



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIAN PATRÍCIA OLIVEIRA DE MORAES

**"ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE
DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Rhamdia quelen*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)"**

Londrina
2007

VIVIAN PATRÍCIA OLIVEIRA DE MORAES

**"ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE
DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Rhamdia quelen*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa.. Dra. Ana Lúcia Dias

Londrina
2007

VIVIAN PATRÍCIA OLIVEIRA DE MORAES

**"ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE
DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Rhamdia quelen*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)"**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina Paraná

Profa. Dra. Lúcia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina Paraná

Prof. Dr. Alberto Sergio Fenocchio
Universidade Nacional de Misiones Argentina

Londrina, 09 de fevereiro de 2007.

*À Deus
e aos meus amados Iza, João,
Cleóstenes, Lilian e Abner...
Meus portos seguros...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o único responsável por todas as maravilhas que já pude experimentar, viver e ver. Obrigada Senhor!

Aos meus amados pais João e Iza pelo apoio incondicional, incentivo e suporte tanto financeiro como emocional. Vocês são os grandes responsáveis pelo que sou. Amo muito vocês!

Ao meu anjo Cléo por estar comigo em todos os momentos, me apoiando, incentivando e até estudando comigo (mesmo sem entender quase nada!). Te amo!

Aos meus irmãos Abner e Lilian, por serem tão amigos e companheiros de todas as horas. Muito obrigada por lutarem, se alegrarem e chorarem comigo. E Binho, que ajuda na formatação desta dissertação, valeu mesmo! Esta vitória também é de vocês!

Ao meu cunhado Luciano, por todo auxílio e disposição nas coletas em Iepê/SP, mas principalmente por fazer minha irmã feliz.

À Mirella por me apoiar e suportar minhas chatices pré-defesa. Cunhada, você é muito especial!

À minha mãe postiça Dolores Matioli por todo colo, carinho e dedicação ofertados a mim durante estes dois anos de mestrado. Você mora em meu coração!

À minha querida amiga e "mãe científica" Dra. Ana Lúcia Dias. Muito obrigada por sempre acreditar em mim, por toda paciência, dedicação e principalmente pela orientação. Amo muito você!

À querida amiga e companheira Dra. Lúcia Giuliano Caetano por todas as dicas, sugestões a até mesmo as críticas feitas para que este trabalho fosse concluído e também pela ótima companhia durante as coletas e também no laboratório.

Ao Dr. Alberto Sergio Fenocchio, membro da banca examinadora, pela disposição em analisar este trabalho.

Ao programa de mestrado em Genética e Biologia Molecular e ao Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual de Londrina/PR, sem os quais não teria sido possível concluir o programa.

Aos professores do mestrado em Genética e Biologia Molecular por todo o conhecimento ofertado durante estes dois anos.

Aos meus colegas de turma por todo esforço, estudo e trabalho, mas também pelas diversões. E aos que se tornaram mais próximos: Luciane, Gabriela, Vanessa, Juliano.

Aos companheiros de laboratório Larissa Lacerda, Tatiane, Tamara, Vitor, Gabriel, Rafaela e Edimar e aqueles que por algum motivo se tornaram mais próximos, Tatiana, Larissa Pires e Rafael. A Rosiley por toda diversão e apoio, inclusive pelas caronas ao centro, Fernando Treco por ser "meu irmão científico" e amigo e a Marceléia por toda ajuda e companheirismo. Vocês são muito especiais!

À Sandra dos Santos Cereali pela amizade, disponibilidade e auxílio na realização deste trabalho. Você faz muita falta aqui!

Ao Professor Ms. Otávio Froehlich pela disposição em coletar os exemplares do Planalto da Bodoquena e à equipe de coleta que trabalha com ele.

Ao biólogo Mauro Caetano por disponibilizar os exemplares provenientes da Piscicultura FUNPIVI para a coleta de sangue.

À Juliana de Souza Carneiro pela preciosa contribuição na realização deste trabalho.

Aos que partiram, mas deixaram saudades: Tatiana Vanzela, Helen, Jéssica, Andressa, Juliana Mazuchelli e Renata.

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

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

Aos queridos amigos Tatiane Castilho, Silvanea Gomes de Paula, Joy Afonso e Brian Powell, que embora muito longe, permanecem em meu coração. Obrigada por torcerem por mim e por me apoiarem. Amo vocês!

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

Muito obrigada!

"Tudo posso naquele que me fortalece"
Filipenses 4:13

MORAES, Vivian Patrícia Oliveira. **Análise citogenética comparativa de diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. 2007. 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

O presente trabalho apresenta dados citogenéticos obtidos em 29 exemplares de *Rhamdia quelen* de cinco diferentes localidades: Rio Água dos Patos, Iepê/SP, Rio Água das Pedras, Londrina/PR, Rio Taquari, Jataizinho/PR, Planalto da Bodoquena/MS e uma Piscicultura localizada em Timbó/SC. Todos os indivíduos apresentaram $2n = 58$, fórmula cariotípica de $36 m + 16 sm + 6 st$ e $NF = 116$. Em 26 exemplares foi observada a presença de 1 a 2 cromossomos B de tamanho médio, com variação tanto inter quanto intraindividual. A banda C revelou estes cromossomos, totalmente heterocromáticos em exemplares dos rios Água dos Patos, Água das Pedras e Taquari, parcialmente heterocromáticos nos exemplares da Piscicultura e eucromáticos nos indivíduos do Planalto da Bodoquena. A NOR foi detectada na região terminal do braço curto do par 28 (st) em exemplares de Água dos Patos, Água das Pedras e Piscicultura, sendo coincidentes com a constrição secundária; nos indivíduos do Rio Taquari a NOR localizou-se no par 23 (sm), apresentando heteromorfismo entre os cromossomos homólogos, e nos exemplares da Bodoquena, no par 20 (sm). A banda C revelou a NOR heterocromática em todos os exemplares, sendo que para os cromossomos do complemento normal em Água dos Patos, Água das Pedras, rio Taquari e Piscicultura foram visualizadas heterocromatina nas regiões terminais de um ou ambos os braços cromossômicos; na população do Planalto da Bodoquena, além destas marcações, observou-se o par 2(m) com três marcações heterocromáticas, sendo duas terminais e uma pericentromérica, sendo muito mais evidente em um dos cromossomos homólogos. A hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S foi realizada nos exemplares da piscicultura, sendo confirmado um par de cromossomos (par 28) portador de cístrons ribossômicos. O tratamento com o fluorocromo CMA₃ revelou apenas a NOR rica em pares GC e o DAPI não apresentou nenhuma marcação, em todas as populações de *R. quelen*. A associação de BC+CMA₃ apresentou resultado igual ao do tratamento simples com CMA₃. BC+DAPI foi realizado satisfatoriamente em 3 populações, Água das Pedras, Água dos Patos e Bodoquena sendo observados alguns cromossomos com marcações fluorescentes, no entanto nesta última localidade, ficou evidenciado um cromossomo muito mais fluorescente que os demais, provavelmente o cromossomo 2(m), indicando que nestas populações a heterocromatina apresenta algumas regiões ricas em AT. Os dados apresentados mostram uma evolução cariotípica mais conservativa no gênero *Rhamdia*, revelando algumas características próprias na população do Planalto da Bodoquena/MS.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*. Cromossomos B. NOR. BC. Fluorocromos. FISH, Evolução cariotípica.

MORAES, Vivian Patrícia Oliveira. **Análise citogenética comparativa de diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. 2007. 84p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

This study presents cytogenetic findings in 29 specimens of *Rhamdia quelen* from five different localities: Água dos Patos river, Iepê/SP, Água das Pedras river, Londrina/PR, Taquari river, Jataizinho/PR, Plateau of Bodoquena/MS and a fish culture located in Timbó/SC. All the individuals presented $2n = 58$, karyotype formulae of $36m + 16sm + 6st$ and $FN = 116$. In 26 individuals was observed 1-2 medium size B chromosome with inter as well as intraindividual variation. C banding showed this chromosome completely heterochromatic in specimens from Água dos Patos, Água das Pedras and Taquari river, partially heterochromatic in the specimens from the fish culture and euchromatic in the individuals of Plateau of Bodoquena. NOR was observed in the terminal region of the short arm in the pair 28 (st) in the specimens from Água dos Patos, Água das Pedras and fish culture, that was coincident with secondary constriction; in the individuals from Taquari river the NOR was in the pair 23(sm), showing heteromorphism between the homologues chromosomes; in the specimens from the Plateau of Bodoquena, in the pair 20 (sm). C banding showed the NOR heterochromatic in all specimens, the other chromosomes of Água dos Patos, Água das Pedras, Taquari river and fish culture presented heterochromatin in terminal region of one or both chromosome arms; in the population from Plateau of Bodoquena, father of this marks, showed 3 heterochromatics marks on pair 2 (m), which was 2 terminals and one pericentromeric, while was more evident in one of the chromosomes homologues. The hybridization *in situ* with 18S DNAr probe was realized in the individuals from the fish culture, confirming one pair of chromosomes (pair 28) bearing the ribosome cistrons. CMA₃ staining showed only the NOR rich in pairs GC and DAPI staining didn't show any marks in all *Rhamdia quelen* populations. The association of CB+ CMA₃ presented the same result of the simple staining with CMA₃. CB+DAPI gave good result in three populations: Água dos Patos, Água das Pedras and Bodoquena, where was seen some chromosomes with fluorescent marks, however in the last one, was seen one chromosome more fluorescent than the others, probably the chromosome 2 (m), indicating that in these populations the heterochromatin shows some regions rich in AT. These results reveals some personal characters in the Plateau of Bodoquena/MS population.

Keywords: *Rhamdia quelen*. B chromosome. NOR. CB. Fluorochromes. FISH. Karyotypic evolution.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Mapa do estado do Mato Grosso do Sul. A estrela indica a região onde os exemplares foram coletados..... 41
- Figura 2** – Cariótipos de *Rhamdia quelen*: (a) giemsa, com presença de Bs; (b) banda C; (c) par cromossômico portador da região organizadora de nucléolos (NOR)..... 42
- Figura 3** – Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* com:(a) CMA₃, (b) DAPI, (c) BC + CMA₃, (d) BC + DAPI..... 43

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Mapa dos locais de coleta - a) Rio Água dos Patos, no município de Iepê/SP, b) Rio Taquari, em Jataizinho/PR, c) Rio Água das Pedras, em Londrina/PR 56
- Figura 2** – Mapa local de coleta da Piscicultura FUNPIVI em Timbó/SC..... 57
- Figura 3** – Cariótipo *Rhamdia quelen*..... 58
- Figura 4** – Cromossomos B de *Rhamdia quelen* com banda C e seus respectivos idiogramas: (a) B totalmente heterocromático, (b) B parcialmente heterocromático 58

CAPÍTULO 3

- Figura 1** – Cariótipo *Rhamdia quelen*: (a) giemsa; (b) banda C; o box mostra a associação da constrição secundária observada nas populações dos rios Água dos Patos, Água das Pedras e Taquari 75
- Figura 2** –(a) par 28 das populações dos rios Água dos Patos, Água das Pedras e da Piscicultura FUNPIVI submetido a BC e a NOR, (b) par 23 da população do rio Taquari submetido a BC e a NOR, (c) FISH da população da Piscicultura 76
- Figura 3** – Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* com: (a) CMA₃, (b) DAPI, (c) BC + CMA₃, (d) BC + DAPI..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados citogenéticos para a família Heptapteridae..... 19

Tabela 2 – Dados citogenéticos do gênero *Rhamdia*..... 25

CAPÍTULO 1

Tabela 1 –Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Planalto da Bodoquena 44

CAPÍTULO 2

Tabela 1 –Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Rio Água dos Patos 59

Tabela 2 –Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Rio Água das Pedras..... 59

Tabela 3 –Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Rio Taquari 60

Tabela 4 –Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* da Piscicultura 60

Tabela 5 –Cromossomos B no gênero *Rhamdia* 61

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Dados citogenéticos no gênero *Rhamdia*..... 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE	14
1.1.1 Aspectos Gerais	14
1.1.2 Aspectos Citogenéticos.....	15
1.1.3 O Gênero <i>Rhamdia</i>	21
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA/MS	28
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2 – CROMOSSOMOS B EM QUATRO DIFERENTES POPULAÇÕES DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE): UMA ANÁLISE COMPARATIVA DA FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA	45
RESUMO	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO 3 – BANDAMENTO CROMOSSÔMICO DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) DE DIFERENTES POPULAÇÕES: CONSIDERAÇÕES EVOLUTIVAS SOBRE O GÊNERO	62
RESUMO	63
INTRODUÇÃO	64
MATERIAL E MÉTODOS	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	67
REFERÊNCIAS	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE

1.1.1 Aspectos Gerais

A família Heptapteridae, pertencente à ordem Siluriformes, é constituída por um grupo de peixes de couro de pequeno a médio porte e, até recentemente, era considerada uma subfamília de Pimelodidae, tendo sido classificada como Rhamdiidae por Pinna, em 1993 e agora como família Heptapteridae por Bockmann e Guazzelli (2003).

