segredo – R. Iguaçú/PR	58	36m+14sm+4st+4a	0-2	108*	1 par a, p e 1 par st, q, terminal	-	-	Teloméricas, intersticial q, pares sm e st	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>R. hilarii</i>	R. Onça/SP	58	36m+18sm+8a	-	116*	-	-	-	-	Toledo e Ferrari (1976)
<i>R. hilarii</i>	Monjolinho/SP	58	-	0-5	>100	1 par, p terminal, BC+	-	-	Escassa	Fenocchio e Bertollo (1990)
<i>Rhamdia cf. hilarii</i>	Rv. Jurumirim/SP; Rb. Quinta/SP; Rb. Jacutinga/SP; Rb. Hortelã/ SP; R. Araquá/SP; R. Pardo/SP	58	30m+18sm+10st	0-3	106*	1 par sm, p, terminal	-	-	Centroméricas	Vissotto <i>et al.</i> (1999a)
<i>R. hilarii</i>	Rv. Lobo/SP	58	-	0-3	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. hilarii</i>	Rv. “29”/SP	58	-	0-5	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. São Francisco/MG	58	-	2	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	-	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-guaçu/SP	58	58m/sm	0-2	116*	1 par m-sm, p, terminal, BC+	-	-	Teloméricas	Maistro <i>et al.</i> (2002)
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	-	100*	1 par a, p, terminal	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>R. laticauda</i>	EUA	58	-	-	100±4	-	-	-	-	Le Grande (1981)
<i>R. quelen</i>	R. Oeste – Cascavel/PR	58	36m+10sm+12st	-	104*	Par 27, st, p terminal	Par 27, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Sangão – Cascavel/PR	58	32m+8sm+12st+6a	0-1	98*	Par 26, st, p terminal	Par 26, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Angra dos Reis/RJ	58	40m+10sm+8st	-	108*	Par 24, sm, p terminal	Par 24, sm, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)

<i>R. quelen</i>	R. São José /RJ	58	36m+14sm+8st	0-1	108*	Par 27, st, p terminal	Par 27, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Paraíba do Sul/RJ	58	36m+14sm+8st	0-1	108*	Par 27, st, p terminal	Par 27, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Araras/SP	58	40m+10sm+8st	0-5	108*	Par 24, sm, p terminal	Par 24, sm, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Capivra-Botucatu/SP	58	44m+12sm+2st	0-1	114*	Par 26, sm, p terminal	Par 26, sm, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Colina/SP	58	36m+10sm+12st	0-5	104*	Par 27, st, p terminal	Par 27, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Guapiara/SP	58	36m+10sm+12st	-	104*	Par 27, st, p terminal	Par 27, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Iguapé/SP	58	36m+10sm+12st	-	104*	Par 27, st, p terminal	Par 27, st, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Passa Cinco – Ipeúna/SP	58	34m+16sm+8st	0-4	108*	Par 24, sm, p terminal	Par 24, sm, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Fortuna – Mariápolis/SP	58	40m+10sm+8st	0-1	108*	Par 24, SM, p terminal	Par 24, sm, p terminal	Pericentromérica em 1 par m,q, e 1 par st, p	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Piquete/SP	58	40m+10sm+8st	0-2	108*	Par 24, sm, p terminal	Par 24, sm, p terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Sto. Antônio do Pinhal/SP	58	30m+14sm+12st+2a	0-2	102*	Par 27, a, p, terminal	Par 27, a, p, terminal	1 par m,q, pericentromérica	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Lg. dos Quadros/RS	58	52m/sm/st+6a	0-2	110	1 par a, p, terminal	-	-	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>R. quelen</i>	R.Guaíba/RS	58	52m/sm/st+6a	0-2	110	1 par a, p, terminal	-	-	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>R. quelen</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	4	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. quelen</i>	R.Iguaçu/SC	58	-	0-1	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
<i>R. quelen</i>	R.Paraná/Ar	58	-	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Restringia-se a RON	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)

<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	-	100*	1 par a, p, terminal	-	-	-	Fenocchio <i>et al.</i> (2003a)
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	0-1	106*	1 par st, p, terminal,	-	-	Teloméricas	Fenocchio <i>et al.</i> (2003b)
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	-	106*	1 par st, p, terminal, BC+	-	-	Teloméricas	Swarça <i>et al.</i> (2003b)
<i>R. quelen</i>	R. Taquarussu/PR	58	26m+20sm+6st+6a	1-4	104*	1 par st, p, terminal	-	-	Teloméricas e centroméricas	Stivari e Martins-Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	Rb. Maringá/PR	58	26m+22sm+6st+4a/ 26m+24sm+8st	-	106* 108*	1 par sm, p, terminal	-	-	Teloméricas e centroméricas	Stivari e Martins-Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	58	30m+14sm+10st+4a	-	102*	1 par sm, p, terminal	-	-	Teloméricas e centroméricas	Tsuda <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	3n=8 7	45m+21sm+15st+6a	-	153*	1 par sm, p, terminal	-	-	Teloméricas e centroméricas	Tsuda <i>et al.</i> (2010)
<i>R. quelen</i>	Serra da Bodoquena/MS	58	36m+16sm+6st	0-3	110*	Par 20, p terminal	-	-	Pericentroméricas e teloméricas	Moraes <i>et al.</i> (2007)
<i>R. quelen</i>	Água dos Patos/SP	58	36m+16sm+6st	0-2	110*	-	-	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes <i>et al.</i> (2009)
<i>R. quelen</i>	Água das Pedras/PR	58	36m+16sm+6st	0-2	110*	-	-	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes <i>et al.</i> (2009)
<i>R. quelen</i>	Taquari/PR	58	36m+16sm+6st	0-2	110*	-	-	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes <i>et al.</i> (2009)
<i>R. quelen</i>	FUNPIVI/SC	58	36m+16sm+6st	0-2	110*	-	-	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes <i>et al.</i> (2009)
<i>R. quelen</i>	Mogi-Guaçu	58	22m+18sm+12st+6a	-	98*	1 par a, p terminal	1 par a, p terminal	Par 14, sm, q intersticial	Terminais e pericentroméricas	Martinez <i>et al.</i> (2011)
<i>R. quelen</i>	Araguaia	58	18m+18sm+14st+8a	1-5	94*	1 par a, p terminal	1 par a, p terminal	Par 10, sm, p, intersticial	Terminais e pericentroméricas	Martinez <i>et al.</i> (2011)
<i>R. quelen</i>	Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	58	38m/sm+14st+6a	-	96*	1 par st, p terminal	1 par st, p terminal	1 par, p terminal	Telomérica e bitelomérica	Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>R. quelen</i>	Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	3n=8 7	57m/sm+21st+9a	-	144*	3 cromossomos st, p terminal	3 crs st, p terminal	3 crs, p terminal	Telomérica e bitelomérica	Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>R. quelen</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	32m+18sm+8st	2	116*	Par 18 sm, q, terminal	Par 18 sm, q, terminal	-	Terminais e centroméricas e B heterocromático	Borba <i>et al.</i> (2011)
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires/Ar	58	44 m/sm + 14st/a	0-1	102*	-	-	-	-	Valcarcel <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhamdia</i> sp.	EUA	58	-	-	100±4	-	-	-	-	Le Grande (1981)
<i>Rhamdia</i> sp.	Us. Salto Segredo–R. Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	0-2	108*	1 par a, p, terminal	-	-	Teloméricas e centroméricas	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>Rhamdia</i> sp.	Rb. Grande	58	46m/sm+12st/a	0-4	104*	1 par st, p, terminal	1 par st, p, terminal	1 par m/sm, pericentromérica	Centroméricas e teloméricas	Garcia <i>et al.</i> (2003)
<i>Rhamdia</i> sp.	Rb. Grande/SP	3n=8 7	69m/sm+18st/a	-	156*	1 par st, p, terminal	1 par st, p, terminal	1 par m/sm, pericentromérica	Centroméricas e teloméricas	Garcia <i>et al.</i> (2003)

<i>R. voulezi</i>	Us. Salto Segredo – R.Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	0-2	108*	1 par a, p e 1 par st, q, terminal	-	-	Teloméricas e centroméricas	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>Taunaya</i>										
<i>Taunaya bifasciata</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	20m+18sm+20st	-	96*	Par 23 sm, q, intersticial	Par 23 sm, q, intersticial	-	Terminais e centroméricas	Borba <i>et al.</i> (2011)

REFERÊNCIAS

- Abucarma, M., Martins-Santos, I.C. (2001) Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçú Basin. *Cytologia* **66**: 299-306.
- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Trajano, E., Toledo-Filho, S.A.(1992) Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* **45**: 255-262.
- Bockmann, F. A., Guazzelli, G.M.(2003) Family Heptapteridae. In *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*.(Reis, R.E.,Kullander,S.O.,Ferraris Jr.,C.J), pp. 406-431, Porto Alegre RS, Edipurcs.
- Borba, R.S., Silva, E.L., Pacheco, A.C.S., Parise-Maltempi, P.P., Alves, A.L. (2011) Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **22**: 509-518, 2012. doi 10.1007/s11160-011-9245-3
- Dazzani, B., Garcia, C., Peixoto,M., Trajano, E., Almeida-Toledo, L.F.. (2012) Cytogenetic and molecular analyses in troglotic and epigeal species of *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotropical Ichthyology***10**(3): 623-632.
- Dias, A.L., Foresti, F. (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética***16**(3):585-600.
- Eschmeyer, W. N. (ed).(2013) Catalog of fishes: genera, species, references.Available at <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>(lastaccessed 02 November 2013)
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. (1990) Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica***81**: 193-198.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C., Takahashi, C., Camacho, J.P. (2000) Considerations on B-chromosome origin and distribution in fish populations of the genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica* **48**:105-109.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Dias, A.L., Swarça, A.C. (2003a) Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia***68**(4): 363-368.
- Fenocchio, A.S., Swarça, A.C., Cestari, M.M., Dias, A.L. (2003b) Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguaçú River (Brazil). *Folia biológica(Kraków)***51**: 3-4.
- Ferraris, C.J.JR. (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types.*Zootaxa* pp. 180-203, pp. 352-356.
- Fonseca, Y.M., Oliveira, C., Foresti, F., Maistro, E.L. (2003) First Cytogenetic Description of the Species *Rhamdella microcephala* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia***68**(1): 31-34.

- Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C., Centofante, L. B (2003) Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia sp.* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia***68**(4): 403-411.
- Garcia, C., Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F. (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research***9**(1): 365-384.
- Garcia, C., Almeida-Toledo, L. F. (2010) Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia***63**(1): 32-40.
- Gouveia, J.G., Moraes, V.P.O., Sampaio, T.R., Da Rosa, R., Dias, A.L.(2012) Considerations of karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, doi 10.1007/s11160-012-9286-2
- Gouveia, J.G., Moraes, V.P.O., Pires, L.P., Da Rosa, R., Dias, A.L. (2014) Comparative cytogenetics between two species of the family Pseudopimelodidae (Siluriformes): occurrence of natural triploidy and supernumerary chromosomes. *Cytotechnology*doi 10.1007/s10616-013-9676-x
- Hochberg, V.B.M., Erdtmann, B.(1988) Cytogenetical and Morphological Considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) – The Occurrence of B Chromosomes and Polymorphic NOR Regions. *Revista Brasileira de Genetica* **11**(3): 563-576.
- Kantek, D. L. Z., Peres, W, A. M., Buckup, P. A., Moreira-Filho, O.(2009) Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainage, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *Zoologia***26**(4): 733-738.
- Le Grande, W. H.(1981) Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, *Noturus*. *Copeia***1**: 33-52.
- Maistro, E.L., Oliveira, C., Foresti, F.(2002) Cytogenetic Analysis of A- and B Chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, Silver Nitrate and CMA₃ Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia***67**: 25-31.
- Margarido, V. P., Moreira-Filho, O. (2008) Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology***31**(1): 235-238.
- Martinez, J.F., Lui, R.L., Blanco, D.R., Traldi, J.B., Silva, L.F., Venere, P.C., Souza, I.L., Moreira-Filho, O. (2011)Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia***64**(1): 121-128.
- Moraes, V. P. O., Cereali S. S., Froehlich, O., Dias, A. L.(2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Genetics and Molecular Research***6**(3): 627-633.

- Moraes, V. P. O., Carneiro, J. S., Dias, A. L. (2009) Intraspecific chromosome analysis in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Cybium***34** (4): 397-398.
- Silva, M., Matoso, D.A., Ludwig, L.A., Gomes, E., Almeida, M.C., Vicari, M.R., Artoni, R.F. (2011) Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. *Environment Biology of Fishes* **91**:361-366. doi 10.1007/s10641-011-9794-2
- Souza-Shibatta, L., Pezenti, L.F., Ferreira, D. G., Almeida, F.S., Sofia, S.H., Shibatta, O. A. (2013) Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology***11** (1): 100-109.
- Stivari, M.K., Martins-Santos, I.C.(2004) Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia***69**(1): 25-34.
- Stolf, R., Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L., Dias, A.L.(2004) Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Parana', Brazil. *Caryologia***57** (4): 348-352.
- Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., Hardman, M. (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution***41**: 636-662.
- Swarça, A.C., Vidotto, A.P., Dias, A.L. (2003a) Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia***56**(4): 421-425.
- Swarça, A.C., Fenocchio, A.S., Cestari, M.M., Dias, A.L. (2003b) Analysis of the heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica***119**:87-92.
- Swarça, A.C., Fenocchio, A.S., Dias, A.L. (2007) An update cytogenetic review for species of the families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). suggestion of a cytotaxonomical classification. *Caryologia***60**(4), 2007.
- Todelo, V., Ferrari, I. (1976) Estudo citogenético em *Pimelodella* sp e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica***4**:120-123.
- Tsuda, J.R., Moraes, V.P.O., Giuliano-Caetano, L. Dias, A.L.(2010) Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research***9** (3): 1929-1935.
- Valcarcel, A., Brunner, P., Maggese, M. C.(1993) B- chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture***110**:111-118.
- Vasconcelos, C., Martins-Santos, I.C. (2000) Chromosome Polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas***132**: 103-109.
- Vidotto, A. P., Swarça, C., A, Fenocchio, A. S., Dias, A. L. (2004) Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity***95**(6):517-520.

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

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

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

Yano, C.F., Margarido, V. P. (2012) First cytogenetic studies of the genus *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): karyotype differentiation and review of cytogenetic data on the Heptapteridae family. *Journal of Fish Biology***81**: 939-953.

CAPÍTULO 2

**DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM *HEPTAPTERUS*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), COM ÊNFASE PARA
A LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE GENES
RIBOSSOMAIS 18S E 5S***

* Este artigo será enviado para Genetica

DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM *HEPTAPTERUS*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), COM ÊNFASE PARA A
LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE GENES RIBOSSOMIAIS 18S E
5S.

Vivian P. O. de Moraes-Manécolo; Juceli G. Gouveia; Ana Lucia Dias*

RESUMO:

Duas espécies do gênero *Heptapterus*, de três localidades distintas do Rio Grande do Sul/Brasil foram analisadas, sendo identificado $2n=54$ ($32m+8sm+10st+4a$) em *H. mustelinus* coletada no Arroio Colombo e $2n=58$ ($32m+12sm+4st+10a$) em *H. mustelinus* do Rio Forquetinha e *Heptapterus* sp A coletada no Rio Maquiné. Os cistrons ribossômicos 18S apresentaram-se em quatro cromossomos nos exemplares de *H. mustelinus* das duas populações, enquanto que em *Heptapterus* sp A foram visualizados em apenas um par de cromossomos. A hibridação com sonda de DNA r 5S revelou, para as duas populações de *H. mustelinus*, apenas um par de cromossomos portador desta sequência, localizada na região terminal na população do Arroio Colombo e em posição intersticial na população do Rio Forquetinha; em *Heptapterus* sp A este sítio foi observado em apenas um cromossomo, em região intersticial. A coloração com fluorocromos base específicos evidenciou regiões ricas em G-C nas porções terminais dos braços de alguns cromossomos e intersticial no par 26 das populações de *H. mustelinus*, no entanto apenas um par portador de região CMA_3^+ foi visualizado em *Heptapterus* sp A. A heterocromatina localizada na região terminal dos cromossomos nas duas populações de *H. mustelinus* apresentou-se rica em bases G-C, porém a que estava localizada na região centromérica mostrou-se rica em pares A-T na população do Arroio Colombo, enquanto que na população de *H. mustelinus* do rio Forquetinha a heterocromatina estava composta por pares de base G-C e A-T. Em *Heptapterus* sp A, notou-se que algumas regiões heterocromáticas terminais mostraram-se $CMA_3^+/DAPI^+$ e, outras regiões mostraram-se compostas apenas por bases A-T. Estes dados revelam que um processo de diferenciação cariotípica ocorreu entre as espécies e populações do gênero *Heptapterus* analisadas neste trabalho, e que a associação de dados citogenéticos com dados filogenéticos podem fornecer informações que irão auxiliar na compreensão dos processos evolutivos que agem sobre este grupo de peixes.

Palavras-chave: Descrição cariotípica. *Heptapterus* (Siluriformes). Genes ribossomiais. Heterocromatina.

* Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná CEP 86051-970, Brasil
Autor Correspondente: A.L. Dias; e-mail: anadias@uel.br, Telefone e Fax: +55 043 33714417

INTRODUÇÃO

A ordem Siluriformes é formada por peixes com ampla distribuição por toda a região Neotropical, sendo composta por 3088 espécies consideradas válidas distribuídas em 477 gêneros e 36 famílias (Ferraris, 2007). Dentre as famílias que compõem esta ordem encontra-se a família Heptapteridae que, segundo levantamento recente, inclui 207 espécies válidas (Eschemeyer, 2013) agrupadas em 26 gêneros (Bockmann e Guazelli, 2003). Seus representantes possuem o corpo coberto por couro e são de pequeno porte (cerca de 20 centímetros de comprimento).

Estudos citogenéticos foram realizados, até o momento, em oito gêneros desta família: *Cetopsorhamdia*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Phenacorhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia* e *Taunaya*. Estes estudos evidenciaram uma ampla variabilidade de número cromossômico entre suas espécies, sendo encontrado $2n=42$ em *Imparfinis hollandi* Haseman, 1911 (Margarido e Moreira-Filho, 2008), $2n=46$ em diversas espécies do gênero *Pimelodella* (Vissotto *et al.*, 1999a; Vidotto *et al.*, 2004; Garcia e Almeida-Toledo, 2010), $2n=52$ em *Imparfinis borodini* Mees & Cala, 1989 (citado como *Heptapterus longicauda* por Vissotto *et al.*, 1999b), *Pimelodella* sp2 (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000) e *Pimelodella aff. avanhandavae* (Swarça *et al.*, 2003), $2n=56$ em *Imparfinis cf. piperatus* (Fenocchio *et al.*, 2003) e *Rhamdella microcephala* (Fonseca *et al.*, 2003) e $2n=58$ em *Phenacorhamdia tenebrosa* Schubart, 1964 (Borba *et al.*, 2012), *Pimelodella kronei* Miranda Ribeiro, 1907 (Almeida-Toledo *et al.*, 1992), *Imparfinis schubarti* Gomes, 1956 (Gouveia *et al.*, 2012), em espécies do gênero *Rhamdia* (Moraes *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010) e em *Taunaya bifasciata* Eigenmann & Norris, 1900 (Borba *et al.*, 2012). Em relação ao gênero *Heptapterus*, os primeiros dados cariotípicos foram descritos, recentemente, por Yano e Margarido (2012) em uma população de *Heptapterus mustelinus* Valenciennes, 1835, espécie coletada num tributário do Rio São Francisco Verdadeiro, bacia do Alto Paraná/Brasil, sendo observado $2n=54$ cromossomos.

Outra característica marcante revelada na família Heptapteridae é a presença de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) simples para a maioria das espécies analisadas como *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart & Gomes, 1959 (Vissotto *et al.*, 1999b), *Imparfinis mirini* Haseman, 1911 (Gouveia *et al.*, 2012), *Pimelodella meeki* (Gouveia *et al.*, 2012) e *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824 (Moraes *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010); no entanto, há também relatos de RONs múltiplas como em *Imparfinis borodini* (Vissotto *et al.*, 1999b) e

em *Rhamdia branneri* Haseman, 1911b e *Rhamdia voulezi* Haseman, 1911b (Abucarma e Martins-Santos, 2001).

Os estudos citogenéticos para *Heptapterus* são poucos e restritos à análise convencional. Desta forma, o presente estudo contribui com novas informações cariotípicas para duas espécies do gênero *Heptapterus*, coletadas em duas bacias hidrográficas no Rio Grande do Sul, por meio de diferentes técnicas de bandamento cromossômico, sendo estes os primeiros dados citogenéticos para o gênero nesta região. Os dados aqui apresentados foram comparados com a literatura, visando inferir tendências evolutivas neste grupo de peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados cinco exemplares de *Heptapterus mustelinus* Valenciennes, 1835, sendo uma fêmea e dois de sexo indeterminado coletados no Arroio Colombo (30° 06' 02.0" S 51° 41' 42.0" W), no município de Eldorado do Sul/RS e duas fêmeas coletadas no Rio Forquetinha (29° 28' 0.17" S 54° 24' 59.89" W), no município de Canudos do Vale/RS. Estas duas localidades pertencem à bacia hidrográfica da Laguna dos Patos/RS. Foram analisados também dois machos de *Heptapterus* sp. A coletados no Rio Maquiné (29° 39' 10.4" S 50° 12' 31.8" W), no município de Maquiné, pertencente à bacia do Tramandaí/RS (figura 1). Exemplares de *Heptapterus mustelinus* do Arroio Colombo e do Rio Forquetinha foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) com os números: MZUEL 5350 e MZUEL 5074, respectivamente.

Análise Convencional:

Cromossomos mitóticos foram obtidos a partir do rim posterior utilizando a técnica de obtenção direta descrita por Bertollo *et al.* (1978). As análises cariotípicas foram realizadas após coloração convencional com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6.8). Os cromossomos foram classificados morfológicamente segundo Levan *et al.* (1964), com modificações. Os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços e os acrocêntricos com um braço para o cálculo do número fundamental (NF).

Bandamentos cromossômicos:

As regiões heterocromáticas foram visualizadas por banda C com Giemsa, após tratamentos com 0,2N HCl, Ba(OH)₂ e 2XSSC de acordo com Sumner (1972) e coloração sequencial com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6- diamidino 2- phenylindole (DAPI). Regiões organizadoras de nucléolos ativas (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de prata segundo Howell e Black (1988) e as regiões ricas em pares de base CG e AT foram visualizadas pela coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, respectivamente (Schweizer, 1976).

Obtenção de sonda de DNAr 5S: isolamento de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento genômico:

A sonda de DNAr 5S foi obtida a partir de DNA extraído de músculo de *Imparfinis schubarti* Gomes, 1956, conforme metodologia de Sambrook e Russel (2001) e amplificação por PCR utilizando os primers 5SA (5' – TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC – 3') e 5SB (5' – CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC – 3') desenhados a partir de sequências de DNAr 5S de truta arco-íris (Komiya e Takamura, 1979). As reações de PCR foram realizadas utilizando 20ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 2,5 mM de cada dNTP, 50 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerase para uma reação com volume final de 25 µL. O tempo dos ciclos foram 2 minutos a 94°C (denaturação) seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C, 1 minuto a 72°C e, por fim, mais 5 minutos a 72°C. As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1% e os fragmentos de DNAr 5S gerados foram eluídos do gel utilizando o kit PurelinkTm Quick Gel Extraction e clonados utilizando o kit TOPO PA Cloning® For Sequencing ambos da Invitrogen. Após a clonagem, foi realizada a transformação em *Escherichia coli* linhagem TOP 10. As sequências obtidas por meio da clonagem foram sequenciadas utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer Applied, e os dados obtidos foram analisados com o programa Mega 5.0. A validação da sequência foi realizada utilizando Blastn (Altschul *et al.*, 1990) do site National Center of Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). As sondas de DNAr 5S também foram marcadas com biotin-14-dATP por nick translation para posterior hibridação.

Hibridização fluorescente *in situ*:

A hibridização fluorescente “*in situ*”(FISH) foi realizada segundo protocolo de Pinkel *et al.* (1986) com modificações já relatadas por Santos *et al.* (2012) e Gouveia *et al.* (2012), utilizando a sonda de DNAr 18S obtida de *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Hatanaka e Galetti Jr, 2004) e a sonda de DNAr 5S obtida de *Imparfinis schubarti* Gomes, 1956 (presente estudo). Ambas foram marcadas com biotin-14-dATP por nick translation.

RESULTADOS

Heptapterus mustelinus

Os exemplares coletados no Arroio Colombo apresentaram $2n=54$ com fórmula cariotípica de $32m + 8sm + 10st + 4a$ e $NF= 102$ (figura 2a) e os indivíduos do Rio Forquetinha possuem $2n = 58$ com $32m+12sm+4st+10a$ e $NF= 106$ (figura 2b). As duas populações apresentaram constrição secundária instersticial no braço longo do par acrocêntrico 26.

A técnica de impregnação por nitrato de prata revelou metáfases com até quatro sítios ativos, localizados na região terminal do braço curto de um cromossomo dos pares 5 (m) e 21 (st) e na porção terminal do braço longo de um cromossomo dos pares 22 (st) e 23 (st) para os exemplares do Arroio Colombo (figura 3a); e nos exemplares do Rio Forquetinha a localização das AgRONS foi na região terminal do braço longo de um cromossomo do par 17 (sm), na região terminal do braço curto do par 25 (a) e de um cromossomo do par 21 (sm) (figura 3e), o que foi confirmado com a hibridização *in situ* com fluorescência utilizando a sonda de DNAr 18S (figuras 3b e 3f).

A coloração com fluorocromo base específico cromomicina A_3 revelou regiões GC ricas nas porções terminais de alguns cromossomos e na constrição secundária do par 26 (a), tanto para a população do Arroio Colombo (figura 3c) como do Rio Forquetinha (figura 3g); a coloração com o DAPI não evidenciou nenhuma região rica em AT.

A hibridização com a sonda de DNAr 5S revelou apenas um par portador deste gene sendo terminal no braço curto de um par submetacêntrico na população do Arroio Colombo (figura 3d) e intersticial no braço curto de um par metacêntrico na população do Rio Forquetinha (figura 3h).

A heterocromatina foi observada, principalmente, nas regiões centroméricas e em regiões terminais de alguns cromossomos das duas populações de *Heptapterus*

mustelinus (figura 4a e 4d) e na constrição secundária intersticial presente no braço longo do par 26, apenas na população do Rio Forquetinha (figura 4d); após coloração com CMA₃ e DAPI, a heterocromatina terminal de alguns cromossomos apresentou-se rica em pares GC para os exemplares do Arroio Colombo (figura 4b) e do Rio Forquetinha (figura 4e); a heterocromatina centromérica apresentou-se rica tanto em pares AT como em pares GC em alguns cromossomos de *Heptapterus mustelinus* do Rio Forquetinha (figura 4e-f), e apenas AT rica em *H. mustelinus* do Arroio Colombo (figura 4c). Nota-se também que a heterocromatina intersticial presente no braço longo do par 26 em *H. mustelinus* (Rio Forquetinha), apresentou-se CMA₃⁺/DAPI⁺ (figura 4e e 4f), no entanto, com o DAPI foi possível visualizar apenas um cromossomo com fluorescência.

***Heptapterus* sp A**

Foi encontrado número diplóide igual 58 com fórmula cariotípica de 32m+12sm+4st+10a e NF= 106 (figura 2c). A impregnação por nitrato de prata identificou apenas o par cromossômico 19, submetacêntrico, com RONS ativas (figura 3i), coincidente com a sonda de DNAr 18S pela hibridação *in situ* com fluorescência (figura 3j). A coloração com fluorocromo CMA₃ evidenciou apenas a região organizadora de nucléolos e a coloração com DAPI foi homogênea para todo complemento (figura 3k).

A hibridização *in situ* com fluorescência utilizando a sonda de DNAr 5S revelou apenas um cromossomo metacêntrico portador deste gene, em posição terminal do braço curto (figura 3l).

Após tratamento com Banda C, os exemplares apresentaram pouca heterocromatina nas regiões terminais de alguns cromossomos (figura 4g) e após coloração com fluorocromos, algumas regiões heterocromáticas mostraram-se tanto CMA₃⁺ como DAPI⁺ e, algumas outras regiões mostraram-se compostas apenas por pares de base AT (figura 4h e 4i).

DISCUSSÃO

Os dados revelam número diplóide distinto entre as espécies e as populações analisadas, sendo observado 2n= 58 em *Heptapterus* sp A e em *H. mustelinus* coletada no Rio Forquetinha, enquanto que a população de *H. mustelinus* do Arroio Colombo apresentou um 2n = 54. Variações de número diploide são muito comuns entre os peixes da família Heptapteridae, como relatado em revisão realizada por Swarça *et al.* (2007), Borba *et al.*

(2012) e Gouveia *et al.* (2013), sendo possível identificar $2n=42$ em *Imparfinis holandii*, $2n=46$ e $2n=52$ em espécies do gênero *Pimelodella*, $2n=56$ em *Rhamdella microcephala* e $2n=58$ em exemplares dos gêneros *Rhamdia*, *Imparfinis* e *Cetopsorhamdia*. O número diploide composto por 54 cromossomos foi descrito recentemente para uma população de *H. mustelinus* do Rio São Francisco Verdadeiro (Yano e Margarido, 2012) e também no presente estudo para *H. mustelinus* do Arroio Colombo, aumentando assim a variabilidade cromossômica na família Heptapteridae. Além disso, foram verificados exemplares identificados como sendo desta mesma espécie, coletados no Rio Forquetinha com $2n=58$, assim como *Heptapterus* sp A, sendo este mais um indicador de que rearranjos cromossômicos fazem parte da dinâmica da evolução cariotípica neste gênero e na família Heptapteridae.

Lundberg *et al.* (1991) sugeriram, baseado em dados morfológicos, que a família Pseudopimelodidae é grupo irmão de Heptapteridae. Posteriormente, Sullivan *et al.* (2006) realizaram análises filogenéticas utilizando genes nucleares *rag1* e *rag2*, e confirmaram o monofiletismo das famílias Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae e agruparam estas três famílias mais o gênero *Conorhynchos* em subclados distintos de um mesmo clado, indicando que estes são grupos irmãos. Embora escassos, estudos citogenéticos em exemplares da família Pseudopimelodidae tem revelado $2n=54$ como característica constante para seus exemplares (Gouveia *et al.*, 2014), assim como $2n=56$ para a família Pimelodidae (Swarça *et al.*, 2007). Entretanto, embora sejam grupos próximos, mecanismos evolutivos distintos, tais como fissões e fusões, demonstram-se mais atuantes entre os heptapterídeos, o que permite a geração desta ampla variabilidade de número diploide entre exemplares tanto de gêneros distintos, como dentro de um mesmo gênero, e até mesmo na mesma espécie, como no caso de *Heptaterus mustelinus*.