Esta família é composta por 26 gêneros: *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 *Taunayia*, sendo estes constituídos por cerca de 186 espécies, das quais 52 ainda não foram descritas (BOCKMANN; GUAZELLI, 2003).

Os heptapterídeos são peixes endêmicos dos Neotrópicos, possuindo uma ampla distribuição em cursos d'água da América Central e do Sul, sendo vários representantes de localidades específicas em áreas de endemismo ictiológico já reconhecidas (BOCKMANN; GUAZELLI, 2003).

As principais características anatômicas dos indivíduos que integram esta família são: 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, mentorial 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; GUAZELLI, 2003; BURGESS, 1989).

A família Heptapteridae inclui espécies de pequeno porte, tendo alguns de seus gêneros, como *Pimelodella* e *Rhamdia*, entre os siluriformes mais comuns de água doce

da América do Sul. Os exemplares adultos raramente ultrapassam o tamanho de 20cm (espécies de *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Pimelodella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*), sendo que cerca de 60% das espécies consideradas tem um comprimento médio de 10 cm. Algumas espécies de heptapterídeos foram incluídas na lista de peixes em miniatura por possuírem de 2 a 2,6 cm, como por exemplo, *Horiomyzon retropinnatus*, *Gladioglanis*, *Imparales* (WEITZMAN; VARI, 1998 apud BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003).

Ecologicamente, os heptapterídeos não diferem da maioria dos Siluriformes. Vivem no fundo de rios pequenos e médios, principalmente em riachos, podendo ser encontrados em águas claras e escuras, frias e moderadas, em profundidades média e pequena. A maioria possui hábitos noturnos (cf COSTA, 1987; CARAMASCHI, 1991; CASATTI; CASTRO, 1998 apud BOCKMANN; GUAZZELLI, 2001), tendem a ser solitários ou em pequenos grupos de até 10 indivíduos. Dimorfismo sexual está ausente ou escassamente desenvolvido, pois os juvenis da maioria das espécies são réplicas em miniatura dos adultos. Devido ao tamanho pequeno da maioria das suas espécies, a família Heptapteridae possui pequena importância comercial em pesqueiros e no comércio em geral. Espécies de *Pimelodella* e *Brachyrhamdia* são apreciadas como peixes ornamentais (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003).

1.1.2 Aspectos Citogenéticos

Os primeiros estudos citogenéticos realizados nesta família datam de 1976, quando Toledo e Ferrari analisaram peixes pertencentes aos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdia*, que até então eram incluídos na família Pimelodidae. A partir daí, vários estudos têm sido desenvolvidos, entretanto, dos 26 gêneros da família Heptapteridae existem dados cariotípicos apenas em 7, a saber: *Cetopsorhamdia*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Pariolius*, *Pimelodella*, *Rhamdella* e *Rhamdia* (Tabela 1).

O número diplóide varia de $2n = 42$ cromossomos em *Pariolius hollandi* (ROMAN; MARGARIDO, 2002) à $2n = 58$ cromossomos em *Rhamdia* (GUILHERME, 2005), desconsiderando-se os cromossomos B, que são característicos deste último gênero. Descrições de triploidia para três espécies do gênero *Rhamdia*, também já foram relatadas por Roman e Margarido (2002), Garcia et al.(2003) e Tsuda (2005), evidenciando uma variabilidade cariotípica ainda maior para esta família.

O cariótipo das espécies pertencentes à família Heptapteridae é formado principalmente por pares de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, ocorrendo em menor quantidade cromossomos dos tipos subtelocêntricos e acrocêntricos, (Tabela 1), mantendo um elevado número fundamental, maior que 80, como em *Imparfinis minutus* (GARCIA; ALMEIDA TOLEDO, 2006b) com $NF = 116$, *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA et al., 2003b) com $NF = 104$, entre outros.

Em relação à presença de cromossomos sexuais neste grupo de peixes, um caso foi descrito por Dias e Foresti (1993) para a população de *Pimelodella* sp. proveniente do Rio Mogi Guaçu/SP, onde foi evidenciado um possível sistema cromossômico sexual do tipo XX/XY. Mais recentemente, Garcia e Almeida-Toledo (2006a) analisando uma população de *Pimelodella boshimai* de Araras/SP, encontraram um possível sistema cromossômico sexual múltiplo, do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1Y_1X_2Y_2$. Portanto, estes são os únicos relatos da ocorrência de cromossomos sexuais na família Heptapteridae.

A região organizadora de nucléolos (NOR) dos heptapterídeos, geralmente apresenta padrão simples, ou seja, apenas um par cromossômico nucleolar. Nos gêneros *Pariolius*, *Pimelodella* e *Rhamdia* a NOR foi observada em região terminal do braço curto (Tabela 1), podendo ocorrer variação do tipo cromossômico. Exemplo disto pode ser observado em *Pariolius holandi*, onde a NOR é observada na região terminal do braço curto de um par submetacêntrico (ROMAN; MARGARIDO, 2002), em espécies do gênero *Pimelodella* estas regiões ocorrem na porção terminal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico em *P. aff. avanhandavae* (SWARÇA et al, 2003b), de um par submetacêntrico em *P. boshimai* (GARCIA; ALMEIDA-TOLEDO, 2006a) e em um par subtelocêntrico em *P. avanhandavae* (VISSOTTO et al., 1999). Variabilidade semelhante ocorre entre as espécies do gênero *Rhamdia* (Tabela 1)

Em espécies dos gêneros *Cetopsorhamdia*, *Imparfinis* e *Rhamdella*, as regiões organizadoras de nucléolo foram observadas em posição intersticial (Tabela 1), tendo sido visualizadas no braço longo de diferentes tipos cromossômicos. Por exemplo, em *Cetopsorhamdia* a NOR intersticial já foi evidenciada em cromossomos submetacêntricos (VISSOTTO et al., 1999), subtelocêntricos e metacêntricos (FENOCCHIO et al., 2003). Em *Imparfinis* também houve variação no tipo cromossômico da NOR, sendo localizada em cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos (VISSOTTO et al., 2002; FENOCCHIO et al., 2003), bem como em metacêntricos (VISSOTTO et al., 2002; GARCIA; ALMEIDA-TOLEDO, 2006b). A única descrição para *Rhamdella microcephalia* (FONSECA et al., 2003) evidenciou a NOR na região intersticial do braço longo de um par metacêntrico.

Há também relatos de NORs múltiplas em *Heptapterus longicauda* (VISSOTTO et al., 1999) e em duas espécies do gênero *Rhamdia* (ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 2001) (tabela 1).

Heteromorfísimo de tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos foi observado em algumas espécies: *Pimelodella* sp2 (VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000), *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA et al., 2003), *Pimelodella meeki* (VIDOTTO et al., 2004), *Imparfinis* cf. *piperatus* e *Imparfinis piperatus* (VISSOTTO et al., 2002), *Imparfinis schubarti* (STOLF et al., 2004) e *Rhamdella microcephala* (FONSECA et al., 2003).

Há poucos dados em relação à técnica hibridação *in situ* fluorescência (FISH) com sonda de DNAr 18S, sendo restritos a apenas duas espécies do gênero *Rhamdia* e para a espécie de *Imparfinis schubarti* (STOLF et al., 2004), onde a região organizadora de nucléolos foi visualizada coincidente com a observada no tratamento com nitrato de prata. Além desta coincidência com a AgNOR, esta técnica possibilitou a verificação do tamanho dos cístrons ribossômicos, revelando que o heteromorfismo visualizado entre os homólogos era apenas funcional.

A heterocromatina nesta família apresenta-se pouco abundante, restringindo-se a pequenos blocos localizados, na maioria das espécies estudadas, nas regiões terminais e/ou centroméricas (Tabela 1). Uma característica interessante em relação a heterocromatina nesta família é o fato de que, em algumas espécies como *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA et al., 2003) e *Rhamdella microcephala* (FONSECA et al., 2003), a região organizadora de nucléolo é banda C positiva.

O tratamento com o fluorocromo cromomicina A₃ (CMA₃) tem sido amplamente utilizado. As análises feitas em *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA et al., 2003), *Pimelodella meeki* (VIDOTTO et al., 2004), *Rhamdella microcephala* (FONSECA et al., 2003) e espécies do gênero *Rhamdia* (GARCIA et al., 2003; FENOCCHIO et al., 2003; STIVARI; MARTINS-SANTOS, 2004; entre outros) revelaram a região organizadora de nucléolo CMA₃⁺, indicando que estas regiões são ricas em pares de base G-C. Em *Imparfinis schubarti* (STOLF et al., 2004) o tratamento revelou marcações fluorescentes correspondentes à NOR e também em outros cromossomos, revelando um padrão parecido com o da banda C.

Na família Heptapteridae também tem sido observada a presença de cromossomos supranumerários ou Bs, encontrados principalmente nas espécies de *Rhamdia*, entretanto uma possível ocorrência de cromossomo supranumerário em *Pimelodella kronei* foi descrita por Almeida-Toledo et al., em 1992.

A tabela, a seguir, apresenta um levantamento dos dados citogenéticos de $2n$, fórmula cariotípica, NF (número fundamental), NOR e BC (banda C) das espécies dos 7 gêneros analisados da família Heptapteridae.