Além de possuírem o mesmo $2n=58$, tanto *H. mustelinus* (Rio Forquetinha) como *Heptapterus* sp A possuem a mesma constituição cromossômica. O fato de espécies distintas de um mesmo gênero apresentarem mesmo número diploide e fórmula cromossômica já havia sido observado anteriormente no gênero *Imparfinis* (Garcia e Almeida- Toledo, 2006). Este fato não é isolado e pode ocorrer com maior frequência, visto que este é um grupo de peixes especioso, cujos estudos citogenéticos são escassos, e que, a cada análise citogenética, mais dados são obtidos o que auxilia para uma melhor elucidação sobre a dinâmica de constituição cariotípica nos exemplares da família Heptapteridae.

As duas espécies deste estudo mostraram uma diferença no padrão das RONS, tanto pela impregnação por nitrato de prata como pela FISH com sonda de DNAr 18S, sendo um

padrão de RONS múltiplas para as duas populações de *Heptapterus mustelinus* simples para *Heptapterus* sp A. Embora RONS múltiplas também tenham sido observadas na população de *Heptapterus mustelinus* do Rio São Francisco Verdadeiro (Yano e Margarido, 2012) e em outras espécies da família, tais como *Imparfinis borodini* (Vissotto *et al.*, 1999b) e *Rhamdia* sp. e *R. quelen* (Abucarma e Martins-Santos, 2001), um único par de RONS é mais frequente para os heptapterídeos, sendo considerada a condição ancestral para este grupo de peixes.

O fato dos cromossomos portadores dos cístrons ribossômicos 18S em *H. mustelinus* não apresentarem homologia, já foi observado em espécies de peixes da ordem Characidae, como *Astyanax scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001), *Astyanax eigenmanniorum* e *Hyphessobryconanisitsi* (Mendes *et al.*, 2011), *Bryconamericus ecai* (Santos *et al.*, 2012). Segundo os autores citados, esta falta de homologia entre os cromossomos portadores da RON pode estar associada ao tamanho destes sítios que, quando muito pequenos dificultam sua visualização. Tal fato pode também estar ocorrendo nas populações de *Heptapterus mustelinus*, no entanto, os sítios de DNAr 18S na população do Rio Forquetinha são mais claramente visíveis, evidenciando que esta falta de homologia pode ser devido a ocorrência de algum tipo de rearranjocromossômico.

A hibridação *in situ* com fluorescência revelou apenas um par portador dos clusters de DNAr 5S, para os exemplares de *Heptapterus mustelinus*. Embora sejam poucos os dados em relação à localização deste cístron ribossômico para este grupo de peixes, a presença de apenas um par portador desta sequência gênica já foi observado em outras espécies da família Heptapteridae, como em diversas populações de *Rhamdia quelen* (Garcia *et al.*, 2010) e em *Imparfinis schubarti* (Kantek *et al.*, 2009) e a posição deste cístron ribossômico na maioria das espécies foi em posição intersticial. O fato de ter sido observado apenas um cromossomo portador de DNAr 5S em *Heptapterus* sp A, pode também estar associado ao pequeno tamanho deste sítio, dificultando sua observação.

Martins e Galleti Jr (1999) relatam que a localização de genes em posição mais interna nos cromossomos proporciona maior proteção a estas sequências gênicas, pois eventos de rearranjos cromossômicos tais como transposição e eventos de crossing, costumam ser mais frequentes em regiões terminais e isto explicaria a natureza altamente conservada desta sequência gênica. Devido ao fato do cístron de DNAr 5S ser encontrado em posição intersticial para a maioria das espécies de peixes de várias ordens onde este gene já foi localizado, Martins e Galleti Jr (2001) sugerem ser esta a localização ótima em peixes. Com base nisto, pode-se dizer que a localização da sequência de DNAr 5S na região terminal na população de *H. mustelinus* do Arroio Colombo e em *Heptapterus* sp A pode ser considerada

uma condição mais recente em relação à população de *H. mustelinus* do Rio Forquetinha, que apresentou este cístron em posição intersticial.

A coloração com os fluorocromos base-específicos revelou para os exemplares de *Heptapterus* sp A um padrão muito característico na família, tais como observado em *Rhamdia quelen* (Garcia *et al.*, 2010 e Moraes *et al.*, 2007), em diversas espécies do gênero *Pimelodella* (Dazzani *et al.*, 2013 e Gouveia *et al.*, 2013) e no gênero *Imparfinis* (Gouveia *et al.*, 2013), visto que apenas a região organizadora de nucléolos apresentou-se GC rica. No entanto, os exemplares de *H. mustelinus*, de ambas populações, apresentaram vários blocos CMA₃⁺ localizados nas regiões terminais de alguns cromossomos e também em posição intersticial do braço longo do par 26, sendo esta coincidente com a constrição secundária. O fato desta constrição estar presente em ambas as populações e não ser coincidente com a RON pode indicar que este par 26 é um marcador para *H. mustelinus* da bacia hidrográfica da Laguna dos Patos/RS. Pode-se concluir também, que a variação de número diplóide entre as duas populações de *H. mustelinus* seja um evento mais recente em relação às demais características, visto ser esta a diferença marcante entre essas duas populações do Rio Grande do Sul.

Variações na distribuição e constituição da heterocromatina foram observadas entre as espécies analisadas. As duas populações de *H. mustelinus* possuem maior quantidade de heterocromatina, sendo em região terminal ela apresentou-se predominantemente composta por pares GC e a heterocromatina centromérica por pares AT. Apenas a heterocromatina presente na constrição secundária (par 26) mostrou-se CMA₃⁺ e DAPI⁺. A população de *H. mustelinus* descrita por Yano e Margarido (2012) também apresentou heterocromatina nas regiões centroméricas de alguns cromossomos, no entanto estas apresentaram-se ricas em GC, diferindo das populações aqui analisadas.

O fato dos exemplares de *H. mustelinus* possuírem maior abundância de regiões heterocromáticas localizadas em região terminal e centromérica, poderia ser um indicativo de que fissões e inversões estejam gerando os números diplóides de 54 e 58, visto que heterocromatina já foi relacionada a rearranjos cromossômicos por diversos autores em grupos distintos, tais como insetos e mamíferos (He *et al.*, 2012; Swier *et al.*, 2012; entre outros). Segundo estes autores, as regiões próximas aos blocos de heterocromatina ficam mais suscetíveis à quebra e por consequência possibilitam maior frequência de rearranjos.

Heptapterus sp A apresentou menor quantidade de heterocromatina quando comparadas com as populações de *H. mustelinus* e as regiões heterocromáticas localizadas na porção terminal de alguns cromossomos apresentaram-se intercaladas em pares de base GC e

AT. Além disso, sinais sutis DAPI⁺também foram notados em posição terminal e centromérica em alguns cromossomos dos exemplares de *Heptapterus* sp A, reinterando o fato de que as espécies aqui analisadas são espécies distintas.

Os dados aqui apresentados são os primeiros para estas espécies da família Heptapteridae coletadas em bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul e mostram que há um processo dinâmico de diferenciação ocorrendo entre *H.mustelinuse* *Heptapterus* sp A, facilmente identificado pelas variações de número diplóide, quantidade e composição da heterocromatina e padrão das RONS reinterando a importância de mais estudos citogenéticos na família Heptapteridae. Embora seja um grupo monofilético, a ampliação de análises cariotípicas associados a dados filogenéticos e moleculares podem trazer melhores esclarecimentos sobre o caminho evolutivo que tem agido sobre os exemplares pertencentes a esta família.

Figura 1 – Locais de coleta dos espécimes analisados. Mapa do Brasil indicando, do lado direito, o estado do Rio Grande do Sul indicando em: a) Arroio Colombo; b) Rio Forquetinha; c) Rio Maquiné

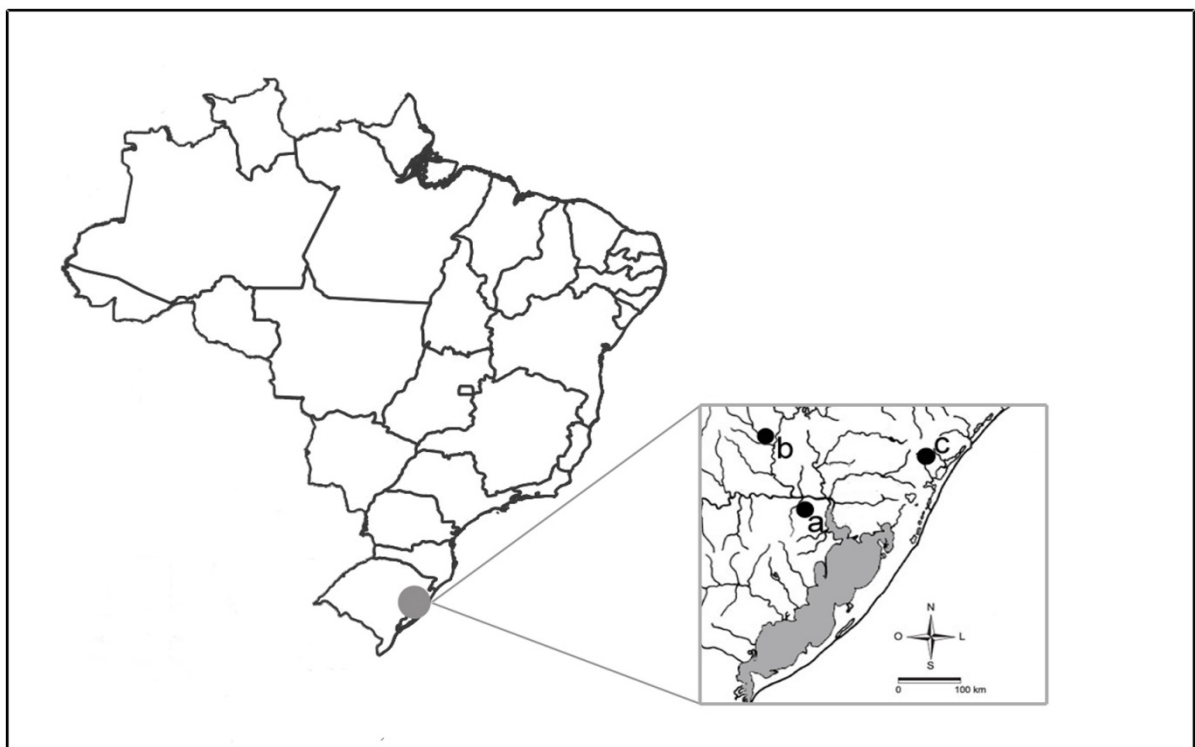


Figura 2 – Cariótipos de: a) *Heptapterus mustelinus* (Arroio Colombo), b) *H. mustelinus* (Rio Forquetinha), c) *Heptapterus* sp A (Rio Maquiné)

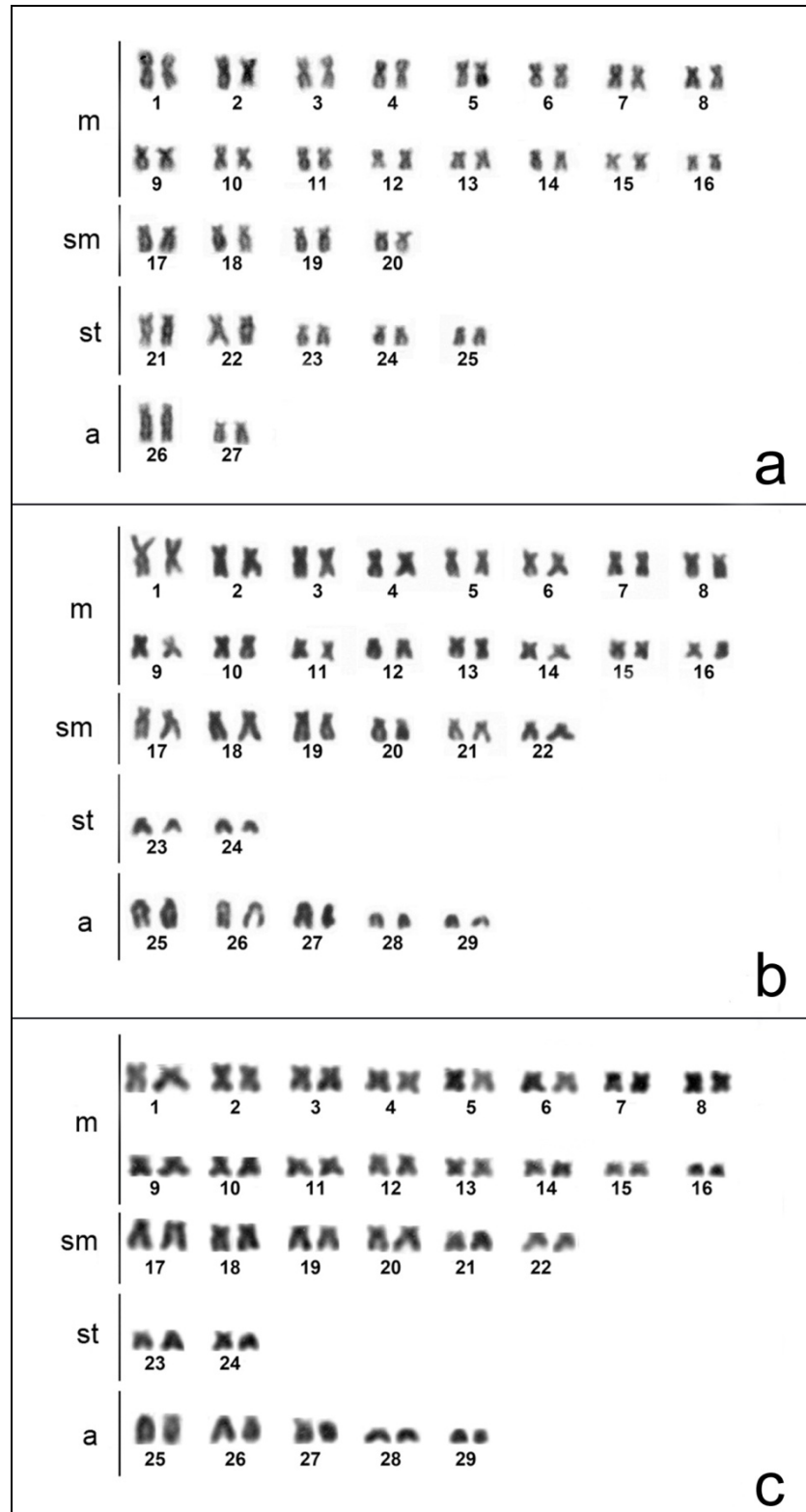


Figura 3 – Metáfases somáticas com AgRON, FISH com sonda de rDNA 18S, CMA₃e FISH com sonda de rDNA 5S, respectivamente, em: a, b, c, d) *H. mustelinus* (Arroio Colombo); e, f, g, h) *H. mustelinus* (Rio Forquetinha); i, j, k, l) *Heptapterus* sp A (Rio Maquiné). As setas indicam em: a,e,i regiões organizadoras de nucléolos; b,f,g) hibridização com sonda de rDNA 18S; d,h,l) hibridização com sonda de rDNA 5S. As cabeças de seta indicam em c e g regiões ricas em bases GC em posição intersticial, coincidente com a constrição secundária.

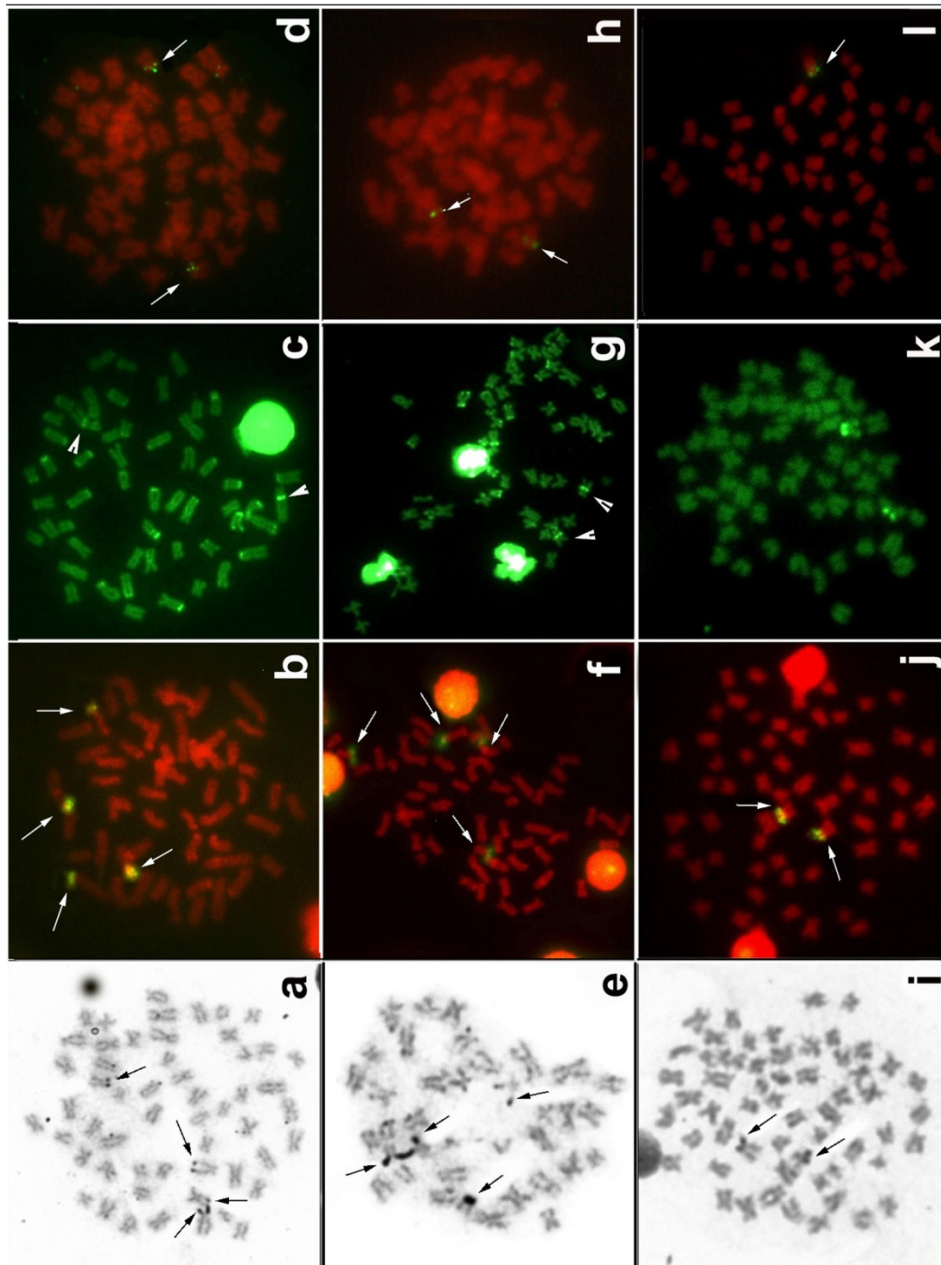
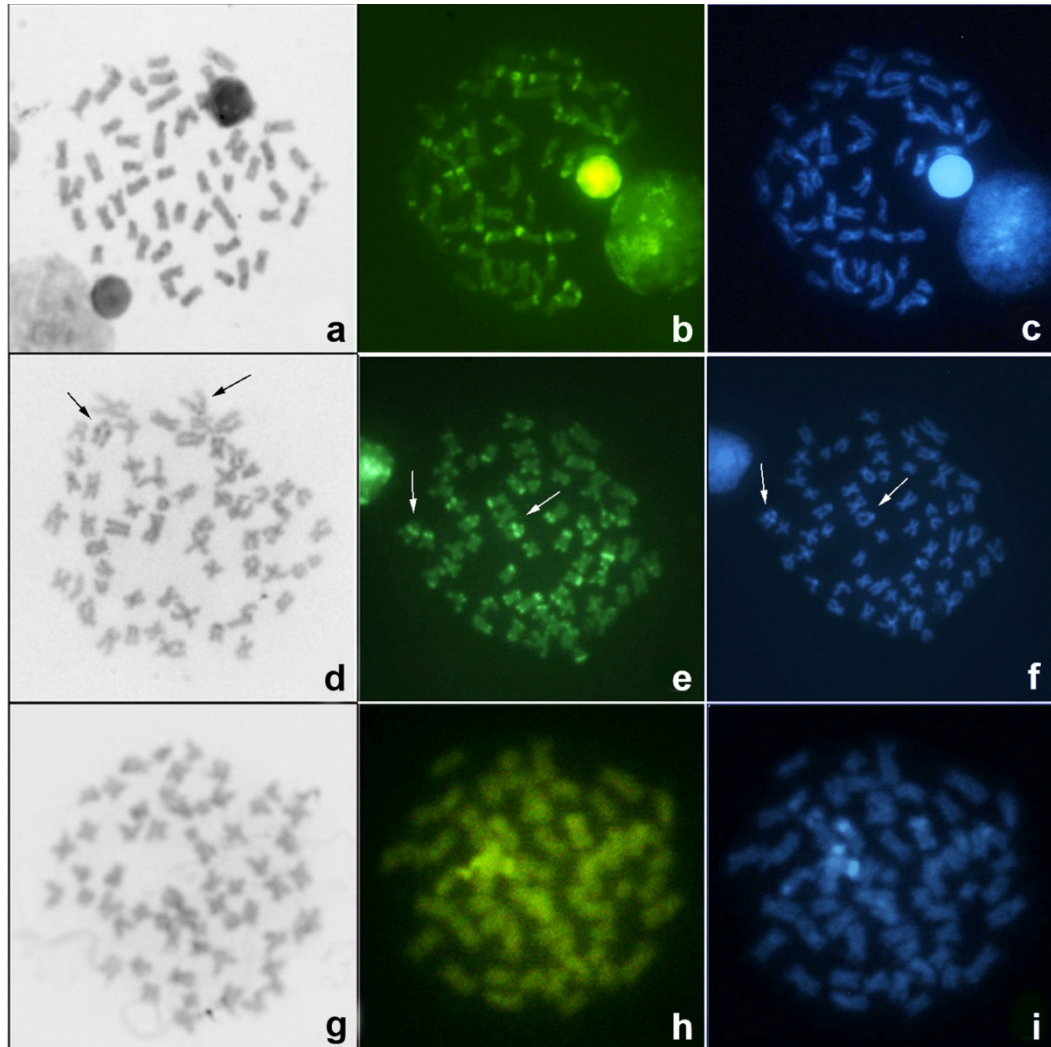


Figura 4 – Metáfases somáticas com Banda C coradas com Giemsa, CMA₃e DAPI, respectivamente, em: a,b,c) *H. mustelinus* (Arroio Colombo); d,e,f) *H. mustelinus* (Rio Forquetinha); g, h, i) *Heptapterus* sp A (Rio Maquiné; as setas em (d), (e), (f) indicam a constrição secundária banda C positiva.



REFERÊNCIAS

- ABUCARMA, M., MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçú Basin. **Cytologia**, 66: 299-306, 2001.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI, F., TRAJANO, E., TOLEDO-FILHO, S.A. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. **Caryologia**, 45: 255-262, 1992.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403-410, 1990.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 1(2): 103-120, 1978.
- BOCKMANN, F. A., GUAZZELLI, G.M. Family Heptapteridae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS JR., C.J. **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipurcs**, Porto Alegre, p. 406-431, 2003.
- BORBA, R.S., SILVA, E.L., PACHECO, A.C.S., PARISE-MALTEMPI, P.P., ALVES, A.L. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 22: 509-518, 2012. DOI 10.1007/s11160-011-9245-3
- ESCHMEYER, W. N. (ed). Catalog of fishes: genera, species, references. Available at <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (last accessed 02 November 2013)
- FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., DIAS, A.L., SWARÇA, A.C. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). **Cytologia**, 68(4): 363-368, 2003.
- FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler - RS http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/regioes_hidro.asp (acessado em 03 de setembro de 2012)
- FERRARIS, C.J.JR. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa**, p. 180-203, p. 352-356, 2007.
- FERRO D.A., NEO D.M., MOREIRA-FILHO O., BERTOLLO L.A. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110: 55-62, 2001.
- FONSECA, Y.M., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., MAISTRO, E.L. First Cytogenetic Description of the Species *Rhamdella microcephala* (Pisces, Heptapteridae). **Cytologia**, 68(1): 31-34, 2003.
- GARCIA, C., OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and

differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research** 9(1): 365-384, 2010.

GARCIA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. **Caryologia**, 63(1): 32-40, 2010.

GOUVEIA, J.G., MORAES, V.P.O., SAMPAIO, T.R., DA ROSA, R., DIAS, A. L. Considerations of karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 2012. DOI 10.1007/s11160-012-9286-2

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

HE, B., CAUDY, A., PARSONS, L., ROSEBROCK, A., PANE, A., RAJ, S., WIESCHAUS, E. Mapping the Pericentric Heterochromatin by comparative genomic hybridization analysis and chromosome detentions in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, 2012. doi:10.1101/gr.137406.112

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015, 1988.

KANTEK, D. L. Z., PERES, W, A. M., BUCKUP, P. A., MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainagem, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. **Zoologia**, 26(4): 733-738, 2009.

LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220, 1964.

LUNDBERG, J. G.; MAGO-LECCIA, F., NASS, P. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces: Siluriformes) from deep river channels of South América, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. **Proceedings of the Biological Society of Washington** 104(4): 840-869, 1991.

MARGARIDO, V. P., MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). **Genetics and Molecular Biology**, 31(1): 235-238, 2008.

MARTINS, C., GALETTI-JUNIOR, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7(5): 363-367, 1999.

MARTINS, C., GALETTI -JUNIOR, P.M., 2001. Two 5SrDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a rule for fishes? **Genetica**, 111 (1-3): 439-446, 2001.

MENDES, M.M., DA ROSA, R., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgRONS, CMA3 and 18S rDNA. **Genetics and Molecular Research**, 2011. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.22.5>

MORAES, V. P. O., CEREALI S. S., FROEHLICH, O., DIAS, A. L. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, 6(3): 627-633, 2007.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W.. **Molecular Cloning**. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANTOS, A.R., RUBERT, M., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. **Hereditas**, 2012. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2011.02234.x

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, p. 307-324. 1976.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75:304-306, 1972.

SULLIVAN, J. P., LUNDBERG, J. G., HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 41: 636-662, 2006.

SWARÇA, A.C., VIDOTTO, A.P., DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). **Caryologia**, 56(4): 421-425, 2003

SWARÇA, A.C., FENOCCHIO, A.S., DIAS, A.L. An update Cytogenetic Review for Species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a Cytotaxonomical Classification. **Caryologia**. 60(4), 2007.

SWIER, V.J., KHAN, F. A.A., BAKER, R.J. Do time, heterochromatin, NORs, or Chromosomal rearrangements correlate with distribution of interstitial telomeric repeats in *Sigmodon* (Cotton Rats)? **Journal of Heredity**, 2012. doi:10.1093/jhered/ess029

VASCONCELOS, C., MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome Polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). **Hereditas**, 132: 103-109, 2000.

VIDOTTO, A. P., SWARÇA. C., A, FENOCCHIO, A. S., DIAS, A. L.. Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). **Journal of Heredity**. 95(6):517-520, 2004.

VISSOTTO, P.C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Science**, 3: 9-13, 1999a.

VISSOTTO, P. C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. Karyotype description of Five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Science**, 3: 1-7, 1999b.

YANO,C.F., MARGARIDO, V.P. First cytogenetic studies of the genus *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): karyotype differentiation and review of cytogenetic data on the Heptapteridae family. **Journal of Fish Biology**, 81: 939-953, 2012.

CAPÍTULO 3

CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE *PIMELODELLA AUSTRALIS* E DUAS ESPÉCIES DE *RHAMDELLA* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)*

* Este artigo será enviado para Journal of Zoology

**CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE *PIMELODELLA AUSTRALIS*
E DUAS ESPÉCIES DE *RHAMDELLA* (SILURIFORMES,
HEPTAPTERIDAE)**

Vivian P, O. de Moraes-Manécolo; Juceli G. Gouveia; Ana Lucia Dias*

RESUMO:

O Rio Grande do Sul é um estado com sistema hídrico com cerca de 300 espécies de peixes já catalogadas. Neste estudo foram analisadas duas populações de *Pimelodella australis* e duas espécies do gênero *Rhamdella* (*Rhamdella eriarcha* e *Rhamdella* sp.), da família Heptapteridae, coletadas em bacias hidrográficas do Sul do Brasil. Os exemplares de *P. australis* das duas populações apresentaram $2n=58$ e mesma fórmula cariotípica ($34m+10sm+8st+6a$) com $NF=110$, no entanto, indícios de que rearranjos cromossômicos ocorreram independentemente entre as populações, pode ser confirmado em relação à localização das RONS. Na população da Lagoa dos Quadros as AgRONS localizam-se no braço curto do par 27 (acrocêntrico) e na do Arroio Ribeiro na porção terminal do braço curto do par 20 (submetacêntrico), coincidentes com a sonda de DNAr 18S. Algumas diferenças e similaridades na distribuição e na composição da heterocromatina entre as populações também foram observadas. Em *P. australis* da Lagoa dos Quadros, a heterocromatina foi observada na região terminal de alguns cromossomos, e apenas aquela associada à constrição secundária e RON apresentou-se $CMA_3^+/DAPI^-$, enquanto que a heterocromatina pericentromérica presente neste mesmo par foi $DAPI^+$; a população do Arroio Ribeiro apresentou maior quantidade de heterocromatina, localizada na região terminal dos cromossomos, sendo $DAPI^+$, assim como algumas regiões intersticiais; a RON também mostrou-se CMA_3^+ . As outras duas espécies, *Rhamdella eriarcha* (topótipo) e *Rhamdella* sp. também apresentaram $2n=58$ com $46m/sm+8st+4a$ e $NF=112$. As AgRONS foram evidenciadas em posição terminal no braço longo do par 6 coincidente com a sonda de DNAr 18S, sendo regiões ricas em pares GC. Em *R. eriarcha* a heterocromatina foi evidenciada nas regiões centroméricas e terminais de vários cromossomos em um ou ambos braços cromossômicos e apenas a heterocromatina associada à RON mostrou-se CMA_3 positiva, assim como em *Rhamdella* sp., mas esta espécie possui pouca heterocromatina distribuída nas regiões terminais de alguns cromossomos, além de alguns blocos heterocromáticos $DAPI^+$. Os dados revelam diferenças tanto interespecíficas como intraespecíficas em relação à microestrutura cromossômica das espécies estudadas, indicando mais uma vez o dinamismo dos processos que tem agido sobre a evolução e diferenciação cariotípica na família Heptapteridae.