Tabela 1 – Dados Citogenéticos para a Família Heptapteridae

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	NOR	BC	Referência
<i>Cetopsorhandia</i>							
<i>C. iheringi</i>	R. Capivara/SP e R. Pardo/SP	58	28m + 24 sm + 6 st	110	1 par sm, bl intersticial	Centroméricas e teloméricas	Visotto et al., 1999
<i>C. iheringi</i>	R. São Francisco/MG e R. das Marrecas/PR	58	22m + 16sm + 10st + 10a	-	1 par st, bl, intersticial	-	Fenocchio et al., 2003a
<i>C. sp.</i>	Rb. Canta Galo / SP	58	22m + 16sm + 10st + 10a	-	1 par m, bl, intersticial	-	Fenocchio et al., 2003a
<i>Heptapterus</i>							
<i>H. longicauda</i>	Rb. Quinta/SP	52	22m + 26sm + 4st	106	1 par m, bc e 1 par st, bc, terminal	Centromérica, intersticial telomérica	Visotto et al., 1999
<i>Imparfinis</i>							
<i>I. minutus</i>	Cunha/SP	58	42m + 12sm + 4st	116	1 par m, bl, intersticial	Centroméricas e pericentroméricas	Garcia e Almeida-Toledo, 2006
<i>I. mirini</i>	Pilar do Sul/SP	58	42m + 12sm + 4st	116	1 par m, bl, intersticial	Centroméricas e pericentroméricas	Garcia e Almeida-Toledo, 2006
<i>I. cf. piperatus</i>	R. Juquiá /SP	56	24m + 12sm + 20st	-	1 par st, bl, intersticial	-	Fenocchio et al., 2003a
<i>I. cf. pipetatus</i>	R. Juquiá/SP	56	22m + 26sm + 4st + 4a	102	1 par a, bl intersticial	Pericentroméricas e teloméricas	Visotto et al., 2002
<i>I. piperatus</i>	R. Araras/SP	58	32m + 26sm	116	1 par m, bl, intersticial	Pericentroméricas e teloméricas	Visotto et al., 2002
<i>I. piperatus</i>	R. Grande/SP	58	26m + 22sm + 8st + 2a	106	1 par m, bl, intersticial	Pericentroméricas e teloméricas	Visotto et al., 2002
<i>I. aff. schubarti</i>	Rb. Marrequinhas/PR, Rb. Três Bocas/PR, R. Agua da Floresta/PR, R. Vinicins/PR, R. Taquari/PR e R. Jataizinho/PR	58	28m + 28sm + 2st	116	1 par m, bl, intersticial	escassa	Stolf et al., 2004
<i>I. aff. schubarti</i>	Rb. Canta Galo/SP e Rb. Três Bocas/PR	58	22m + 18sm + 10st + 8a	-	1 par m, bl, intersticial	-	Fenocchio et al., 2003a
<i>I. sp.</i>	R. Piumhi/MG	58	20m + 32sm + 6st	116	1 par m, bl, intersticial	Quase inexistente	Kantek et al., 2006
<i>Pariolius</i>							
<i>P. hollandi</i>	R. Iguaçu/PR	42	22m + 10sm + 4st + 6a	-	1 par sm, bc, terminal/ BC+	Pericentromérica par st	Roman e Margarido, 2002
<i>Pimelodella</i>							
<i>P. avanhandavae</i>	R. Araquá/SP e R. Capivara/SP	46	20m + 20sm + 6st	86	1 par st, bc, terminal	Centroméricas	Visotto et al., 1999
<i>P. aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	30m + 22sm	104	1 par m, bc, terminal	Centromérica e telomérica	Swarça et al., 2003
<i>P. boshimai</i>	Araras/SP	46	♂ = 33m + 13sm ♀ = 34m + 12sm X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ / X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂	92	1 par sm, bc, terminal	Pericentroméricas	Garcia e Almeida-Toledo, 2006
<i>P. meeki</i>	R. Limoeiro/PR, R. Couro de Boi/PR e R. Gabriel da Cunha/PR	46	30m + 12sm + 4st	92	1 par sm, bc, terminal	-	Swarça et al., 2004
<i>P. meeki</i>	São Miguel Arcanjo/SP e Pilar do Sul/SP	46	28m + 12sm + 6st	92	1 par sm, bc, terminal	Pericentroméricas	Garcia e Almeida-Toledo, 2006
<i>P. sp.*</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	46	♂ = 40m-sm + 6st-a ♀ = 40m-sm + 6st-a XXXY	-	1 par m-sm, bc, terminal	-	Dias e Foresti, 1993
<i>P. sp.1</i>	R. Paraná/PR	46	20m + 20sm + 6a	92	1 par sm, bc, terminal, BC+	Centroméricas e teloméricas	Vasconcelos e Martins-Santos, 2000
<i>P. sp.2</i>	R. Paraná/PR	52	22m + 22sm + 8st	104	1 par sm, bc, terminal, BC+	Centroméricas e teloméricas	Vasconcelos e Martins-Santos, 2000

Cg. = Córrego; Lg. = Lagoa; R. = Rio; Rb. = Ribeirão; Rp. = Represa; Rv. = Reservatório; Us. = Usina; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; sb = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; bc = braço curto; bl = braço longo.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	NOR	BC	Referência
<i>Rhamdella</i>							
<i>R. microcephala</i>	R. Machado/MG	56	18m + 30sm + 8st-a	84	1 par sm, bl, intersticial, BC+	Pericentromérica	Fonseca et al., 2003
<i>R. sp.</i>	Itaeté/BA	56	26m-sm + 30st-a	82	-	-	Souza et al., 1994
<i>Rhamdia</i>							
<i>R. branneri</i>	R. Iguaçu/PR	58	30m + 10sm + 14st + 4a	-	1 par a, bc, terminal	-	Roman e Margarido, 2002
<i>R. branneri</i>	R. Iguaçu/PR	3n=87	45m + 15sm + 21st + 6a	-	1 par a, bc, terminal	-	Roman e Margarido, 2002
<i>R. branneri</i>	Us. Salto Segredo – R. Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, bc e 1 par st, bl, 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>	p. Monjolinho / SP	58	-	>100	1 par, bc, terminal, BC+	escassa	Fenocchio e Bertollo, 1990
<i>R. cf. hilarii</i>	Rv. Jurumirim/SP, Rb. Quatá/SP, Rb. Jacutinga/SP, Rb. Horózi/SP, R. Aragua/SP, R. Parão/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc, terminal	Centroméricas	Visotto et al., 1999
<i>R. hilarii</i>	Rv. Lobo/SP, Rv. "29"/SP, R. Mogi-Guaçu/SP, R. S. Francisco/MG, R. Aguapey/Ar	58	-	~108	1 par st, bc, terminal, BC+	Restringia-se a NOR	Fenocchio et al., 2000
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-guaçu/SP	58	58 m/sm	116	1 par m-sm, bc, terminal, BC+	Teloméricas	Maistro et al., 2002
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	108	1 par a, bc, terminal	-	Fenocchio et al., 2003a
<i>R. laticauda</i>	EUA	58	-	100±4	-	-	Le Grande, 1981
<i>R. quelen</i>	Lg. dos Quadros/RS e R. Guaíba/RS	58	52m/sm/st +6a	110	1 par a, bc, terminal	-	Hochberg e Erdtmann, 1988
<i>R. quelen</i>	R. Mogi-Guaçu/SP, R. Iguaçu/SC, R. Paraná/Ar	58	-	~108	1 par st, bc, terminal, BC+	Restringia-se a NOR	Fenocchio et al., 2000
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	108	1 par a, bc, terminal	-	Fenocchio et al., 2003a
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	108	1 par st, bc, terminal, BC+	Teloméricas	Fenocchio et al., 2003b
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	116	1 par st, bc, terminal, BC+	Teloméricas	Swarça et al., 2003a
<i>R. quelen</i>	R. Taquarussu/PR	58	26m+20sm+6st+6a	110	1 par st, bc, terminal	Teloméricas e centroméricas	Stivari e Martins-Santos, 2004
<i>R. quelen</i>	Rb. Maringá/PR	58	26m+22sm+6st+4a/26m+24sm+8st	110	1 par sm, bc, terminal	Teloméricas e centroméricas	Stivari e Martins-Santos, 2004
<i>R. quelen</i>	R. Uberabinha/MG	58	26m+20sm+8st+4a	-	1 par m, bc, terminal	-	Guilherme, 2005
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	58	30m+14sm+10st+4a	112	1 par sm, bc, terminal	Teloméricas e centroméricas	Tsuda, 2005
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	3n=87	45m+21sm+15st+6a	168	1 par sm, bc, terminal	Teloméricas e centroméricas	Tsuda, 2005
<i>R. quelen</i>	Cg. Caetano/MG	58	-	-	1 par m, bc, terminal	-	Silva e Morelli, 2005
<i>R. quelen</i>	R. São Francisco/MG, R. Paraíba do Sul/RJ, R. São José/RJ, Cg. Saugho/PR, R. do Oeste/PR, R. Uruguai/RS e Araras/SP	58	-	-	1 par sm-st, bc, terminal	Pericentroméricas e teloméricas	Garcia et al., 2006

Cg. = Córrego; Lg. = Lagoa; R. = Rio; Rb. = Ribeirão; Rp. = Represa; Rv. = Reservatório; Us. = Usina; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; sb = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; bc = braço curto; bl = braço longo.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	NOR	BC	Referência
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	-	-	1 par sm, bc, terminal	teloméricas	Coles et al., 2006
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires/Ar	58	44 m/sm + 14st/a	-	-	-	Valcarcel et al., 1993
<i>R. sapo</i>	Uruguai	56	-	-	-	-	González, 1994
<i>R. sp.</i>	EUA	58	-	100 ± 4	-	-	Le Grande, 1981
<i>R. sp.</i>	Us. Salto Segredo – R.Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, bc, terminal	Teloméricas e centroméricas	Abucarma e Martins-Santos, 2001
<i>R.sp.</i>	Rb. Grande	58	46m/sm+12st/a	-	1 par st, bc, terminal	Centroméricas e teloméricas	Garcia et al., 2003
<i>R.sp.</i>	Rb. Grande	³ⁿ⁼ 87	69m/sm+18st/a	-	1 par st, bc, terminal	Centroméricas e teloméricas	Garcia et al., 2003
<i>R. voulezi</i>	Us. Salto Segredo – R.Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, bc e 1 par st, bl, terminal	Teloméricas e centroméricas	Abucarma e Martins-Santos, 2001

Cg. = Córrego; Lg. = Lagoa; R. = Rio; Rb. = Ribeirão; Rp. = Represa; Rv. = Reservatório; Us. = Usina; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; sb = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; bc = braço curto; bl = braço longo.

1.1.3 O gênero *Rhamdia*

O gênero *Rhamdia* compreende cerca de 28 espécies válidas (FROESE; PAULY, apud STIVARI; MARTINS-SANTOS, 2004), das quais foram analisadas citogeneticamente apenas *Rhamdia sapo*, *Rhamdia sp.*, *Rhamdia branneri*, *Rhamdia laticauda*, *Rhamdia voulezi*, *Rhamdia hilarii* e *Rhamdia quelen* (Tabelas 1 e 2).

As populações estudadas apresentaram $2n = 58$ cromossomos, com exceção de *R. sapo* descrita por Gonzales (1994) onde o número diplóide encontrado foi 56 cromossomos. Apesar de apresentarem o mesmo $2n$ (58 cromossomos) variações em relação à fórmula cariotípica e à presença e quantidade de cromossomos B são bem comuns neste grupo de peixes, como pode ser observado nas Tabela 1 e 2.

A primeira descrição citogenética para *Rhamdia* foi realizada em 1976, quando Toledo e Ferrari analisaram exemplares de *R. hilarii* provenientes do Rio da Onça/SP. Neste trabalho, os autores apresentaram dados apenas sobre o $2n$ (58), fórmula cariotípica (36m + 18sm + 8a) e NF (116). Após este estudo, muitos outros foram realizados.

Hochberg e Erdtmann (1988) analisaram 30 exemplares de *R. quelen* de duas populações distintas, provenientes do estado do Rio Grande do Sul. Nesta análise foi observado número diplóide igual a 58 cromossomos, porém 6 dos 30 exemplares apresentaram $2n = 59$, devido à presença de um cromossomo supranumerário ou B do tipo metacêntrico de tamanho médio que, quando tratado com a técnica de banda C, mostrou-se

heterocromático. Os cromossomos foram distribuídos em 52 m/sm/st e 6a (Tabela 2) com número fundamental igual 110. O padrão de NOR descrito para esta população foi simples, com a marcação obtida no braço curto do par acrocêntrico 29.

Em 1990, Fenocchio e Bertollo analisaram 51 exemplares de *R. hilarii* provenientes do reservatório de Monjolinho (São Carlos/SP). Para esta população os autores encontraram $2n = 58$, com uma variação até 63 cromossomos, devido a presença de cromossomos B (Tabela 2). Os cromossomos desta população eram do tipo metacêntrico, sendo o padrão de distribuição de heterocromatina restrita a poucas bandas proeminentes. Os cromossomos B, também metacêntricos, apresentaram-se totalmente heterocromáticos. A NOR foi localizada no braço curto de um par metacêntrico coincidente com a constrição secundária, que apresentou-se heterocromática.