Palavras-chave: Citogenética. Heptapteridae. *Pimelodella*. *Rhamdella*. Cistrons ribossômicos. Heterocromatina.

* Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná CEP 86051-970, Brasil
Autor Correspondente: A.L. Dias; e-mail: anadias@uel.br, Telefone e Fax: +55 043 33714417

INTRODUÇÃO

A Região Neotropical é composta por um vasto sistema hídrico e, portanto, com uma riqueza de fauna ictiológica muito grande. Diversos países compõem esta região, sendo que o Brasil ocupa sua maior parte e, por consequência, possui a maior diversidade de ictiofauna dulcícola, com cerca de 2500 espécies de peixes já inventariadas (Buckup, Menezes, Ghazzi, 2007). O Rio Grande do Sul é um estado com sistema hídrico muito abundante e que, segundo levantamento realizado sob a coordenação da pesquisadora Georgina Bond Buckup em 2010, possui cerca de 300 espécies de peixes já catalogadas, das quais 80% são espécies já descritas e 20% a serem descritas, revelando mais uma vez a riqueza da ictiofauna deste estado brasileiro.

O primeiro estudo citogenético realizado em peixes do estado do Rio Grande do Sul foi desenvolvido por Hochberg e Erdtmann (1988) em exemplares de *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824. Mais recentemente, outras análises foram realizadas abrangendo espécies de diversas famílias e ordens tais como os Characiformes *Astyanax jacuhiensis* (Pacheco et al., 2010), *Astyanax eigenmanniorum*, *Deuterodon stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenii* (Mendes et al., 2011), *Bryconamericus ecai* (Santos et al., 2012); os Perciformes *Geophagus brasiliensis*, *Gymnogeophagus gymnogenys* e *G. labiatus* (Pires, Giuliano-Caetano, Dias, 2010), e os Siluriformes *Rineloricaria cadeae* Hensel, 1868 e *R. strigilata* Hensel, 1868 (Maia et al., 2010), *Parapimelodus nigribarbis* Boulenger, 1889 e *Pimelodus maculatus* La Cèpède, 1803 (Tresco et al., 2008).

A família Heptapteridae possui 24 gêneros (Ferraris, 2007) e, aproximadamente, 207 espécies descritas até o momento (Eschemeyer, 2013). Esta família era considerada uma subfamília da família Pimelodidae, juntamente com Pimelodinae e Pseudopimelodinae, sendo todas elevadas a família por Bockmann e Guazzelli (2003). Seus exemplares são endêmicos dos neotrópicos e possuem pequeno porte (cerca de 20 cm de comprimento corporal), sendo os hábitos alimentares variados (de onívoros a carnívoros), não apresentam cuidado parental e geralmente são solitários, vivendo em pequenos corpos d'água (Bockmann e Guazzelli, 2003).

Análises cariotípicas foram descritas em apenas oito gêneros desta família: *Cetopsorhamdia* (Vissotto, Foresti e Oliveira, 1999a; Fenocchio et al., 2003a), *Heptapterus* (Yano e Margarido, 2012), *Imparfinis* (Vissotto, Foresti e Oliveira, 2001; Gouveia et al., 2013), *Phenacorhamdia* (Martinez et al., 2011), *Pimelodella* (Gouveia et al., 2013; Garcia e Almeida-Toledo, 2010), *Rhamdella* (Fonseca et al., 2003), *Rhamdia* (Moraes et al., 2007; Maistro, Oliveira e Foresti, 2002) e *Taunaya* (Borba et al., 2012), no entanto, é

possível notar algumas características marcantes, tais como a ampla variabilidade cariotípica em relação a diferentes números diploides e fórmulas cariotípicas, alto número fundamental ($NF > 80$) devido a grande quantidade de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, e padrão de RONS simples para a grande maioria das espécies já analisadas (Swarça, Fenocchio e Dias, 2007; Borba et al., 2012; Gouveia et al., 2013).

Pimelodella é um dos gêneros de Heptapteridae mais especioso (cerca de 70 espécies), entretanto, apenas cinco das espécies descritas apresentam estudos citogenéticos, que revelam uma grande variabilidade cariotípica, tanto em relação ao número diploide, que pode ser encontrado igual 46, 52 e 58, como em relação à macroestrutura cromossômica (tabela 1). Nota-se também polimorfismo numérico e estrutural, como a presença de cromossomo supranumerário em *Pimelodella* sp do Rio Pardo/SP (Garcia e Almeida- Toledo, 2010) e de sistema cromossômico sexual do tipo XX/XY em *Pimelodella* sp (Dias e Foresti, 1993) e em *Pimelodella boschmai* Van der Stigchel, 1964 (Garcia e Almeida Toledo, 2010), ambas do Rio Mogi-Guaçu/SP. Em todas as espécies de *Pimelodella* analisadas até o momento, a região organizadora de nucléolos, evidenciada pelo nitrato de prata e com a sonda de DNAr 18S, se localiza em posição terminal do braço curto em um par de cromossomos, como relatado em diferentes espécies na tabela 1.

No gênero *Rhamdella*, Bockmann e Miquelarena (2008) descreveram cinco espécies (*R. aymarae*, *R. cainguae*, *R. eriarcha*, *R. longiuscula* e *R. rusbyi*) e estudos citogenéticos são ainda mais escassos, pois restringe-se a apenas uma espécie, *Rhamdella microcephala* (não descrita pelos autores citados acima) proveniente do rio Machado/MG, analisada por Fonseca et al. (2003), com $2n$ igual 56, sendo $18m+30sm+8st-a$, AgRON em posição intersticial no braço longo de um par submetacêntrico e heterocromatina em região pericentromérica para a maioria dos cromossomos.

Diante da variabilidade cariotípica relatada acima para o gênero *Pimelodella* e a escassez de dados para o gênero *Rhamdella* presente estudo tem por objetivo analisar exemplares destes dois gêneros, coletados em duas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul/Brasil, utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular, contribuindo assim com novas informações para estes grupos de peixes, que possam levar a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos evolutivos que estão gerando diferenciação cromossômica na família Heptapteridae.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram analisadas três espécies de peixes de dois gêneros da família Heptapteridae, coletadas em diferentes localidades de duas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul/Brasil (figura 1): dez exemplares de *Pimelodella australis*, sendo cinco (uma fêmea e quatro de sexo indeterminado) coletados na Lagoa dos Quadros/Bacia do Tramandaí (29° 44' 42.8" S 50° 06' 54.3" W), no município de Capão da Canoa e cinco indivíduos (três fêmeas, um macho e um de sexo indeterminado) coletados no Arroio Ribeiro/Laguna dos Patos (30° 21' 31.54" S 51° 25' 47.78" W), no município de Barra do Ribeiro; quatro exemplares (topótipos) de *Rhamdella eriarcha* (uma fêmea, dois machos e um de sexo indeterminado) coletados no Rio Forquetinha/Laguna dos Patos (29° 28' 0.17" S 54° 24' 59.89" W), no município de Canudos do Vale e dez indivíduos de *Rhamdella* sp. (três fêmeas e sete machos) coletados no Rio Maquiné/Bacia do Tramandaí (29° 39' 10.4" S 50° 12' 31.8" W), no município de Maquiné.

Análise Convencional:

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada segundo a técnica de obtenção direta descrita por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978), utilizando-se o rim posterior dos exemplares. Para as análises cariotípicas foi realizada coloração convencional com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6.8). Os cromossomos foram classificados morfologicamente segundo Levan et al. (1964), com modificações. Os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelo-cêntricos foram considerados com dois braços e os acrocêntricos com um braço para o cálculo do número fundamental (NF).

Bandamentos Cromossômicos:

A detecção das regiões heterocromáticas foi realizada pela técnica de banda C com Giemsa, após tratamento com 0.2 NHCl, Ba(OH)₂ e 2XSSC de acordo com Sumner (1972), e com coloração pelos fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino 2-phenylindole (DAPI). Para evidenciar as regiões organizadoras de nucléolos ativas (AgRONS) foi utilizada a técnica de impregnação por nitrato de prata segundo Howell e Black (1988). As bandas ricas em GC e AT foram detectadas pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI, respectivamente, de acordo com Schweizer (1976). As lâminas foram coradas com 0.5mg/mL de CMA₃ por 1 hora, lavadas em água destilada e sequencialmente coradas com 2ug/mL

DAPI por 15 minutos. As lâminas foram montadas com um meio composto por glicerol/tampão McIlvaine (pH 7) 1:1 mais 2.5mM MgCl₂.

Hibridização Fluorescente *in situ*:

A hibridização fluorescente “*in situ*”(FISH) foi realizada segundo protocolo de Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações já relatadas por Gouveia et al. (2013) e Santos et al. (2012) utilizando a sonda de rDNA 18S obtida de *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Hatanaka e Galetti Jr, 2004) marcada com biotin-14-dATP por Nick translation. As análises foram realizadas em microscópio Leica DM 4500 equipado com câmera DFC 300 FX e com o software Leica IM50 4.0.

RESULTADOS

Pimelodella australis (Eigenmann, 1917)– Lagoa dos Quadros

Os exemplares apresentaram $2n=58$ e fórmula cariotípica constituída por $34m+10sm+8st+6a$ e $NF=110$ (figura 2a). Em algumas metáfases, foi possível observar constrição secundária em posição terminal do braço curto do par 27 (a), coincidente com a região organizadora de nucléolos utilizando impregnação por nitrato de prata e a sonda de DNAr 18S pela técnica de hibridação *in situ* com fluorescência. A coloração com fluorocromos base específicos revelou a RON CMA₃positiva e DAPI negativo (figura 2a box).

A heterocromatina encontra-se na região terminal de alguns cromossomos e no par 27, com um bloco heterocromático próximo ao centrômero, sendo que a constrição secundária apresentou uma fraca marcação heterocromática (figura 3a).Após coloração com fluorocromos não foi evidenciada nenhuma região positiva para CMA₃ ou DAPI, exceto a constrição secundária que mostrou-se CMA₃⁺.

Pimelodella australis (Eigenmann, 1917) – Arroio Ribeiro

Os indivíduos também apresentaram $2n = 58$ e constituição de $34m+10sm+8st+6a$ e $NF=110$ (figura 2b). A região organizadora foi detectada pela impregnação por nitrato de prata e hibridação *in situ* com fluorescência, utilizando a sonda de DNAr 18S, na porção

terminal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntrico (par 20). A coloração com fluorocromos base específicos revelou a RON CMA₃ positiva e DAPI negativa (figura 2b box).

Os exemplares de *Pimelodella australis* desta população apresentaram blocos heterocromáticos na região terminal de vários cromossomos em um ou ambos braços cromossômicos (figura 3d). Após coloração com fluorocromos base-específicos apenas a heterocromatina associada à RON mostrou-se CMA₃ positiva (figura 3e), no entanto, vários blocos DAPI positivos, tanto em região intersticial como em região terminal, puderam ser vistos, inclusive adjacente à região organizadora de nucléolo (figura 3f).

Rhamdella eriarcha (Eigenmann & Eigenmann, 1888)

Esta espécie apresentou $2n = 58$ e fórmula cariotípica de $46m-sm+8st+4a$ e $NF=112$ (figura 4a) e, em algumas metáfases, foi observada constrição secundária em posição terminal do braço longo do par 6 (m) coincidente com a região organizadora de nucléolos que foi visualizada por meio da impregnação por nitrato de prata e da hibridação *in situ* com fluorescência com sonda de DNA r 18S. A coloração com fluorocromos revelou a RON CMA₃ positiva e DAPI negativa (Box figura 4a).

Após de aplicada a técnica de banda C a heterocromatina foi evidenciada nas regiões centroméricas e terminais de vários cromossomos em um ou ambos braços cromossômicos (figura 5a) e, após coloração com fluorocromos, apenas a heterocromatina associada à RON mostrou-se CMA₃ positiva e nenhuma região cromossômica mostrou-se positiva para DAPI (figura 5b e 5c, respectivamente).

Rhamdella sp.

Os exemplares desta espécie apresentaram $2n = 58$ e fórmula cariotípica constituída por $46m/sm+8st+4a$ e $NF=112$ (figura 4b). A região organizadora de nucléolo foi detectada pela impregnação por nitrato de prata e hibridação *in situ* com fluorescência, utilizando a sonda de rDNA 18S, na região terminal do braço longo do par metacêntrico 6. A coloração com fluorocromos base específicos revelou a RON CMA₃ positiva e DAPI negativa (box da figura 4b).

O bandamento C revelou pouca heterocromatina nas regiões terminais de alguns cromossomos e apenas a heterocromatina associada à RON mostrou-se CMA₃ positiva, após

coloração com fluorocromos. Foram observados alguns blocos heterocromáticos com sutis sinais DAPI positivos, no braço curto de um par subtelocêntrico e no centrômero de um par acrocêntrico (figura 5e e 5f, respectivamente).

DISCUSSÃO

Estes são os primeiros dados citogenéticos para as três espécies analisadas e o número diploide de 58 observado é muito frequente entre os exemplares dos gêneros *Rhamdia* (Fenocchio et al, 2003b; Moraes, Carneiro e Dias, 2009; Garcia, Oliveira e Almeida-Toledo, 2010; Tsuda et al, 2010) e *Imparfinis* (Garcia e Almeida-Toledo, 2006; Vissotto, Foresti e Oliveira, 2001; Stolf et al, 2004) no entanto, em *Pimelodella*, este $2n$ havia sido reportado anteriormente em apenas uma população de *P. lateristriga* descrita por Garcia e Almeida Toledo (2010), sendo o $2n=46$ o mais comumente encontrado neste gênero, embora também haja relato de espécies com $2n=52$ (tabela 1). Para o gênero *Rhamdella*, há apenas uma descrição cariotípica para *R. microcephala* com 56 cromossomos (Fonseca et al., 2003).

Apesar de o gênero *Rhamdella* possuir apenas três espécies analisadas até o momento, incluindo as do presente estudo, ele já mostra uma pequena variação no $2n$ e o gênero *Pimelodella* apresenta considerável variabilidade cariotípica (tabela 1), tornando-se um excelentes exemplos de que rearranjos cromossômicos são eventos muito recorrentes na família Heptapteridae. Estudos filogenéticos utilizando exemplares do gênero *Rhamdella* (Bockmann e Miquelarena, 2008) revelaram que este gênero mais *Pimelodella* fazem parte de clados distintos dentro da família Heptapteridae. Em outro estudo, feito por Peixoto (2011), utilizando sequências de genes mitocondriais de diversas espécies do gênero *Pimelodella*, e tomando heptapterídeos dos gêneros *Imparfinis* e *Rhamdia* como grupo externo, evidenciou que *Rhamdia* é o gênero geneticamente mais próximo de *Pimelodella*. Estes fatos revelam dados importantes, pois indicam que, embora não sejam grupos tão próximos, os exemplares aqui analisados compartilham o mesmo $2n$, apesar de que em *Pimelodella* este não seja tão frequente, quanto em *Rhamdia* (tabela 1).

Sullivan, Lundberg e Hardman (2006) realizando análises filogenéticas com dados moleculares confirmaram o monofiletismo das famílias Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Heptapteridae agrupando-as em subclados de um mesmo clado, junto com o gênero *Conorhynchos*, sendo estes considerados grupos irmãos. Sabe-se que na família Pimelodidae $2n = 56$ é o mais recorrente (Swarça, Fenocchio e Dias, 2007) e, na família Pseudopimelodidae, o $2n = 54$ tem sido encontrado em todos os exemplares analisados até o

momento (Gouveia et al., 2014). Embora estas três famílias sejam grupos próximos, os heptapterídeos mostram uma ampla variabilidade de número diplóide, indicando que mecanismos evolutivos distintos são mais atuantes neste grupo de peixes, como observado no gênero *Pimelodella*, visto que dos exemplares de Heptapteridae estudados citogeneticamente até o momento, este é o grupo que possui representantes com maior amplitude de número diploide, indicando que rearranjos cromossômicos são eventos fundamentais na evolução cariotípica deste grupo.