Um estudo com exemplares de *R. cf. hilarii* provenientes de diversas localidades foi realizado por Vissotto et al. (1999), sendo encontrado $2n = 58$ com $NF = 106$ e fórmula cariotípica de $30m + 18sm + 10st$. Além disto, 3 dos 17 exemplares apresentaram 3 Bs metacêntricos (Tabela 2). A NOR foi localizada no braço curto de um par submetacêntricos em todas as populações. O padrão de banda C apresentou-se em pequenos blocos heterocromáticos, nas regiões terminais dos cromossomos, sendo visualizados também na região centromérica de alguns cromossomos. Os Bs também apresentaram-se totalmente heterocromáticos.

Em 2000, Fenocchio et al. analisaram duas espécies de *Rhamdia*: *R. hilarii* e *R. quelen*. Os exemplares foram coletados em diferentes reservatórios e rios tanto do Brasil como na Argentina. Ambas espécies apresentaram $2n = 58$, sendo a maioria dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, caracterizando um $NF=108$. Cromossomos Bs foram observados em ambas as espécies, com variação de 1 a 5 cromossomos entretanto, as populações argentinas não apresentaram este tipo de cromossomo. A região organizadora de nucléolos foi identificada no braço curto de um par subtelo-cêntrico, coincidente com a constrição secundária. As duas espécies estudadas, apresentaram pouca heterocromatina, restringindo-se basicamente apenas às NORs e a ambos os braços dos cromossomos Bs.

Abucarma e Martins-Santos (2001) analisaram três espécies deste gênero: *Rhamdia branneri*, *R. voulezi* e *R. sp.* do rio Iguaçu, coletadas no reservatório da Hidrelétrica de Salto Segredo (Guarapuava/PR). Todas as espécies apresentaram $2n = 58$ no entanto, os exemplares de *R. branneri* possuíam variação de $2n = 58$ a 62, devido a presença de 1 a 4 Bs, enquanto *R. voulezi* e *R. sp.* apresentaram de $2n = 58$ a 60, apresentando de 1 a 2 Bs e a fórmula cariotípica foi a mesma para todas as espécies (tabela 2). Os Bs eram dos tipos

metacêntricos e submetacêntricos médios nas espécies de *R. branneri* e *R. voulezi*, enquanto que em *R. sp.* apresentavam-se como acrocêntricos pequenos, sendo parcialmente heterocromáticos em *R. branneri* e eucromáticos em *R. sp.* e *R. voulezi*. O tratamento com o fluorocromo CMA₃, evidenciou intensa marcação no cromossomo B metacêntrico de *R. branneri*.

A heterocromatina mostrou-se distribuída em regiões terminais e/ou centroméricas nas três espécies de *Rhamdia* analisadas por Abucarma e Martins-Santos (2001). *R. voulezi* apresentou a NOR, em um par acrocêntrico (par 29), enquanto que *R. branneri* e *R. sp.* apresentaram, além deste par 29, um par subtlocêntrico com a NOR no braço longo, evidenciando o único relato de NORs múltiplas neste grupo de peixes.

Maistro et al. (2002) realizaram um estudo com *R. hilarii* proveniente do Rio Mogi Guaçu., onde além do $2n = 58$ foram visualizados até 2 cromossomos B (tabela 2), metacêntricos médios, que mostraram-se parcialmente heterocromáticos. A heterocromatina mostrou-se fracamente distribuída no complemento cromossômico padrão. A NOR apresentou-se coincidente com a constrição secundária, sendo banda C positiva e correspondente às marcações pelo fluorocromo CMA₃. Os autores citados também utilizaram diversas enzimas de restrição sendo que *AluI* e *HaeIII* revelaram um padrão semelhante ao da banda C, com os Bs digeridos somente na região pericentromérica. *HhaI* e *PvuI* revelaram um padrão específico, não sendo possível a visualização dos Bs e as enzimas *BamHI* e *HinfI* revelaram um padrão parecido semelhante ao da banda G.

Roman e Margarido (2002) descreveram uma ocorrência de triploidia natural para *R. branneri* coletada no Rio Iguaçu/PR com um $3n = 87$ além de 4 cromossomos B. Os exemplares diplóides apresentaram a NOR no braço curto de um par acrocêntrico, e o indivíduo triplóide mostrou três cromossomos portadores da NOR. Estas marcações foram coincidentes com o tratamento realizado com o fluorocromo mitramicina.

Garcia et al. (2003) descreveram mais um caso de triploidia natural no gênero, em um exemplar de *Rhamdia sp.* proveniente do ribeirão Grande (Serra da Mantiqueira/SP), sem cromossomos B, no entanto os indivíduos diplóides apresentaram até 4 Bs metacêntricos. A NOR estava localizada no par 27 subtlocêntrico/acrocêntrico, na região terminal do braço curto, sendo observado no triplóide três marcações. O padrão de distribuição da heterocromatina foi semelhante ao já observado no gênero, exceto por possuir blocos na região centromérica ou pericentromérica de alguns cromossomos. CMA₃ e o FISH com sonda de DNAr 18S apresentaram marcação coincidente com a NOR e a sonda de DNAr

5S revelou apenas um par de cromossomos m/sm com marcação pericentromérica, sendo este o único relato, até o momento.

Uma análise feita por Tsuda (2005) com 5 exemplares de *R. quelen* do Ribeirão Lindóia (Londrina/PR) revelou o primeiro caso de triploidia natural para esta espécie, sendo a terceira descrição para o gênero. Não foram observados Bs, nem mesmo nos diplóides (tabela 2). A NOR apresentou-se na porção terminal do braço curto de um par submetacêntrico e o triplóide mostrou 3 marcações, sendo coincidentes com a CMA₃. A banda C mostrou regiões heterocromáticas terminais e algumas centroméricas.

Estudos realizados com *R. quelen* do Rio Paraná, Posadas/Argentina e *R. hilarii* do rio Aguapey, Corrientes/Argentina por Fenocchio et al. (2003a) revelaram número diplóide igual a 58 com fórmula cariotípica de 26m + 16sm + 8st + 8a (NF = 108), não tendo sido encontrados cromossomos B. A NOR foi localizada no braço curto do par 4 do grupo.

Em outra população de *R. quelen* analisada por Fenocchio et al. (2003b), proveniente do rio Iguazu, foi observada uma fêmea com um cromossomo B metacêntrico heterocromático (tabela 2). A NOR foi observada no braço curto de um par subtelocêntrico, coincidente com uma constrição secundária e com o fluorocromo cromomicina A₃, apresentando-se heteromórfica. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sonda DNAr 18S, foi realizado nesta população, não sendo evidenciado o heteromorfismo da NOR.

Swarça et al. (2003) analisaram uma população de *R. quelen* do rio Iguazu, onde a NOR coincidiu com a constrição secundária de um par acrocêntrico (tabela 1). A banda C revelou blocos heterocromáticos fracamente marcados, inclusive a constrição secundária. A coloração com o fluorocromo CMA₃ apresentou-se correspondente a NOR e com o DAPI os cromossomos revelaram coloração uniforme. A combinação de BC+CMA₃ ou DAPI revelou distintos blocos fluorescentes no par da NOR, assim como vários sinais fluorescentes nos demais cromossomos. Segundo os autores, estes resultados sugerem uma modificação da estrutura da cromatina pelo tratamento de banda C, aumentando a coloração pelos fluorocromos.

Guilherme (2005) estudando uma população de *R. quelen* do Rio Uberabinha (Uberlândia/MG), encontrou de 0 à 7 cromossomos B, de todos os tipos cromossômicos e de tamanho médio a pequeno. Esta foi a maior quantidade de Bs encontradas em um exemplar, até o momento. A fórmula cariotípica para esta população foi 26m + 20sm + 8st + 4a. A NOR apresentou-se na porção terminal do braço curto de um par de cromossomos do tipo metacêntrico e a banda C revelou Bs total e parcialmente heterocromáticos.

A tabela a seguir apresenta, além do 2n, fórmula cariotípica e NF, dados sobre a o tipo, tamanho e distribuição da heterocromatina dos cromossomos B nas populações de *Rhamdia* analisadas até o momento.

Tabela 2 – Dados Citogenéticos do gênero *Rhamdia*

Gênero/Espécie	Localidade	BH	2n	Cariótipo	NF	B	Tipo B	Tamanho	Heterocromatina	Rf.
<i>R. branneri</i>	Us. Salto Segredo – R. Iguaçú/PR	AP	58	36m+14sm+4st+4a	112	0-2	m e sm	médio	parcialmente	1
<i>R. branneri</i>	R. Iguaçú/PR	AP	58	30m+10sm+14st+4a	-	-	-	-	-	2
<i>R. hilarii</i>	R. Onça / SP	AP	58	36m+18sm+8a	116	-	-	-	-	3
<i>R. hilarii</i>	Rp. Monjolinho / SP	AP	58	-	>100	0 – 5	m	pequeno à médio	parcialmente	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Rv. Jurumirim/SP, Rb. Quinta/SP, Rb. Jacutinga/SP, Rb. Hortelã/SP, R. Araçuaí/SP, R. Pardo/SP	-	58	30m+18sm+10st	106	0-3	m	pequeno	totalmente	5
<i>R. hilarii</i>	Rv. Lobo/SP	AP	58	-	~108	0-3	M	médio	parcialmente	6
<i>R. hilarii</i>	Rv. "29"/ SP	AP	58	-	~108	0-5	m	médio	parcialmente	6
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-Guaçu/SP e R. Aguapey/Ar	AP/PA	58	-	~108	-	-	-	-	6
<i>R. hilarii</i>	R. S. Francisco/MG	SF	58	-	~108	2	m	médio	parcialmente	6
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-guaçu/SP	AP	58	58 m/sm	116	0-2	m	médio	parcialmente	7
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	PA	58	26m+16sm+8st+8a	108	-	-	-	-	8
<i>R. laticauda</i>	EUA	-	58	-	100±4	-	-	-	-	20
<i>R. quelen</i>	Lg. dos Quadros/RS, R. Guaíba/RS	PA	58	52m/sm/st +6a	110	0-2	m	médio	totalmente	9
<i>R. quelen</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	AP	58	-	~108	4	m	médio	parcialmente	6
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçú/SC	PA	58	-	~108	0-1	m	médio	parcialmente	6
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	PA	58	-	~108	-	-	-	-	6
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	PA	58	26m+16sm+8st+8a	108	-	-	-	-	8
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçú/PR	PA	58	32m+16sm+6st+4a	116	0-1	m	-	totalmente	10
<i>R. quelen</i>	R. Taquarussu/PR	AP	58	26m+20sm+6st+6a	110	1-4	m	médio à grande	parcialmente	11
<i>R. quelen</i>	Rb. Maringá/PR	AP	58	26m+22sm+6st+4a/ 26m+24sm+8st	110	-	-	-	-	11
<i>R. quelen</i>	R. Uberabinha/MG	SF	58	26m+20sm+8st+4a	-	0-7	m,sm,a	pequeno à médio	total ou parcialmente	12
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	AP	58	30m+14sm+10st+4a	112	-	-	-	-	13
<i>R. quelen</i>	C. Caetano/MG	SF	58	-	-	-	-	-	-	14
<i>R. quelen</i>	C. do Bebedouro/MG	SF	58	-	-	0-2	-	-	-	15
<i>R. quelen</i>	R. São José/RJ e C. Sangão/PR	-	58	-	-	0-1	-	-	totalmente	16
<i>R. quelen</i>	R. São Francisco/MG	SF	58	-	-	0-4	-	-	totalmente	16
<i>R. quelen</i>	Araras/SP	-	58	-	-	0-6	-	-	totalmente	16
<i>R. quelen</i>	R. Paraíba do Sul/RJ, R. do Oeste/PR, R. Uruguai/RS	-	58	-	-	-	-	-	-	16
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	PA	58	-	-	-	-	-	-	17
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires/Ar	PA	58	22 m/sm + 7st/a	-	0-1	m e a	-	-	18
<i>R. sp.</i>	EUA	-	58	-	100±4	-	-	-	-	20
<i>R. sp.</i>	Us. Salto Segredo – R. Iguaçú/PR	AP	58	36m+14sm+4st+4a	112	0-2	m	pequeno	eucromático	1
<i>R. sp.</i>	Rb. Grande	PS	58	46m/sm+12st/a	-	0-4	m	pequeno	totalmente	19
<i>R. voulezi</i>	Us. Salto Segredo – R. Iguaçú/PR	AP	58	36m+14sm+4st+4a	112	0-2	m	médio	eucromático	1

BH= Bacia Hidrográfica; n= número haplóide; 2n= número diplóide; NF= número fundamental; B= cromossomo supranumerário; CS=constrição secundária; NOR= região organizadora de nucléolo; p = braço curto; m= metacêntrico; sm = submetacêntrico; st= subtlocêntrico; a= acrocêntrico; R. = rio; Rp.= represa; Rc.=riacho; C.= córrego AP = Bacia do Alto Paraná; SF= Bacia do São Francisco; PA= Bacia do Paraguai

Referências: 1) Abucarma e Martins-Santos, 2001; 2) Roman e Margarido, 2002; 3) Ferrari e Toledo, 1976; 4) Fenocchio e Bertollo, 1990; 5) Vissotto et al., 1999; 6) Fenocchio et al., 2000; 7) Maistro et al., 2002; 8) Fenocchio et al., 2003; 9) Hochberg e Erdtmann, 1988; 10) Swarça et al., 2003a; 11) Stivari e Martins-Santos, 2003; 12) Guilherme, 2005; 13) Tsuda, 2005; 14) Silva e Morelli, 2005; 15) Silva e Morelli, 2006; 16) Garcia et al., 2006; 17) Coles et al., 2006; 18) Valcarcel et al., 1993; 19) Garcia et al., 2003; 20) Le Grande, 1981

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo geral analisar citogeneticamente exemplares de *Rhamdia quelen* de diferentes localidades, contribuindo assim com mais dados a respeito desta espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar cromossomicamente a espécie *Rhamdia quelen* de diferentes populações da Bacia do Paranapanema e de uma piscicultura localizada no município de Timbó/SC;
- b) Caracterizar cromossomicamente a espécie *Rhamdia quelen* do Planalto da Bodoquena/MS;
- c) Detectar as regiões organizadoras de nucléolos (NORs) nas populações estudadas;
- d) Analisar o padrão de distribuição de heterocromatina;
- e) Identificar regiões cromossômicas ricas em pares de base G-C e A-T;
- f) Analisar a possível ocorrência de cromossomos supranumerários nas diferentes populações analisadas de *Rhamdia quelen*.

CAPÍTULO 1

Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) do Planalto da Bodoquena/MS*

Vivian Patrícia Oliveira de Moraes¹, Sandra dos Santos Cereali², Otávio Froehlich² e Ana Lúcia Dias¹

1. Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, vipamoraes@yahoo.com.br

2. Departamento de Biologia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, CCBS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

- Este artigo será enviado para a "Neotropical Ichthyology"

Resumo

No presente trabalho foram analisados exemplares de *Rhamdia quelen* coletados na região do Planalto da Bodoquena/MS. Os estudos citogenéticos revelaram $2n=58$ cromossomos distribuídos em $36m+16sm+6st$, com ocorrência de 1 a 3 cromossomos B metacêntricos e submetacêntricos de tamanho médio, com variação tanto intra quanto interindividual. A NOR localiza-se na região terminal do braço curto do par 20 submetacêntrico. O tratamento com o fluorocromo CMA₃ mostrou-se correspondente à NOR, e com DAPI não foi evidenciada nenhuma marcação fluorescente. A técnica de banda C revelou heterocromatina principalmente nas regiões terminais dos braços cromossômicos, inclusive o par da NOR. Além disso, o par metacêntrico 2 apresentou três blocos heterocromáticos, nas porções terminais e na região pericentromérica. Os cromossomos B mostraram-se eucromáticos. A associação de BC+CMA₃ evidenciou apenas um par cromossômico com marcação fluorescente, provavelmente o da NOR, enquanto que BC+DAPI apresentou vários sinais fluorescentes, inclusive no par 2 metacêntrico, mostrando portanto, que várias regiões heterocromáticas são AT positivas nesta população de *Rhamdia quelen*.

Palavras-chave: Cromossomos B. Banda C. Ag-NOR. Cromomicina A₃ e DAPI.

Introdução

O Planalto da Bodoquena está localizado na porção centro-sul do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, nas proximidades dos municípios de Bonito, Bodoquena, Jardim e Porto Murtinho (Boggiani, 1999). Com área composta por 76.400 hectares, possui ampla diversidade de espécies tanto na flora como na fauna, tendo sido transformado em parque Nacional em 20 de setembro de 2001.

Em relação à hidrografia, esta região possui vários rios, sendo os principais o rio Formoso, rio da Prata, rio Salobra e rio Perdido, todos com suas nascentes no parque Nacional da Bodoquena (Boggiani, 1999).

Willink et al. em 2000 (*apud* Cerealli, 2006) estimaram a ocorrência de pelo menos 325 espécies de peixes, relatando que a ictiofauna do Planalto da Bodoquena apresentava-se de forma peculiar, com muitas formas endêmicas.

Embora possua uma ictiofauna tão rica, os estudos citogenéticos com peixes desta região são extremamente escassos, restringindo-se apenas a três espécies do gênero *Hypostomus*: *H. cochliodon*, *H. sp2* – Rio Perdido NUP 4249 e *H. sp.3* – Córrego Salobrinha NUP 4247, coletados no rio Salobra e Rio Perdido e analisados por Cerealli (2006). Desta forma, torna-se extremamente importante a realização de estudos voltados a citogenética de peixes desta região.

No presente trabalho foram analisados cromossomicamente exemplares de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) provenientes do Planalto da Bodoquena/MS, sendo a primeira descrição citogenética para a espécie nesta região.

Material e Métodos

Foram analisados 4 exemplares de *Rhamdia quelen* (2 machos e 2 fêmeas) coletados no poço da Fazenda Harmonia, no município de Porto Murtinho/MS, pertencente ao Planalto da Bodoquena (figura 1).

As preparações cromossômicas foram obtidas segundo a técnica de preparação direta, a partir do rim posterior, descrita por Bertollo *et al.* (1978). As análises cariotípicas foram realizadas com coloração convencional por Giemsa e os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), segundo a metodologia proposta por Levan *et al.* (1964), sendo todos considerados com dois braços para cálculo do número fundamental (NF).

A região organizadora de nucléolos e o padrão de distribuição da heterocromatina foram evidenciados segundo as técnicas propostas por Howell & Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente. Os tratamentos com fluorocromos base específicos cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI foram realizados segundo as metodologias descritas por Schmid (1980) e Schweizer (1976), respectivamente.

Resultados

Os exemplares estudados apresentaram número diplóide de $2n = 58$, com fórmula cariotípica de $36m + 16sm + 6st$ e número fundamental (NF) de 116 (Fig. 2a), sendo observada a presença de 1 a 3 cromossomos supranumerários ou Bs, com variações tanto intra quanto interindividual (Tabela 1). Os cromossomos B encontrados apresentaram-se de tamanho médio e dos tipos metacêntrico e submetacêntrico (Fig. 2a).

A heterocromatina mostrou-se distribuída nas regiões terminais de quase todos os cromossomos, sendo que alguns deles apresentaram marcação terminal em ambos os braços

(Fig. 1b). O par metacêntrico 2 apresentou, além dos blocos heterocromáticos terminais em ambos os braços, um bloco na região pericentromérica, sendo observada diferença entre os homólogos, pois um deles apresentou a heterocromatina bem mais evidente (Fig. 2b). O par 20 revelou uma forte marcação heterocromática na região terminal do braço curto e os Bs apresentaram-se eucromáticos (Fig. 2b).

A impregnação por nitrato de prata revelou a região organizadora de nucléolo (AgNOR), na região terminal do braço curto do par cromossômico 20 (Fig. 2c)

O tratamento com o fluorocromo CMA₃ revelou marcação positiva no par 20, correspondente à AgNOR (Fig. 2c-3a) e com o fluorocromo DAPI nenhuma marcação foi observada (Fig. 3b). Na associação das técnicas de BC+CMA₃ apenas o par 20 mostrou marcação (Fig. 3c) e na BC+DAPI vários cromossomos apresentaram regiões terminais fluorescentes, em especial um metacêntrico grande, provavelmente o par 2 (Fig. 3d).

Discussão

Os exemplares de *Rhamdia quelen* da região do Planalto da Bodoquena/MS mostraram o 2n característico deste gênero, já observado na grande maioria das espécies e populações analisadas, assim como um NF alto, maior que 100, também característico do gênero *Rhamdia*, devido à presença de cromossomos com dois braços. A fórmula cariotípica, entretanto, sofre uma variação entre as populações analisadas, inclusive a fórmula de 36m +16sm + 6st aqui observada foi diferente de todas as outras de *R. quelen*, conferindo uma variabilidade cariotípica ao gênero e à espécie, talvez devido à presença de rearranjos cromossômicos durante o processo evolutivo do grupo ou ao grau de condensação dos cromossomos, levando a diferenças na classificação entre os autores, visto que neste gênero os cromossomos são muito pequenos.

Nesta população, além do complemento cromossômico normal, foram evidenciados de 1 a 3 cromossomos B nos 4 exemplares analisados, com variação tanto intra quanto interindividual (Tabela 1). Observa-se que dois dos indivíduos estudados (45 ♀ e 46 ♂) apresentam apenas um cromossomo B do tipo metacêntrico médio, enquanto os outros dois (43 ♂ e 44 ♀) apresentam de um até três, sendo estes metacêntricos e submetacêntricos de tamanho médio. A frequência com que estes cromossomos ocorrem entre os indivíduos é bem alta, sendo observada nos indivíduos 43, 44 e 46 uma frequência maior de células com Bs do que as que não possuíam este tipo de cromossomo, conferindo assim à população uma frequência elevada destes cromossomos, sendo observados em 61,54 % das células analisadas. A variação de Bs observada dentro e entre os indivíduos demonstra uma instabilidade mitótica, que deve ser consequência da segregação não mendeliana característica destes cromossomos.

O tipo de cromossomo B mais frequentemente encontrado em *R. quelen* é metacêntrico médio (Hochberg & Erdtmann, 1988; Fenocchio *et al.*, 2000; Swarça *et al.*, 2003), mas há relatos de Bs submetacêntricos e acrocêntricos, de tamanho médio e pequeno (Guilherme, 2005). A maior quantidade e tipo de Bs encontrados em *R. quelen* foi a descrita por Guilherme (2005), onde a população do rio Uberabinha/MG apresentou, em um mesmo indivíduo, até 7 Bs dos tipos metacêntrico, submetacêntricos e acrocêntricos de tamanhos pequeno à médio.

Segundo Fenocchio *et al.* (2000) diferentes espécies e populações de *Rhamdia*, mostram cromossomos B, apesar de sua ampla distribuição geográfica, sendo indicativo de uma origem ancestral para este cromossomo. O fato de terem sido encontrados cromossomos B em *R. quelen* do Planalto da Bodoquena/MS, em uma região isolada, indica novamente que este tipo de cromossomo é característico do gênero *Rhamdia*, reforçando também sua origem de um mesmo ancestral.