Os exemplares de *Pimelodella australis* das duas populações do Rio Grande do Sul apresentaram mesma fórmula cariotípica ($34m+10sm+8st+6a$) e $NF=110$, no entanto, indícios de que rearranjos cromossômicos ocorreram entre as populações, pode ser confirmado em relação à localização das RONS, visto que em *P. australis* da Lagoa dos Quadros esta região localiza-se no braço curto do par 27 (a) e na do Arroio Ribeiro na porção terminal do braço curto do par 20 (sm). Devido ao fato de ambas serem em posição terminal, inversões pericêntricas podem ter gerado esta diferença.

Rhamdella eriarcha e *Rhamdella* sp. também apresentaram igual fórmula cariotípica e a mesma localização das RONS, que se manteve na região terminal do braço longo do par 6 (m). Em *Rhamdella microcephala* analisada por Fonseca et al. (2003) além de $2n$ e fórmula cariotípica distintas das espécies aqui analisadas (tabela 1), as AgRONS revelaram-se em posição intersticial no braço longo do par 12 (sm). O padrão de RON simples é característica basal para os heptapterídeos, e a localização na região terminal do braço curto de cromossomos do tipo m/sm parece ser o mais comum entre os exemplares dos gêneros *Rhamdia* e *Pimelodella*, e em posição intersticial em exemplares dos gêneros *Cetopsorhamdia* e *Imparfinis*. O fato que no gênero *Rhamdella* as duas situações já foram observadas, apesar das poucas espécies analisadas, demonstra novamente variação cariotípica no gênero.

Diferenças na distribuição e na composição da heterocromatina entre as três espécies e populações analisadas foram notadas. Em *Pimelodella australis* da Lagoa dos Quadros, embora a heterocromatina tenha sido observada na região terminal de alguns cromossomos, apenas aquela associada à constrição secundária e RON (par 27) apresentou-se CMA₃ positiva e DAPI negativa, enquanto que apenas a heterocromatina pericentromérica presente neste mesmo par foi DAPI⁺; a população do Arroio Ribeiro apresentou maior abundância de heterocromatina na região terminal dos cromossomos, e apenas a RON mostrou-se rica em pares GC, no entanto diversas regiões heterocromáticas compostas por AT foram observadas. Estudo realizado com *Pimelodella meeki* (Gouveia et al., 2013) utilizando esta mesma associação de técnicas evidenciou heterocromatina composta por pares de base AT enquanto

que apenas a heterocromatina associada a RON era CMA₃⁺. Isto indica que diferenciações na composição da heterocromatina vem ocorrendo neste gênero, tanto interespecíficas como intraespecíficas, como revelado entre as duas populações de *Pimelodella australis*, que podem estar sofrendo um processo de diferenciação em sua microestrutura cromossômica, sendo a população coletada na Lagoa dos Quadros a que mais diferiu do que já havia sido descrito para este gênero.

Em *Rhamdella eriarcha* blocos terminais de heterocromatina foram observados em um ou ambos os braços cromossômicos e também na região pericentromérica de alguns cromossomos e somente a heterocromatina associada à RON foi positiva para CMA₃. Embora em menor quantidade, *Rhamdella* sp. também apresentou heterocromatina na região terminal e centromérica de alguns cromossomos; a heterocromatina associada à RON também mostrou-se GC rica e em dois pares de cromossomos ela foi DAPI⁺, mostrando uma pequena variação de composição da heterocromatina em relação a *R. eriarcha*. Heterocromatina na região pericentromérica parece ser uma característica comum em *Rhamdella*, visto ser esta uma característica comum nas três espécies analisadas até o momento, bem como a heterocromatina associada a RON ser composta por bases GC, o que é muito comum em peixes neotropicais. Porém, a presença de dois pares com heterocromatina rica em AT observado apenas em *Rhamdella* sp. pode ser uma característica espécie-específica. A presença de heterocromatina terminal é muito recorrente em exemplares do gênero *Pimelodella* (Visotto, Foresti e Oliveira, 1999; Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Garcia e Almeida-Toledo, 2010; Gouveia et al., 2013) assim como *Cetopsorhamdia iheringi* (Visotto et al., 1999), *Imparfinis holandii* (Margarido e Moreira Filho, 2008) e em diversas espécies do gênero *Rhamdia* (Garcia et al, 2010, Moraes et al., 2007, entre outros) no entanto, em região pericentromérica é encontrada em menor quantidade. *Rhamdella microcephala* analisada por Fonseca et al. (2003) revelou heterocromatina apenas na região pericentromérica, diferindo das duas espécies analisadas no presente estudo.

O fato da região organizadora de nucléolos apresentar-se CMA₃⁺ e, portanto, rica em GC para as três espécies aqui analisadas é uma característica comum em heptapterídeos, sendo o mesmo observado em *Rhamdella microcephala* (Fonseca et al, 2003), e em diversas espécies dos gêneros *Imparfinis* (Stolf et al, 2004; Margarido e Moreira Filho, 2008), *Pimelodella* (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Vidotto et al, 2004; Garcia e Almeida Toledo, 2010a) e *Rhamdia* (Fenocchio et al, 2003b; Moraes et al, 2007; Moraes et al, 2010; Garcia e Almeida-Toledo, 2010b), indicando mais uma vez que esta é uma característica bem conservada na família.

Diante das informações obtidas neste estudo, evidencia-se variabilidade deste grupo de peixes e reinteram a importância da ampliação de estudos citogenéticos em exemplares dos gêneros *Pimelodella* e, principalmente, *Rhamdella*. Os dados revelam divergências tanto inter quanto intraespecíficas na microestrutura cromossômica das espécies estudadas, indicando mais uma vez o dinamismo dos processos evolutivos que tem agido sobre a diferenciação cariotípica na família Heptapteridae.

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies dos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdella*. *m* metacentrico; *sm* submetacentrico; *st* subtelocentrico; *a*acrocentrico; *p* braço curto; *q* braço longo; *2n* número diploide; *NF*número fundamental. Rf = referências

Espécies	Localidade	2n	Karyotypic formula	NF	RON	Rf
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	R. Araquá/SP	46	20m + 20sm + 6st	86	Simples, st, p, terminal	1
<i>P. avanhandavae</i>	R. Capivara/SP	46	20m + 20sm + 6st	86	Simples, st, bc, terminal	1
<i>P. aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	30m + 22sm	104	Simples, m, bc, terminal	2
<i>P. australis</i>	Lagoa dos Quadros/RS	58	34m + 10sm + 8st + 6a	110	Simples, a, bc terminal	9
<i>P. boschmai</i>	Mogi-Guaçu Araras -SP	46	38m + 8sm - XY/XX	92	Simples, sm, bc terminal	3
<i>P. gracialis</i>	Paraná Mariápolis – SP	46	34m + 12sm	92	Simples, sm, bc terminal	3
<i>P. meeki</i>	R. Limoeiro/PR	46	30m + 12sm + 4st	92	Simples, sm, bc, terminal	4
<i>P. meeki</i>	R. Couro de Boi/PR	46	30m + 12sm + 4st	92	Simples, sm, bc, terminal	4
<i>P. meeki</i>	R. Gabriel da Cunha/PR	46	30m + 12sm + 4st	92	Simples, sm, bc, terminal	4
<i>P. meeki</i>	Parapanema Pilar do Sul /SP	46	28m + 12sm + 6st	92	Simples, sm, bc terminal	3
<i>P. meeki</i>	Parapanema S. Miguel Arcanjo/SP	46	28m + 12sm + 6st	92	Simples, sm, bc terminal	3
<i>P. meeki</i>	Rb Jacutinga/PR	46	26m + 14sm + 6st	92	Simples, sm, bc terminal	5
<i>P. meeki</i>	R. Paraná/PR	46	26m + 16sm + 4st	92	Smples, sm, bc , terminal	6
<i>P. lateristriga</i>	Paraíba do Sul Angra/RJ	58	36m + 22sm	116	Simples, sm, bc terminal	3
<i>Pimelodella</i> sp.	R. Mogi-Guaçu/SP	46	♂= 40m-sm + 6st-a XX ♀= 40m-sm + 6st-a XY	-	Simples, m-sm, bc, terminal	7
<i>Pimelodella</i> sp.1	R. Paraná/PR	46	20m + 20sm + 6a	92	Simples, sm, bc, terminal	8
<i>Pimelodella</i> sp.2	R. Paraná/PR	52	22m + 22sm + 8st	104	Simples, sm, bc, terminal	8
<i>Pimelodella</i> sp.	Pardo Cardoso/SP	46	34m + 12sm	92	Simples, sm, bc terminal	3
<i>Pimelodella</i> sp.	Arroio Ribeiro/RS	58	34m + 10sm + 8st + 6a	110	Simples, sm, bc terminal	10
<i>Rhamdella.eriarcha</i>	Rio Forquetinha/RS	58	46m + 8st + 4a	112	Simples, m, bl terminal	10
<i>R. microcephala</i>	R. Machado/MG	56	18m + 30sm + 8st-a	84	Simples, sm, bl, intersticial	9
<i>Rhamdella</i> .sp	Rio Maquiné/RS	58	42m + 12st + 4a	112	Simples, m, bl terminal	10

1) Vissotto et al., 1999a; 2) Swarça et al., 2003; 3) Garcia e Almeida-Toledo, 2010; 4) Vidotto et al, 2004; 5) Gouveia et al., 2013; 6) Borba et al, 2012; 7) Dias and Foresti, 1993; 8) Vasconcelos and Martins-Santos, 2000; 9) Fonseca et al. (2003); 10) Presente estudo.

Figura 1 – Locais de Coleta – Mapa do Brasil indicando, no lado direito o estado do Rio Grande do Sulmostrando em:a) Rio Forquetinha; b) Arroio Ribeiro; c) Rio Maquiné; d) Lagoa dos Quadros.

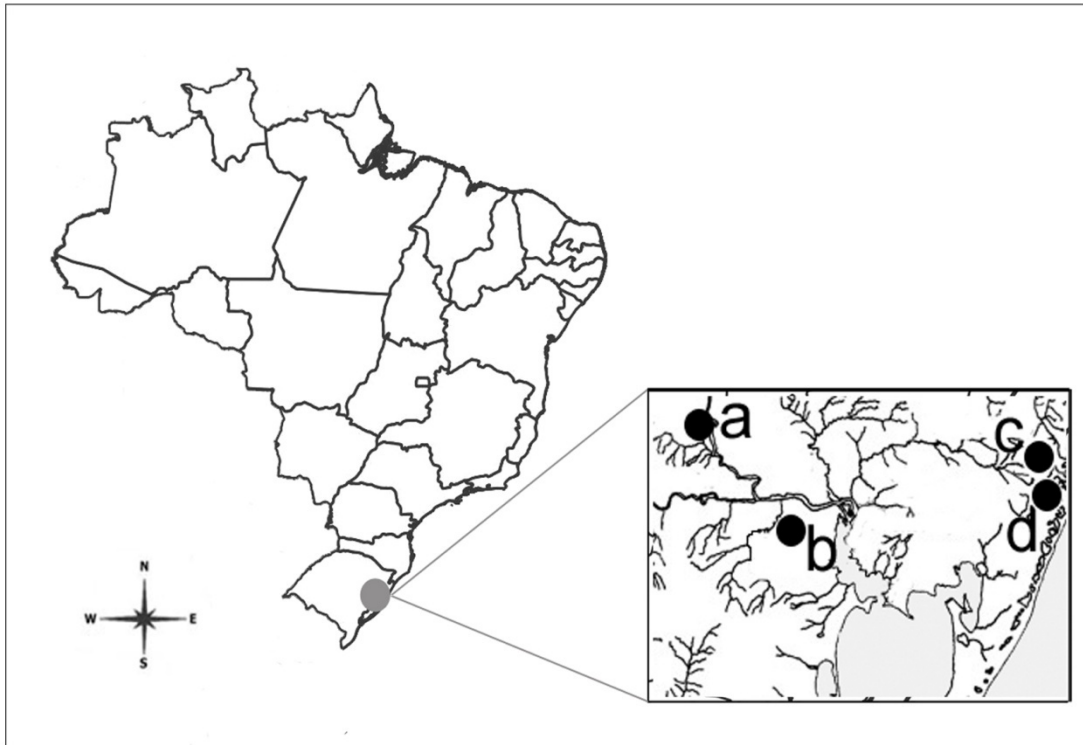


Figura 2 – Cariótipos de: A) *Pimelodella australis* (Lagoa dos Quadros); B) *Pimelodella* sp (Arroio Ribeiro). O par portador da região organizadora de nucléolos encontra-se evidenciado em cada box.

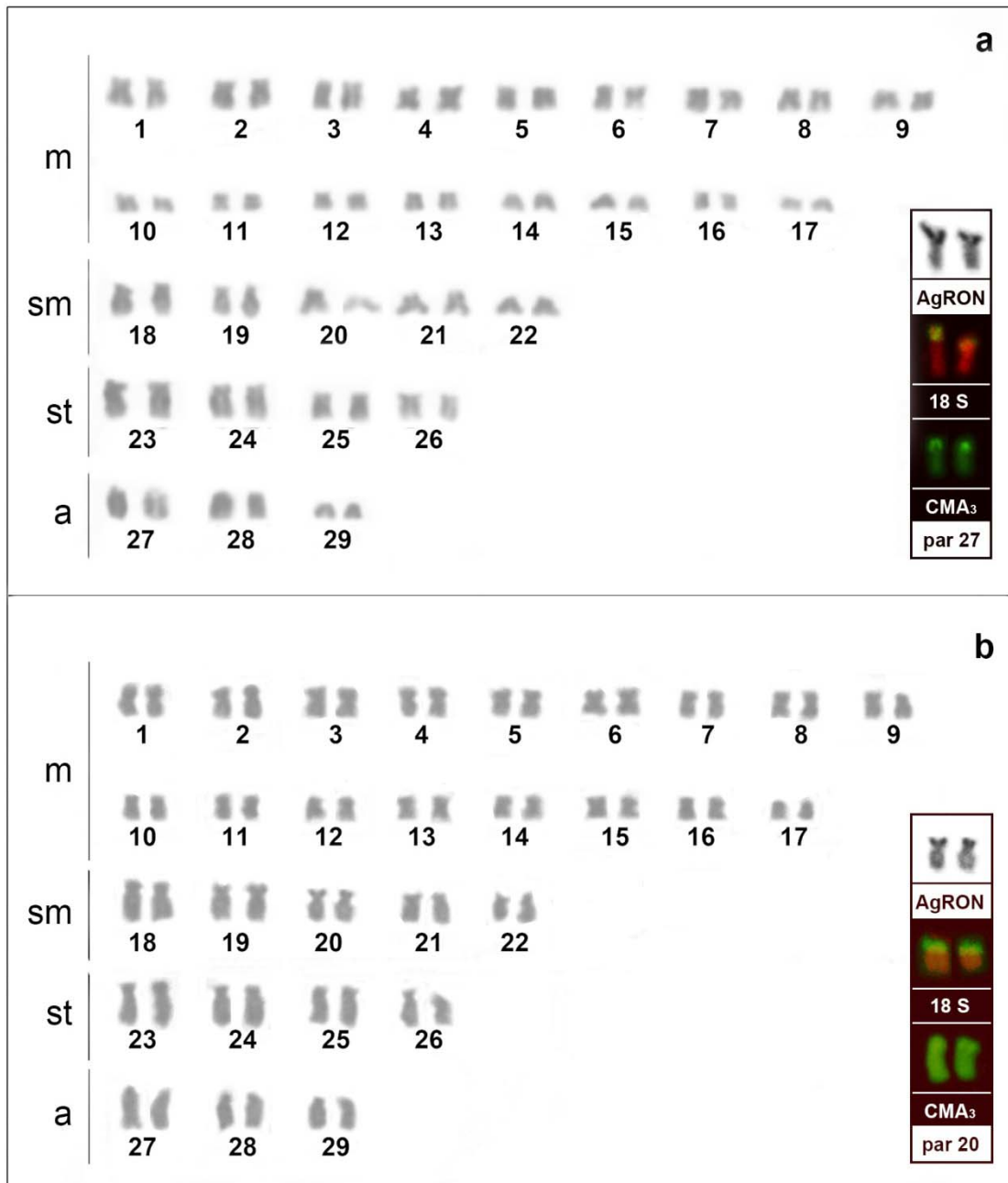


Figura 3 – Metáfases somáticas de *Pimelodella australis* com BC coradas com Giemsa, CMA₃ e DAPI, respectivamente, em: a, b,c) Lagoa dos Quadros; d,e,f) Arroio Ribeiro. Setas indicam o par portador da região organizadora de nucléolos.