Os cromossomos B desta população, quando tratados com banda C, apresentaram-se eucromáticos, sendo este o primeiro relato para *Rhamdia quelen*. Este dado difere dos encontrados nas populações desta espécie analisadas por outros autores, onde os Bs observados eram total ou parcialmente heterocromáticos (Fenocchio *et al.*, 2000; Swarça *et al.*, 2003; Stivari & Martins-Santos, 2004). O único relato de B eucromático no gênero *Rhamdia* foi feito por Abucarma & Martins-Santos (2001) em outras duas espécies, *Rhamdia* sp. e *Rhamdia voulezi*, do rio Iguaçu, coletadas no reservatório da Usina Hidrelétrica de Segredo Salto em Guarapuava/PR.

Desta forma, o que pode estar ocorrendo entre esta população e as demais de *Rhamdia quelen* é uma diferença no processo de heterocromatinização dos cromossomos B, que estaria acontecendo de forma mais lenta nesta população do Planalto da Bodoquena, visto que está localizada em um sistema hidrográfico isolado dos demais já estudados.

O padrão de distribuição da heterocromatina no complemento cromossômico normal, para esta população de *R. quelen*, apresentou-se divergente ao encontrado por outros autores, visto que nesta espécie o padrão mais comumente visualizado restringe-se à fracas marcações nas regiões terminais de um dos braços cromossômicos e em alguns centrômeros (Fenocchio *et al.*, 2003b; Swarça *et al.*, 2003), enquanto que na população do Planalto da Bodoquena, a heterocromatina apresentou-se nas regiões terminais de um ou ambos os braços cromossômicos. O par 2 (m) apresentou três blocos heterocromáticos, dois na porção terminal dos braços cromossômicos e um bloco na região pericentromérica, sendo que um dos homólogos deste par apresentou as bandas mais evidentes. Este tipo de distribuição de heterocromatina em um par cromossômico não foi encontrado em nenhuma das populações analisadas até o momento, sugerindo então, que, além dos Bs, estes exemplares do Planalto da Bodoquena apresentam um possível par marcador (par 2 metacêntrico), que também estaria diferenciando esta população das demais já descritas.

Outro fato interessante obtido na banda C nesta população foi que, no par cromossômico 20 (sm), a porção terminal do braço curto apresentou marcação heterocromática mais evidente que os demais cromossomos. Após impregnação pelo nitrato de prata ficou evidenciado que este cromossomo é o par da NOR, sendo também coincidente com o fluorocromo CMA₃, portanto, esta região além de heterocromática é rica em pares de bases GC. Esta coincidência da NOR com a heterocromatina foi observada anteriormente por Fenocchio *et al.* (2000) e por Swarça *et al.* (2003), bem como o fato da NOR ser rica em GC (Swarça *et al.*, 2003; Stivari & Martins-Santos, 2004; Tsuda, 2005).

Em relação ao tratamento com DAPI, os cromossomos desta população apresentaram-se uniformemente corados, ou seja, nenhum cromossomo mostrou regiões ricas em pares de base AT. Swarça *et al.* (2003) ao analisarem exemplares de *Rhamdia quelen* do Rio Iguaçu, obtiveram o mesmo resultado aqui apresentado com DAPI, observando a NOR um pouco mais pálida.

A localização da NOR em cromossomos do tipo submetacêntrico, como observada nos exemplares aqui apresentados, já havia sido relatada por diversos autores, sendo que neste tipo e em cromossomos subteloicêntricos são encontrados em maior frequência (Fenocchio *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2003; Stivari & Martins-Santos, 2004). NORs em cromossomos dos tipos acrocêntricos foram pouco observados (Hochberg & Erdtmann, 1988; Fenocchio *et al.*, 2003), assim como em cromossomos metacêntricos, recentemente descrito por Guilherme (2005) na população de *R. quelen* do rio Uberabinha/MG. Esta variação no par portador da NOR é mais um indicador de que rearranjos cromossômicos possam estar ocorrendo nestas populações.

O resultado obtido com BC+CMA₃ revelou que apenas a heterocromatina que se encontra associada a NOR é GC rica, no entanto BC+DAPI apresentou um cromossomo metacêntrico grande, provavelmente o par 2, com sinal bem fluorescente, mostrando que a heterocromatina,

visualizada, principalmente, em um dos homólogos deste par, é rica em bases AT. Este fato reforça que este tipo de cromossomo pode ser um marcador para esta população. Além deste par, outras regiões fluorescentes foram evidenciadas. Acredita-se que o pré-tratamento com banda C relaxe o DNA e aumente a acessibilidade dos fluorocromos (Swarça et al, 2003), possibilitando uma análise mais detalhada da composição da heterocromatina. Devido a este fato, os resultados obtidos com BC+DAPI foram diferentes do tratamento simples com este fluorocromo.

Swarça *et al.* (2003) observaram várias marcações nas regiões terminais com BC+CMA₃, além da NOR, em *R. quelen* do rio Iguazu/PR. Com BC+DAPI, os autores também evidenciaram várias marcações terminais, indicando que a heterocromatina da população analisada por estes autores possui uma composição distinta dos dados aqui apresentados.

O presente trabalho é a primeira descrição para *Rhamdia quelen*, do Planalto de Bodoquena/MS. Alguns dados citogenéticos como a ocorrência de Bs eucromáticos, distribuição e a composição da heterocromatina nos cromossomos do complemento normal, principalmente no par 2 metacêntrico, são característicos desta população não sendo evidenciadas em outras. Estes fatos mostram uma diferenciação populacional, sugerindo que os espécimes de *Rhamdia quelen* desta localidade podem ser formas intrínsecas do Planalto da Bodoquena.

Referências Bibliográficas

Abucarma, M & Martins-Santos, I.C. 2001. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia*, 66: 299-306

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

Boggiani, P.C. 1999. Por que Bonito é bonito? p.10-23. In: Scremin- Dias, E., Pott, V.J., Hora, R.C. & Souza. P.R. *Nos Jardins Submersos da Bodoquena*. Campo Grande,UFMS, 160.

Camacho, J.P.M., Sharbel, T.F. & Beukeboom, L.W. 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 355: 163-178

Cereali, S.S. 2006. Estudos Citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul. Unpublished Master's thesis. Universidade Estadual de Londrina-Paraná. 99 p.

Dias, A.L. & Guiliano-Caetano,L. 2002. Citogenética de alguns grupos de peixes do rio Tibagi. p. 473 - 530. In: Medri,M.E, Bianchini, E., Shibatta, O.A.& Pimenta, J.A. (Eds). *A Bacia do Rio Tibagi*. Londrina. p. 589

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). *Folia biologica (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 Iguazu River (Brazil). *Folia biologica* (Kraków), 51: 3-4

Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. & Centofante, L. 2003. B Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia sp.* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68(4): 403-411

Guilherme, L.C. 2005. Estudos Reprodutivos e Citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do Rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e Desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes. Unpublished Ph.D. Dissertation. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 85 p.

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. 1980. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

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

Schmid, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia:IV. Differentiation of G-C and A-T rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.

Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 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.

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

Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L. & Dias, A.L. 2000. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3): 589-593.

Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L., Vanzela, A.L.L. & Dias, A.L. 2001. Heteromorphism of rDNA Size in *Pirinampus pirinampu* (Pisces: Pimelodidae) Detected by *in situ* Hybridization. *Cytologia*, 66: 275-278

Swarça, A.C., Fenocchio, A.S., Cestari, M.M. & Dias, A.L. (2003) Analysis of the heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119:87-92.

Tsuda, J.R. 2005 Análise citogenética em *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae) do Ribeirão Lindóia: Ocorrência de triploidia natural. Unpublished Monography. Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 23 p.

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

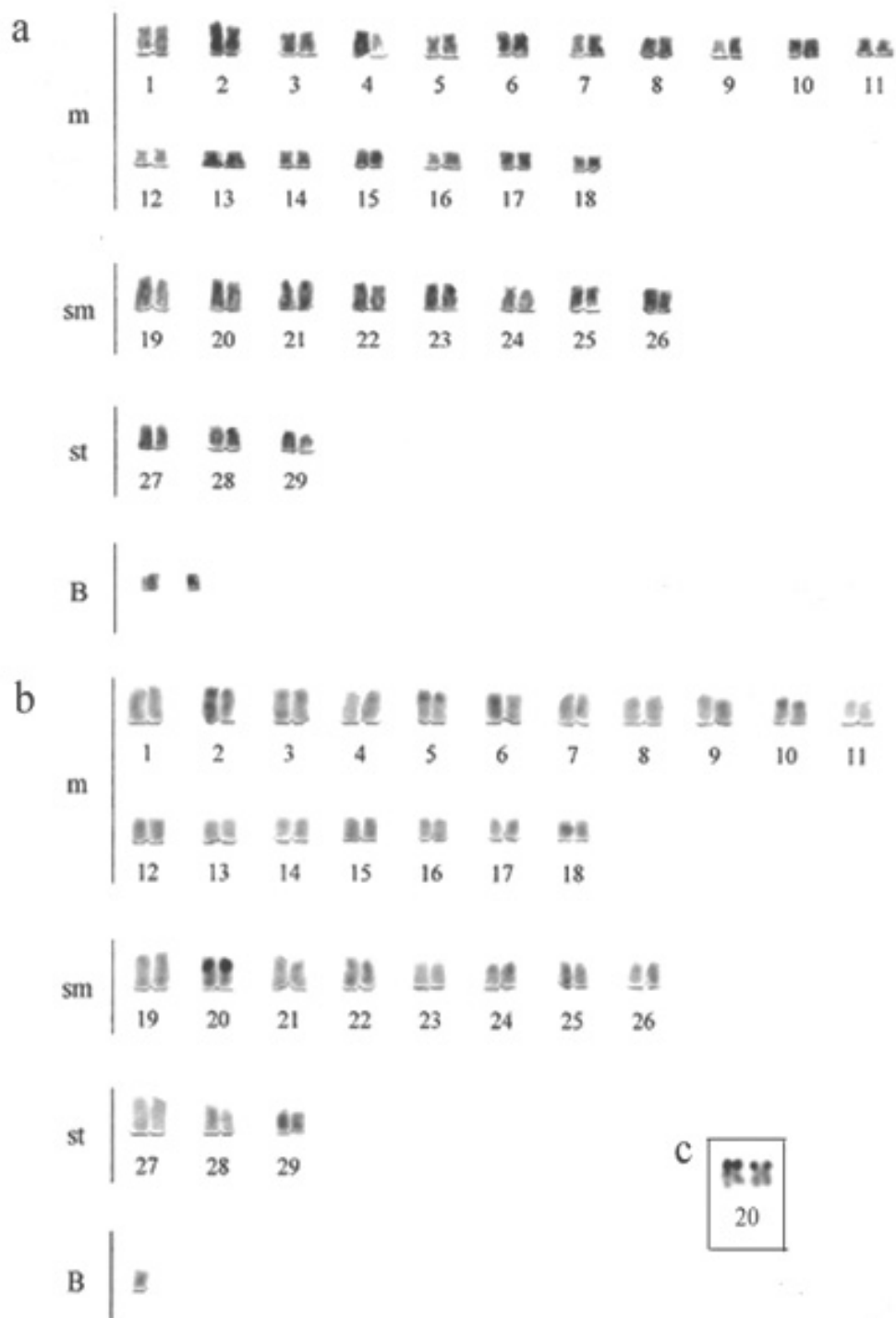


Figura 2 – Cariótipos de *Rhamdia quelen*: (a) giemsa, com presença de Bs, (b) banda C; (c) par cromossômico portador da região organizadora de nucléolos.

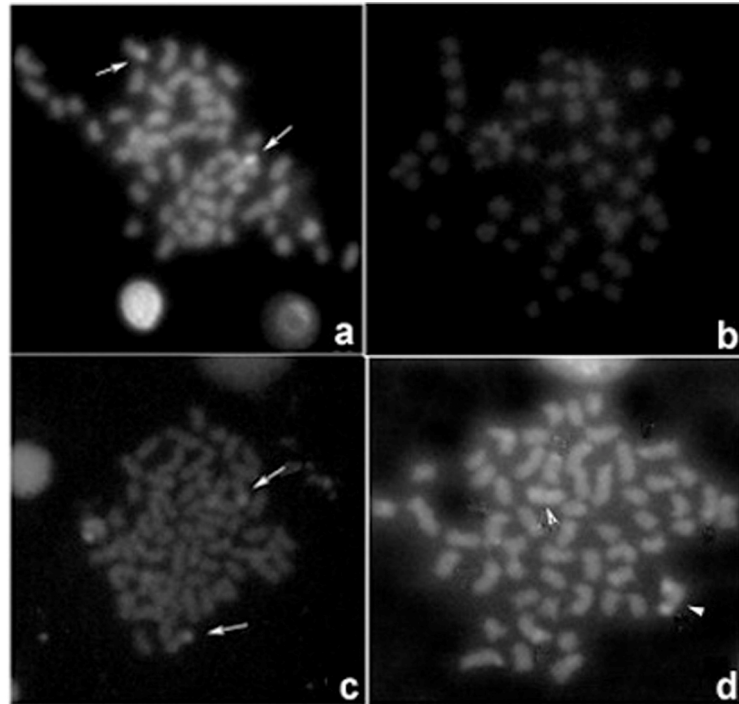


Figura 3 – Metáfases somáticas de *R. quelen* com: (a) CMA₃; (b) DAPI; (c) BC + CMA₃; (d)

BC + DAPI

Tabela 1 – Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Planalto da Bodoquena

INDIVÍDUO	SEXO	N ^o . DE CROMOSSOMO B				TOTAL N ^o . DE CÉLULAS
		0	1	2	3	
43	♂	10	7	6	2	25
44	♀	3	7	5	4	19
45	♀	11	4	0	0	15
46	♂	6	13	0	0	19
Total		30	31	11	6	78
(%)		38,46	39,74	14,1	7,7	100

CAPÍTULO 2

Cromossomos B em quatro diferentes populações de *Rhamdia quelen*
(Siluriformes, Heptapteridae): uma análise comparativa da frequência e
distribuição de heterocromatina*

Moraes, V.P.O., Carneiro, J.S. & Dias, A.L.

* Este artigo será enviado para “Journal of Heredity”

Resumo

No presente trabalho foram analisados citogeneticamente 25 exemplares de *Rhamdia quelen* de quatro localidades distintas. Todos apresentaram número diplóide igual a 58 cromossomos, com fórmula cariotípica de $36m + 16sm + 6st$ e número fundamental (NF) igual a 116. Foi observada em todas as populações a presença de cromossomos B do tipo metacêntrico, sendo que estes apresentaram variações tanto intra quanto interindividual. A técnica de banda C revelou diferença no padrão de distribuição da heterocromatina sendo evidenciados cromossomos Bs totalmente heterocromáticos em três populações: Água das Pedras, Água dos Patos e Rio Taquari, e parcialmente heterocromático na população da Piscicultura do município de Timbó/SC. A presença de cromossomos B em populações tão distintas indica que estes tenham surgido a partir de um ancestral comum, antes da dispersão geográfica desta espécie.

Palavras-chave: Cromossomos B. Banda C. População. *Rhamdia quelen*.

Introdução

Os cromossomos B, também conhecidos como cromossomos supranumerários ou acessórios, são cromossomos adicionais ao complemento normal, podendo ser encontrados em algumas populações de algumas espécies, tendo surgido, provavelmente, de algum cromossomo do complemento padrão, mas que seguem seu próprio caminho evolutivo (Camacho et al., 2000).

Na família Heptapteridae este tipo de cromossomo foi encontrado em *Pimelodella kronei* analisada por Almeida-Toledo et al. (1992), mas é no gênero *Rhamdia* que ocorre com frequência muito maior (Fenocchio e Bertollo, 1990; Vissotto et al., 1999; Fenocchio et al., 2000; Abucarma e Martins-Santos, 2001; Guilherme, 2005; entre outros).

Os cromossomos B em *Rhamdia* apresentam variação tanto intra como interindividual, podendo ser de tipos cromossômicos e tamanhos diferentes (micro, pequeno e médio), sendo os cromossomos B do tipo metacêntrico médio os mais frequentes (Fenocchio et al., 2000; Stivari e Martins-Santos, 2003; Swarça et al., 2003a). Quando submetidos ao tratamento por banda C, estes cromossomos apresentam-se total ou parcialmente heterocromáticos, no entanto há relatos de cromossomos B eucromáticos para as espécies de *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia* sp. descritas por Abucarma e Martins-Santos (2001) e para uma população de *Rhamdia quelen* analisada por Moraes (2007).

Uma vez que os cromossomos B são muito comuns em *Rhamdia*, o presente trabalho teve como objetivo fazer uma análise comparativa da ocorrência, frequência, tipo e padrão de distribuição da heterocromatina de cromossomos B de quatro populações distintas de *Rhamdia quelen*, discutindo uma provável origem, relacionando com as demais populações e espécies do gênero.

Material e Métodos

Foram analisados 25 exemplares de *Rhamdia quelen* de quatro localidades distintas, sendo nove exemplares (3 machos, 5 fêmeas e 1 de sexo indeterminado) coletados no Rio Água dos Patos, Iepê/SP (figura 1a), cinco exemplares (1 macho e 4 fêmeas) do Rio Água das Pedras (figura 1c), Londrina/PR, sete exemplares (3 machos, 3 fêmeas e 1 de sexo indeterminado) do Rio Taquari, Jataizinho/PR (figura 1b) e quatro exemplares da Piscicultura FUNPIVI (Fundação de Piscicultura do Vale do Itajaí), em Timbó/SC (figura 2).

As preparações cromossômicas foram obtidas, para as populações de Água das Pedras, Água dos Patos e do Rio Taquari, através da técnica de preparação direta descrita por Bertollo et al. (1978), onde foi utilizado o rim posterior dos exemplares. Para as populações da Piscicultura e também de Água das Pedras foi realizada a técnica de cultura de linfócitos proposta por Fenocchio e Bertollo (1988). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), segundo a metodologia proposta por Levan et al. (1964), sendo todos considerados com dois braços para cálculo do número fundamental (NF). O padrão de distribuição da heterocromatina foi obtido realizando-se a técnica de Banda C descrita por Sumner (1972).

Resultados e Discussão

Todos os 25 exemplares analisados apresentaram $2n = 58$ cromossomos, com fórmula cariotípica de $36m + 16sm + 6st$ e $NF = 116$ (figura 3). Estes resultados revelaram o mesmo número diplóide de 58 cromossomos que tem sido observado nas demais populações de *Rhamdia* estudadas (Fenocchio et al, 2003a e b; Swarça et al, 2003a; Stivari e Martins-Santos, 2004; entre outros), bem como número fundamental maior que 100.

A presença de cromossomos B do tipo metacêntrico médio foi observada em todas as populações aqui analisadas, sendo que a quantidade e a frequência com que eram obtidos em cada uma delas variava muito. Na população de Água dos Patos todos os 9 indivíduos apresentaram 1B, numa frequência de 18,1% e 2 Bs em 3,8% das células analisadas, com variação tanto inter quanto intraindividual (tabela 1). Nos exemplares de Água das Pedras todos indivíduos também apresentaram Bs, com frequência de 21% das células com 1 B e 5,9% com 2 Bs (tabela 2). No rio Taquari apenas um indivíduo não apresentou cromossomo B, sendo observada 1B numa frequência de 25,73% e 2Bs em 13,45% (tabela 3). Na população de *R. quelen* da Piscicultura, dos 4 indivíduos estudados 2 apresentaram Bs e a frequência de células com 1 B foi de 23,8% e com 2 Bs de 11,11%, sendo semelhante à frequência das populações naturais (tabela 4).

As variações inter e intraindividuais dos cromossomos B nas populações analisadas demonstram a instabilidade mitótica deste cromossomo, provavelmente devido ao seu comportamento não mendeliano durante a divisão celular. Todas as populações apresentaram um exemplar onde a frequência de Bs era maior em relação aos demais indivíduos: indivíduo 3347 de Água dos Patos com 45,71% de frequência; indivíduo 2846 de Água das Pedras com frequência de 55,26%; exemplar 2804 do rio Taquari com 59,52% e exemplar 213 da Piscicultura com 78,95% de frequência. Isto confirma mais uma vez, o comportamento instável deste cromossomo. Variações na frequência dos Bs entre as populações, apesar da diferença no número de exemplares, pode indicar uma diferenciação populacional para *Rhamdia quelen*. A maior frequência obtida foi na população do Rio Taquari, onde 39,18% das células contabilizadas apresentaram de 1 a 2 cromossomos B, seguida pelas populações da Piscicultura (34,92%), Água das Pedras (26,9%) e por fim Água dos Patos (21,9%).

Camacho et al. (2000) relatam que as diferenças de frequências de cromossomos B entre as populações dependem de fatores de seleção (como tolerância dos Bs nas populações

sendo influenciada por condições ambientais, como temperatura e altitude), fatores históricos (como contagem do número de gerações desde a origem do B na população ou até mesmo na espécie), fatores de transmissão (relacionado a mecanismos de acúmulo) e fatores ao acaso. Estes 4 tipos de fatores devem agir simultaneamente, sendo difícil avaliar a ação de cada um deles isoladamente, mesmo quando realizada uma análise mais detalhada.

A presença de Bs no gênero *Rhamdia* é uma característica do grupo, sendo encontrados em 72,98% das diferentes populações e/ou espécies analisadas, em diferentes tipos e tamanhos, mostrando variações intra e interindividuais, conferindo, portanto, um elevado índice de ocorrência destes cromossomos neste gênero.

Quando aplicada a técnica de banda C os cromossomos B apresentaram-se totalmente heterocromáticos para as populações do rio Água das Pedras, Água dos Patos e Taquari, enquanto que nos exemplares da Piscicultura estes eram parcialmente heterocromáticos (Figura 4). Em 61,54% das populações de *R. quelen* estudadas, inclusive do presente trabalho, os Bs apresentaram-se totalmente heterocromáticos e em 30,77% eram parcialmente heterocromáticos, sendo estes os padrões mais frequentes para esta espécie (Tabela 5). Apenas uma população de *Rhamdia quelen*, até o momento, apresentou cromossomos B eucromáticos (Moraes, 2007).

Em outras espécies do gênero *Rhamdia* também foram evidenciados principalmente Bs total e parcialmente heterocromáticos, assim como eucromáticos, mas também em um menor número de espécies (tabela 5), o que pode indicar que o processo de heterocromatinização dos Bs esteja ocorrendo no gênero, em fases distintas do seu processo evolutivo. O fato de terem sido encontrados, no presente estudo, Bs parcialmente heterocromáticos somente na população em cativeiro, não muda esta hipótese, visto que em outras populações naturais também foi observado este padrão de distribuição da heterocromatina para este cromossomo.

Fenocchio et al. (2000) analisando a ocorrência de Bs em diversas espécies do gênero *Rhamdia*, observaram que uma grande parte das populações estudadas possuíam cromossomos B, sendo estes similares em tamanho, morfologia, padrão de banda C, bem como comportamento mitótico irregular, independentemente da ampla distribuição geográfica. Isto levou os autores a sugerirem que a presença destes cromossomos seja um indicativo que sua origem possa ter sido de um ancestral comum, o que explicaria sua ocorrência em populações distantes ou até mesmo isoladas, e que isto teria ocorrido antes da diferenciação e distribuição destas espécies.