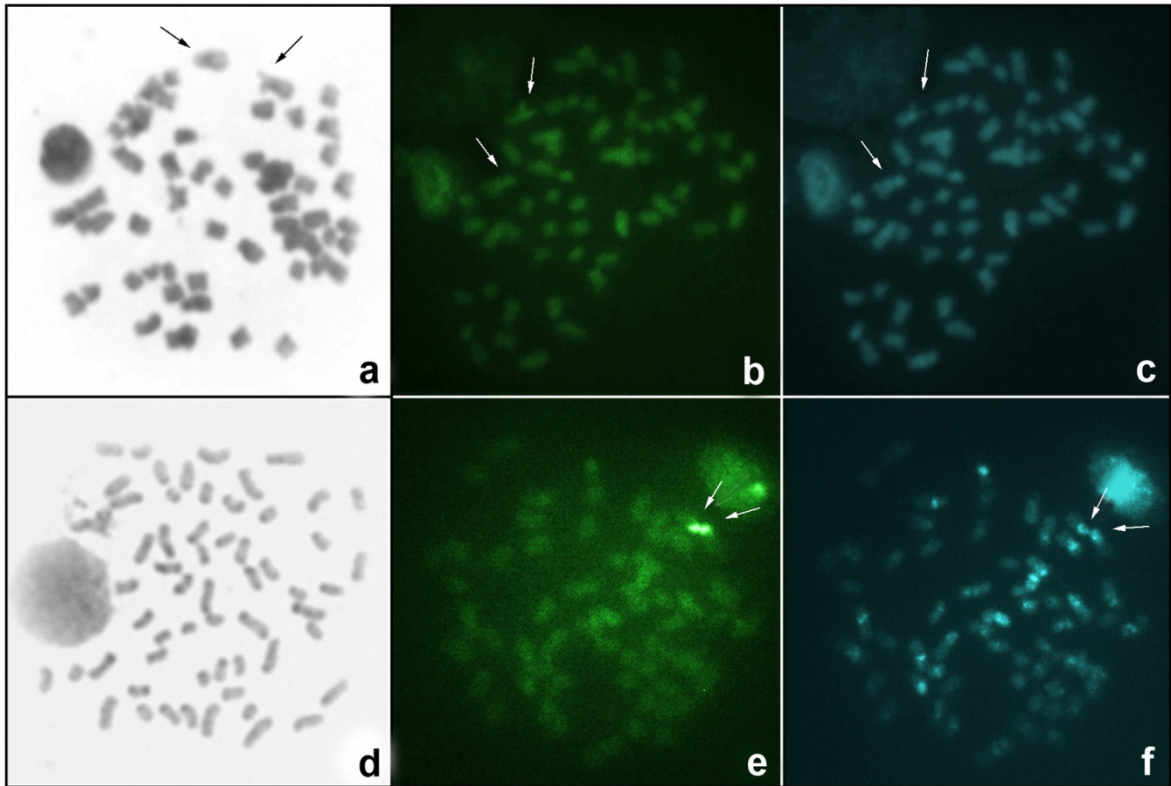


Figure 4 – Cariótipos de: A) *Rhamdella eriarcha* (Rio Forquetinha), B) *Rhamdella* sp. (Rio Maquiné). Cada Box indica o par portador da região organizadora de nucléolo.

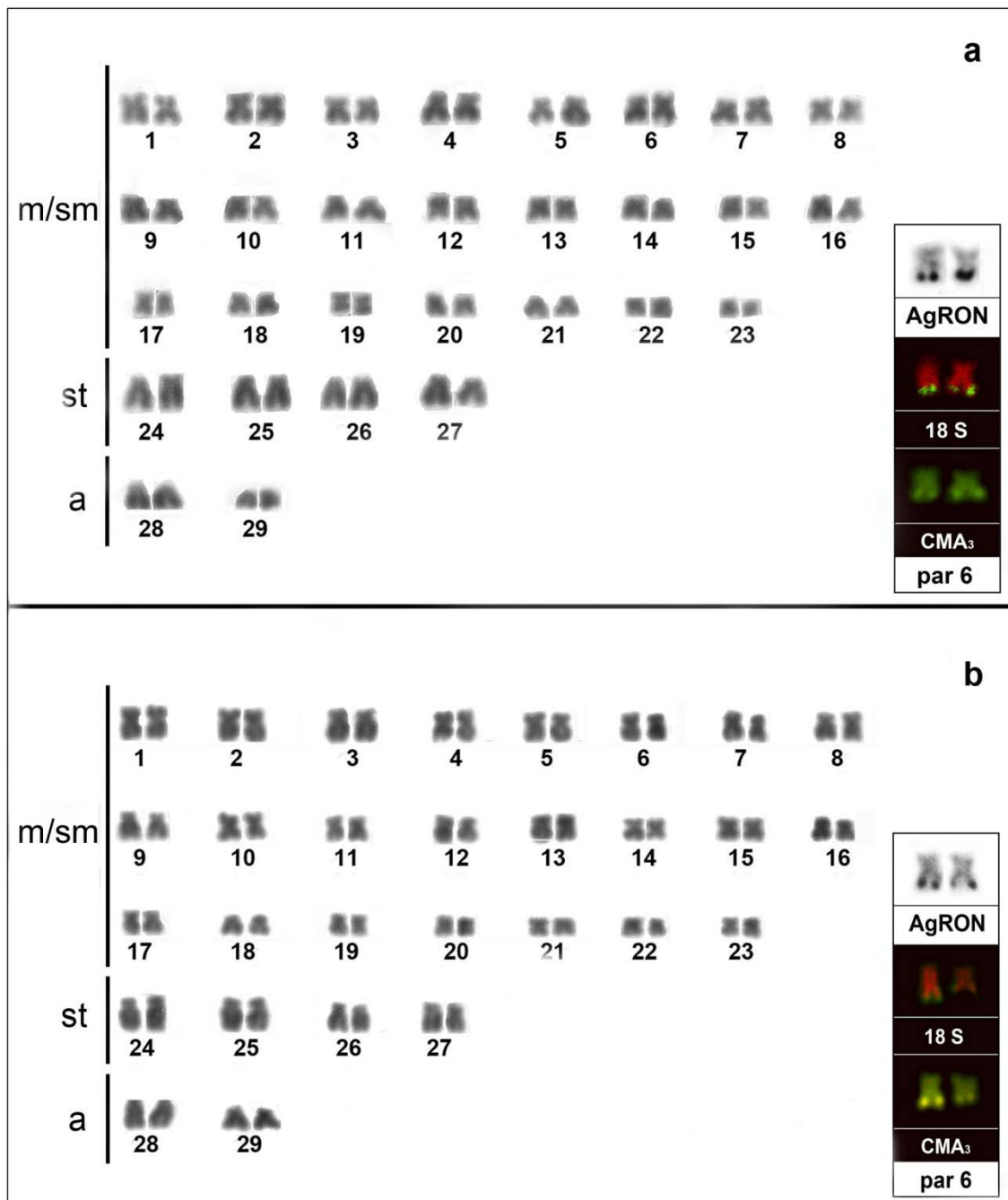
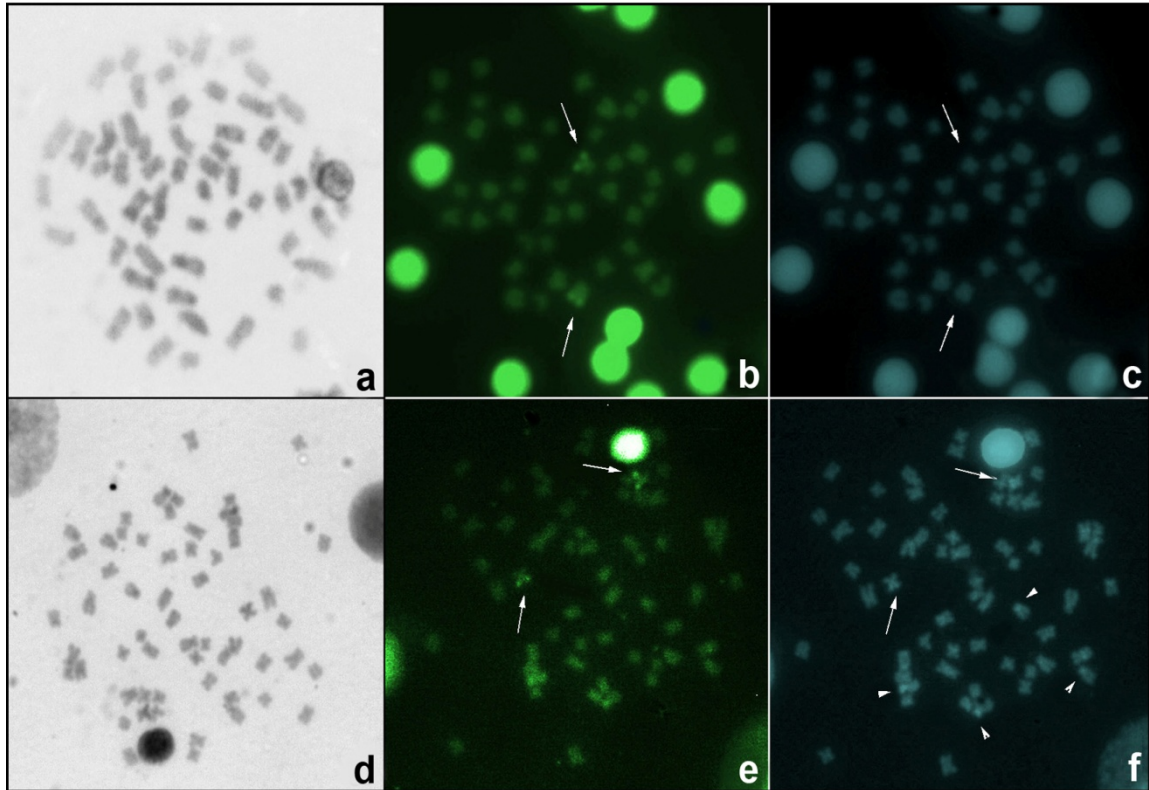


Figura 5 – Metáfases somáticas com BC coradas com Giemsa, CMA₃ e DAPI, respectivamente, em: a, b,c) *R. eriarcha* (Rio Forquetinha); d,e,f) *Rhamdella* sp. (Rio Maquiné). Setas indicam o par da RON e as cabeças de seta em **f** indicam blocos AT ricos.



REFERÊNCIAS

- Abucarma, M., Martins-Santos, I.C. (2001) Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçú Basin. *Cytologia*, 66: 299-306.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O.(1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1(2): 103-120.
- Bockmann, F. A., Guazzelli, G.M. (2003) Family Heptapteridae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS JR., C.J. Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipurus, Porto Alegre, p. 406-431.
- Borba, R.S., Silva, E.L., Pacheco, A.C.S., Parise-Maltempi, P.P., Alves, A.L. (2012) Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teçeoestei: Siluriformes). *Rev Fish Biol Fish*, 22: 509-518,. DOI 10.1007/s11160-011-9245-3
- Buckup, P.A., Menezes, N.A., Ghazzi, M.S. (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p 195.
- Dias, A.L., Foresti, F. (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev. Brasil. Genet.*, 16,3,:585-600.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. (1990) Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193-198.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Camacho, J.P.M. (2000) B Chromosomes in two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Foliabiologica* (Kraków), 48: 3-4.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Dias, A.L., Swarça, A.C. (2003a) Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, 68(4): 363-368.
- Fenocchio, A.S., Swarça, A.C., Cestari, M.M., Dias, A.L. (2003b) Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguaçú River (Brazil). *Folia biologica*(Kraków), 51: 3-4.
- Ferraris, C.J.JR.(2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, p. 180-203, p. 352-356.
- Fonseca, Y.M., Oliveira, C., Foresti, F., Maistro, E.L.(2003) First Cytogenetic Description of the Species *Rhamdella microcephala* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia*,68(1): 31-34.
- Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C., Centofante, L. B (2003) Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68(4): 403-411.
- Garcia, C., Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F. (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genet Mol Res* 9(1): 365-384.

- Garcia, C., Almeida-Toledo, L. F. (2010) Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia*, 63(1): 32-40.
- Gouveia, J.G., Moraes, V.P.O., Sampaio, T.R., Da Rosa, R., Dias, A.L.(2013) Considerations of karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Rev Fish Biol Fish*. 23:215–227.
- Gouveia, J.G., Moraes, V.P.O., Pires, L.P., Da Rosa, R., Dias, A.L. (2014) Comparative cytogenetics between two species of the family Pseudopimelodidae (Siluriformes): occurrence of natural triploidy and supernumerary chromosomes. *Cytotechnology*. DOI 10.1007/s10616-013-9676-x
- Hatanaka, T., Galetti JR, P. M.(2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 122, p 239-244.
- Hochberg, V.B.M., Erdtmann, B.(1988) Cytogenetical and Morphological Considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) – The Occurrence of B Chromosomes and Polymorphic NOR Regions. *Rev Bras Genet*11(3): 563-576.
- Howell, W.M., Black, D.A.(1988) Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Kantek, D. L. Z., Peres, W, A. M., Buckup, P. A., Moreira-Filho, O.(2009) Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainagem, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *Zoologia*, 26(4): 733-738.
- Le Grande, W. H.(1981) Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, *Noturus*. *Copeia*, 1: 33-52.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A.(1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Maia, T.P.A., Giuliano-Caetano, L., Rodriguez, M.S., Rubert, M., Takagui, F.H., Dias, A.L.(2010) Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). *Ichthyol Res*, 57:209-213. DOI 10.1007/s10228-009-0145-7
- Maistro, E.L., Oliveira, C., Foresti, F.(2002) Cytogenetic Analysis of A- and B Chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, Silver Nitrate and CMA₃ Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia*, 67: 25-31.
- Margarido, V. P., Moreira-Filho, O.(2008) Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genet Mol Biol*, 31(1): 235-238.
- Martinez, E. R. M., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F., Oliveira, C.(2008) Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *GenetMol Biol*, 31(3): 692-696.

- Martinez, J.F., Lui, R.L., Blanco, D.R., Traldi, J.B., Silva, L.F., Venere, P.C., Souza, I.L., Moreira-Filho, O. (2011) Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia*, 64(1): 121-128.
- Mendes, M.M., Da Rosa, R., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. (2011) Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgRONS, CMA₃ and 18S rDNA. *Genet Mol Res*. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.22.5>
- Moraes, V. P. O., Cereali S. S., Froehlich, O., Dias, A. L. (2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Genet Mol Res*, 6(3): 627-633.
- Moraes, V. P. O., Carneiro, J. S., Dias, A. L. (2010) Intraspecific chromosome analysis in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Cybum*, 34 (4): 397-398.
- Oliveira, C. Almeida-Toledo, L.F., Mori, L. Toledo-Filho, S.A. (1993) Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia*, 46: 171-188.
- Pacheco, R.B., Giuliano-Caetano, L., Julio Junior, H.F., Dias, A.L. (2010) Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neot Ichthyol*, 8 (3): 667-671.
- Peixoto, M S (2011) *Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas de espécies do gênero Pimelodella (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná*. Doctoral Thesis, Universidade de São Paulo of São Paulo.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 2934-2938.
- Pires, L.B., Giuliano-Caetano, L., Dias, A. L. (2010) Cytogenetic Characterization of *Geophagus braziliensis* and two species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. *Folia biologica (Kraków)*, v.58, p 29-34. doi:10.3409/fb58_1-2.29-34
- Santos, A.R., Rubert, M., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. (2010) Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas*. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2011.02234.x
- Schweizer, D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, v. 58, p. 307-324.
- Stivari, M.K., Martins-Santos, I.C. (2004) Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia*, 69(1): 25-34.
- Stolf, R., Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L., Dias, A.L. (2004) Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Parana', Brazil. *Caryologia*, 57 (4): 348-352.

- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*, 75:304-306.
- Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., Hardman, M.(2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Mol Phylogenet Evo*, 41: 636-662.
- Swarça, A.C., Vidotto, A.P., Dias, A.L.(2003a) Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia*, 56(4): 421-425.
- Swarça, A.C., Fenocchio, A.S., Dias, A.L.(2007) An update Cytogenetic Review for Species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a Cytotaxonomical Classification. *Caryologia*. 60(4).
- Toledo, V., Ferrari, I. (1976) Estudos citogenéticos de três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). *Científica*, 4(2): 101-106.
- Treco, F.R., Malabarba, L.R., Giuliano-Caetano, L. Dias, A. L. (2008) Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neot Ichthyol*, 6 (1): 87-92.
- Tsuda, J.R., Moraes, V.P.O., Giuliano-Caetano, L. Dias, A.L.(2010) Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genet Mol Res*, 9 (3): 1929-1935.
- Valcarcel, A., Brunner, P., Maggese, M. C.(1993) B- chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, 110:111-118.
- Vasconcelos, C., Martins-Santos, I.C. (2000) Chromosome Polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132: 103-109.
- Vidotto, A. P., Swarça. C., A, Fenocchio, A. S., Dias, A. L. (2004) Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *J Hered* 95(6):517–520.
- Vissotto, P.C., Foresti, F., Oliveira, C.(1997) A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia*, 62:61-66.
- Vissotto, P.C., Foresti, F., Oliveira, C. (1999a) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3: 9-13.
- Vissotto, P. C., Foresti, F., Oliveira, C. (1999b) Karyotype description of Five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3: 1-7.
- Vissotto, P.C., Foresti, F., Oliveira, C. (2001) Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Science*, 5: 97-103.
- Yano, C.F., Margarido, V.P. (2012) First cytogenetic studies of the genus *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): karyotype differentiation and review of cytogenetic data on the Heptapteridae family. *J Fish Biol*, 81: 939-953.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A revisão de dados citogenéticos para a família Heptapteridae revelou variabilidade no número diplóide, bem como a presença de polimorfismos numéricos (presença de cromossomos B e triploidia). Revelou também um padrão simples de RON para a maioria das espécies estudadas e evidenciou a presença de um par portador dos cístrons ribossômicos 5S para a maioria das populações onde esta sonda foi utilizada. Foi possível observar que a heterocromatina neste grupo de peixes encontra-se mais frequentemente em regiões terminais, centroméricas ou pericentroméricas, no entanto, no gênero *Imparfinis* heterocromatina intersticial é recorrente;
2. O número diplóide de 58 cromossomos foi encontrado em todas as espécies analisadas, exceto *Heptapterus mustelinus* do Arroio Colombo que apresentou $2n=54$; uma mesma fórmula cariotípica foi encontrada em *H. mustelinus* do Rio Forquetinha e *Heptapterus* sp do Rio Maquiné.
3. Um padrão de RON simples foi encontrado nas espécies de *Rhamdella*, *Pimelodella* e em *Heptapterus* sp A porém, as duas populações de *Heptapterus mustelinus* apresentaram os cístrons ribossômicos de DNAr 18S em quatro cromossomos.
4. A localização das sequências gênicas de DNAr 5S foi determinada apenas nos exemplares do gênero *Heptapterus*, onde foi possível identificar apenas um par cromossômico portador. Entretanto, em *Heptapterus* sp A este sítio foi observado em apenas um cromossomo;
5. Diferenças e similaridades na distribuição e composição da heterocromatina foram identificadas em todas as populações estudadas.
6. Este trabalho contribui com a primeira descrição cariotípica para *Pimelodella australis*, *Heptapterus* sp, *Rhamdella* sp e *Rhamdella eriarcha*, sendo que esta última trata-se de um topótipo.

7. Diferenças tanto interespecíficas como intraespecíficas em relação ao bandamento cromossômico nas espécies estudadas, revelam que um processo de diferenciação cariotípica está ocorrendo de forma dinâmica e que estudos citogenéticos, associados a outros dados biológicos e moleculares, podem fornecer informações que irão auxiliar na compreensão dos processos evolutivos que agem sobre este grupo de peixes.

REFERÊNCIAS

- ABUCARMA, M., MARTINS-SANTOS, I.C. 2001. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçú Basin. *Cytologia* 66: 299-306.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI, F., TRAJANO, E., TOLEDO-FILHO, S.A. 1992. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45: 255-262.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1(2): 103-120.
- BOCKMANN, F. A., GUAZZELLI, G.M. 2003. Family Heptapteridae. In *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J), pp. 406-431, Porto Alegre RS, Edipurcs.
- BORBA, R.S., SILVA, E.L., PACHECO, A.C.S., PARISE-MALTEMPI, P.P., ALVES, A.L. 2011. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 509-518, 2011. doi 10.1007/s11160-011-9245-3
- BUCKUP, P.A., MENEZES, N.A., GHAZZI, M.S. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p 195.
- DAZZANI, B., GARCIA, C., PEIXOTO, M., TRAJANO, E., ALMEIDA-TOLEDO, L.F.. 2012. Cytogenetic and molecular analyses in troglobitic and epigeic species of *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotropical Ichthyology* 10(3): 623-632.
- DIAS, A.L., FORESTI, F. 1993. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética* 16(3):585-600.
- ESCHMEYER, W. N. (ed). 2013. Catalog of fishes: genera, species, references. Available at <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (last accessed 02 November 2013)
- FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C. 1990. Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81: 193-198.
- FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C., CAMACHO, J.P. 2000. Considerations on B-chromosome origin and distribution in fish populations of the genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica* 48:105-109.
- FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., DIAS, A.L., SWARÇA, A.C. 2003a. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* 68(4): 363-368.

FENOCCHIO, A.S., SWARÇA, A.C., CESTARI, M.M., DIAS, A.L. 2003b. Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguazu River (Brazil). *Folia biológica (Kraków)* 51: 3-4.

FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler – RS
http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/regioes_hidro.asp (acessado em 03 de setembro de 2012)

FERRARIS, C.J.JR. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* pp. 180-203, pp. 352-356.

FERRO D.A., NEO D.M., MOREIRA-FILHO O., BERTOLLO L.A. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55-62.

FONSECA, Y.M., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., MAISTRO, E.L. 2003. First Cytogenetic Description of the Species *Rhamdella microcephala* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 68(1): 31-34.

GARCIA, C., MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C., CENTOFANTE, L. B. 2003. Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia sp.* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* 68(4): 403-411.

GARCIA, C., OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2010. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 9(1): 365-384.

GARCIA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2010. Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* 63(1): 32-40.

GOUVEIA, J.G., MORAES, V.P.O., SAMPAIO, T.R., DA ROSA, R., DIAS, A.L. 2012. Considerations of karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, doi 10.1007/s11160-012-9286-2

GOUVEIA, J.G., MORAES, V.P.O., PIRES, L.P., DA ROSA, R., DIAS, A.L. 2014. Comparative cytogenetics between two species of the family Pseudopimelodidae (Siluriformes): occurrence of natural triploidy and supernumerary chromosomes. *Cytotechnology* doi 10.1007/s10616-013-9676-x

HATANAKA, T. e GATETTI JR, P. M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 122, p 239-244.

HE, B., CAUDY, A., PARSONS, L., ROSEBROCK, A., PANE, A., RAJ, S., WIESCHAUS, E. 2012. Mapping the Pericentriec Heterochromatin by comparative genomic hybridization analysis and chromosome detetions in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*. doi:10.1101/gr.137406.112

- HOCHBERG, V.B.M., ERDTMANN, B. 1988. Cytogenetical and Morphological Considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) – The Occurrence of B Chromosomes and Polymorphic NOR Regions. *Revista Brasileira de Genética* 11(3): 563-576.
- HOWELL, W.M., BLACK, D.A. 1988. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- KANTEK, D. L. Z., PERES, W, A. M., BUCKUP, P. A., MOREIRA-FILHO, O. 2009. Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainagem, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *Zoologia* 26(4): 733-738.
- LE GRANDE, W. H. 1981. Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, *Noturus*. *Copeia* 1: 33-52.
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- LUNDBERG, J. G.; MAGO-LECCIA, F., NASS, P. 1991. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces: Siluriformes) from deep river channels of South América, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 104(4):840-869.
- MAIA, T.P.A., GIULIANO-CAETANO, L., RODRIGUEZ, M.S., RUBERT, M., TAKAGUI, F.H., DIAS, A.L. 2010. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). *Ichthyol Res*, 57:209-213. DOI 10.1007/s10228-009-0145-7
- MAISTRO, E.L., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. 2002. Cytogenetic Analysis of A- and B Chromosomes of *Rhamdia hylarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, Silver Nitrate and CMA₃ Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia* 67: 25-31.
- MARGARIDO, V. P., MOREIRA-FILHO, O. 2008. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 235-238.
- MARTINEZ, E. R. M., NIRCHIO, M., GRANADO, A., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. 2008. Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 692-696.
- MARTINEZ, J.F., LUI, R.L., BLANCO, D.R., TRALDI, J.B., SILVA, L.F., VENERE, P.C., SOUZA, I.L., MOREIRA-FILHO, O. 2011. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia* 64(1): 121-128.
- MARTINS, C., GALETTI-JUNIOR, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7(5): 363-367.
- MARTINS, C., GALETTI -JUNIOR, P.M. 2001. Two 5SrDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a rule for fishes? *Genetica*, 111 (1-3): 439-446.

- MENDES, M.M., DA ROSA, R., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. 2011. Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgRONS, CMA₃ and 18S rDNA. *Genetics and Molecular Research*. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.22.5>
- MORAES, V. P. O., CEREALI S. S., FROEHLICH, O., DIAS, A. L. 2007. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Genetics and Molecular Research* 6(3): 627-633.
- MORAES, V. P. O., CARNEIRO, J. S., DIAS, A. L. 2009. Intraspecific chromosome analysis in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Cybium* 34 (4): 397-398.
- OLIVEIRA, C. ALMEIDA-TOLEDO, L.F., MORI, L. TOLEDO-FILHO, S.A. 1993. Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia*. 46: 171-188.
- PACHECO, R.B., GIULIANO-CAETANO, L., JULIO JUNIOR, H.F., DIAS, A.L. 2010. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 8 (3): 667-671.
- PEIXOTO, M. S. 2011. *Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas de espécies do gênero Pimelodella (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná*. Doctoral Thesis, Universidade de São Paulo of São Paulo.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 83, p. 2934-2938.
- PIRES, L.B., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A. L. 2010. Cytogenetic Characterization of *Geophagus braziliensis* and two species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. *Folia biologica (Kraków)*, v.58, p 29-34. doi:10.3409/fb58_1-2.29-34
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W.. 2001. **Molecular Cloning**. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York,
- SANTOS, A.R., RUBERT, M., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. 2012. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas*. doi: 10.1111/j.1601-5223.2011.02234.x
- SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*. v. 58, p. 307-324.
- SILVA, M., MATOSO, D.A., LUDWIG, L.A., GOMES, E., ALMEIDA, M.C., VICARI, M.R., ARTONI, R.F. 2011. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçú basin, southern Brazil. *Environment Biology of Fishes* 91:361-366. doi 10.1007/s10641-011-9794-2
- STIVARI, M.K., MARTINS-SANTOS, I.C. 2004. Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 69(1): 25-34.

- STOLF, R., SWARÇA, A.C., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. 2004. Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis aff. schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Parana', Brazil. *Caryologia* 57 (4): 348-352.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 75:304-306.
- SULLIVAN, J. P., LUNDBERG, J. G., HARDMAN, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 636-662.
- SWARÇA, A.C., VIDOTTO, A.P., DIAS, A.L. 2003a. Cytogenetic characterization of *Pimelodella aff. avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia* 56(4): 421-425.
- SWARÇA, A.C., FENOCCHIO, A.S., CESTARI, M.M., DIAS, A.L. 2003b. Analysis of the heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119:87-92.
- SWARÇA, A.C., FENOCCHIO, A.S., DIAS, A.L. 2007. An update cytogenetic review for species of the families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). suggestion of a cytotaxonomical classification. *Caryologia* 60(4), 2007.
- SWIER, V.J., KHAN, F. A.A., BAKER, R.J. 2012. Do time, heterochromatin, NORs, or Chromosomal rearrangements correlate with distribution of interstitial telomeric repeats in *Sigmodon* (Cotton Rats)? *Journal of Heredity*. doi:10.1093/jhered/ess029
- TODELO, V., FERRARI, I. 1976. Estudo citogenético em *Pimelodella* sp e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica* 4:120-123.
- TRECO, F.R., MALABARBA, L.R., GIULIANO-CAETANO, L. DIAS, A. L. 2008. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 6 (1): 87-92.
- TSUDA, J.R., MORAES, V.P.O., GIULIANO-CAETANO, L. DIAS, A.L. 2010. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* 9 (3): 1929-1935.
- VALCARCEL, A., BRUNNER, P., MAGGESE, M. C. 1993. B- chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture* 110:111-118.
- VASCONCELOS, C., MARTINS-SANTOS, I.C. 2000. Chromosome Polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* 132: 103-109.
- VIDOTTO, A. P., SWARÇA. C., A, FENOCCHIO, A. S., DIAS, A. L. 2004. Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity* 95(6):517-520.
- VISSOTTO, P.C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. 1997. A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia* 62:61-66.

- VISSOTTO, P.C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. 1999a. Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3: 9-13.
- VISSOTTO, P. C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. 1999b. Karyotype description of Five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3: 1-7.
- VISSOTTO, P.C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. 2001. Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Science* 5: 97-103.
- YANO, C.F., MARGARIDO, V.P. 2012. First cytogenetic studies of the genus *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): karyotype differentiation and review of cytogenetic data on the Heptapteridae family. *Journal of Fish Biology* 81: 939-953.