O fato de terem sido encontrados Bs em mais 4 diferentes populações de *R. quelen*, sendo 3 de uma mesma bacia (do rio Paranapanema) e uma de cativeiro e de local distante, reforçam a hipótese proposta por Fenocchio et al. (2000), indicando que, a partir de um ancestral comum, estes cromossomos se dispersaram em diferentes populações e estão sofrendo, independentemente, um processo de diferenciação. A ocorrência de Bs no gênero *Rhamdia*, como citado anteriormente, é uma característica marcante deste grupo de peixes, sendo parte integrante do seu processo evolutivo.

Referências Bibliográficas

Abucarma, M e Martins-Santos, I.C., 2001. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia*, 66: 299-306.

Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F, Trajano, E., Almeida, S., 1992. Cytogenetics analysis of the Brazilian catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia*, 45: 255-262.

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

Camacho, J.P.M., Sharbel, T.F. e Beukeboom, L.W., 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 355: 163-178.

Dias, A.L. e Foresti, F., 1993. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética*, 16,3,:585-600.

Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C.(1988) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética*, 11,4

Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C., 1990. Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193-198.

Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C., 1992. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69: 41-46.

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). *Folia biologica (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. e 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 biologica* (Kraków), 51: 3-4.

França, V., 2002. O rio Tibagi no contexto hidrográfico paranaense. In: Medri, M.E, Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. A Bacia do Rio Tibagi. Londrina. p. 45-63.

Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. e Centofante, L., 2003. B Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia sp.* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68(4):403-411.

Guilherme, L.C., 2005. Estudos Reprodutivos e Citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do Rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e Desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia-MG. p.85.

Hochberg, V.B.M. e 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., 1980. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

Levan, A.;Fredga, K.; Sandberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 2001-220.

Maistro, E.L., Oliveira, C. e 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.

Moraes, V.P.O., 2007. Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) do Planalto da Bodoquena/MS. In: *Análise Citogenética Comparativa de Diferentes populações de Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina – PR. p.92.

Stivari, M.K. e Martins-Santos, I.C., 2004. Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia*, 69(1): 25-34.

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

Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (2000) Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23,3: 589-593.

Swarça, A.C., Fenocchio, A.S., Cestari, M.M. e Dias, A.L., 2003. Analysis of the heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119:87-92.

Tsuda, J.R , 2005. Análise citogenética em *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae) do Ribeirão Lindóia: Ocorrência de triploidia natural.Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina –PR. p.23

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

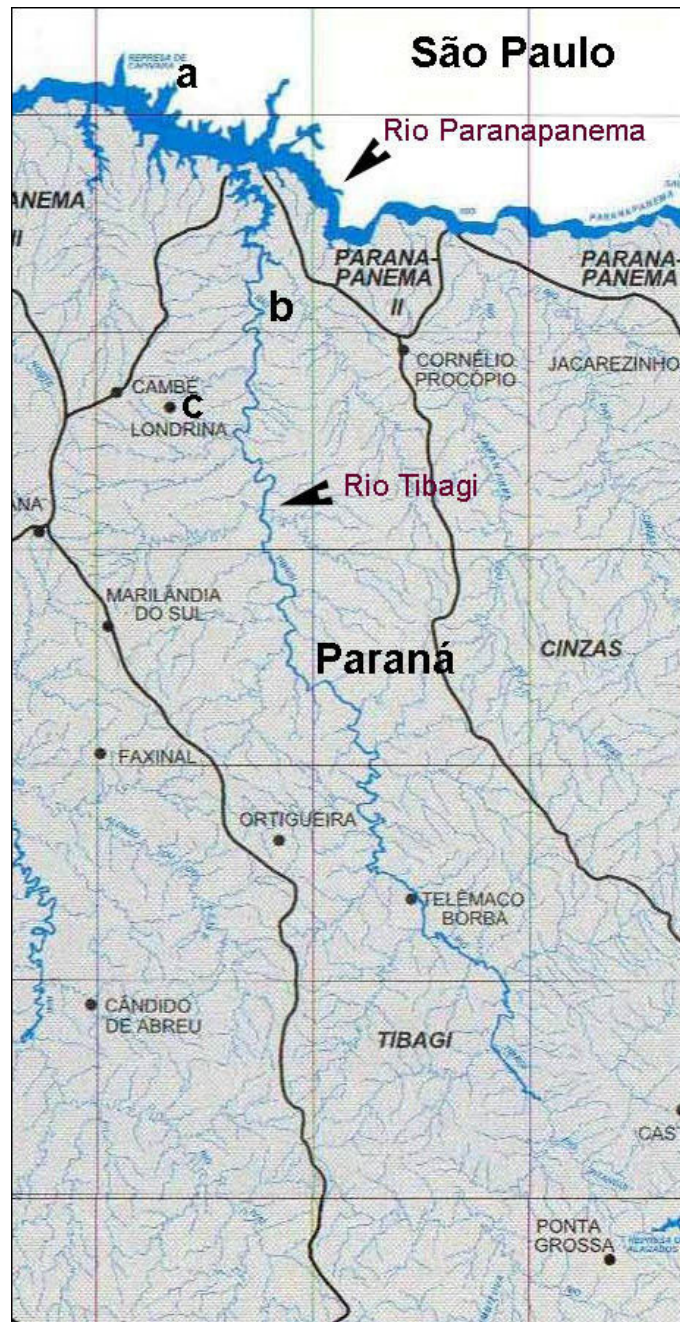


Figura 1 – Mapa locais de coleta – a) Rio Água dos Patos, município de Iepê/SP, b) Rio Taquari, em Jataizinho/PR e c) Rio Água das Pedras, em Londrina/PR



Figura 2 – Mapa do local de coleta: Piscicultura FUNPIVI em Timbó/SC

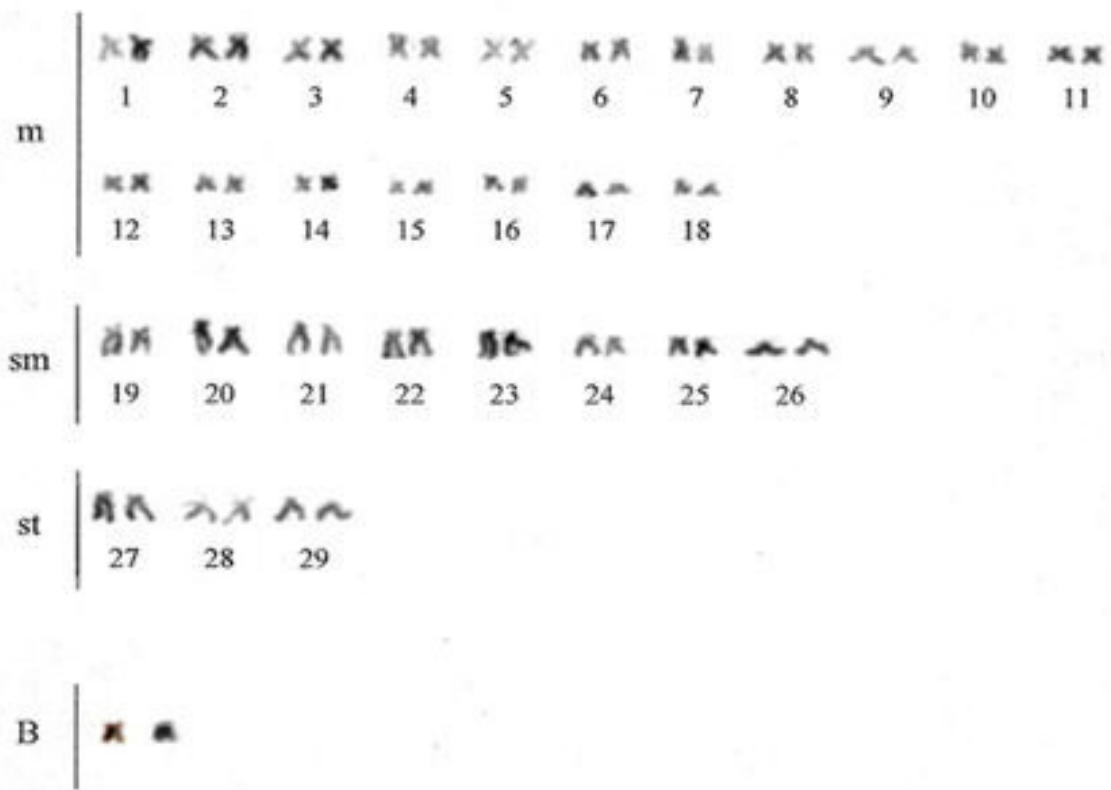


Figura 3 – Cariótipo de *Rhamdia quelen*.

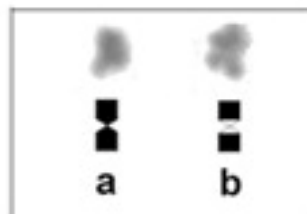


Figura 4 – Cromossomos B de *R. quelen* com banda C e seus respectivos idiogramas (a) B totalmente heterocromático (b) B parcialmente heterocromático

Tabela 1 – Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Rio Água dos Patos

INDIVÍDUO	SEXO	N ^o DE CROMOSSOMO B			TOTAL N ^o DE CÉLULAS
		0	1	2	
2936/435	♀	24	2	0	26
2937/436	♀	22	2	0	24
2938/437	♀	12	1	0	13
2939/438	♀	17	6	2	25
3346	♂	24	4	1	29
3347	♀	19	11	5	35
3372	?	16	4	0	20
3374	♂	16	4	0	20
3375	♂	14	4	0	18
Total		164	38	8	210
(%)		78,1	18,1	3,8	100

Tabela 2 – Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Rio Água das Pedras

INDIVÍDUO	SEXO	N ^o DE CROMOSSOMO B			TOTAL N ^o DE CÉLULAS
		0	1	2	
2831	♀	25	3	1	29
2845	♀	17	1	1	19
2846	♀	17	16	5	38
2847	♀	11	2	0	13
431	♂	17	3	0	20
Total		87	25	7	119
(%)		73,1	21	5,9	100

Tabela 3 – Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* do Rio Taquari

INDIVÍDUO	SEXO	N ^o DE CROMOSSOMO B			TOTAL N ^o DE CÉLULAS
		0	1	2	
1959	♀	16	9	2	27
1961	?	22	1	2	25
2474	♀	19	0	0	19
2804	♂	17	16	9	42
2805	♂	11	7	1	19
2911	♂	11	5	7	23
3305	♀	8	6	2	16
Total		104	44	23	171
(%)		60,82	25,73	13,45	100

Tabela 4 – Frequência de cromossomos B nas células somáticas de *R. quelen* da Piscicultura

INDIVÍDUO	N ^o DE CROMOSSOMO B			TOTAL N ^o DE CÉLULAS
	0	1	2	
211	17	0	2	19
212	8	2	3	13
213	4	13	2	19
214	12	0	0	12
Total	41	15	7	63
(%)	65,08	23,81	11,11	100

Tabela 5 – Cromossomos B no gênero *Rhamdia*. 2n= número diplóide; Bs = cromossomo supranumerário; m= metacêntrico; sm = submetacêntrico; a = acrocêntrico Ref.= referências.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Número de Bs	Tipo/Tamanho	Heterocromatina	Rf.
<i>R. branneri</i> .	Rio Iguaçu/PR	58	0-2	m e sm, médio	parcialmente	1
<i>R. branneri</i>	Rio Iguaçu/PR	58	-	-	-	2
<i>R. hilarii</i>	Rio Onça / SP	58	-	-	-	3
<i>R. hilarii</i>	Represa Monjolino / SP	58	0-5	m, pequeno à médio	parcialmente	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Reservatório Jurumirim/SP	58	0-3	m, pequeno	totalmente	5
<i>R.cf. hilarii</i>	Ribeirão Quinta/SP	58	0-3	m, pequeno	totalmente	5
<i>R.cf. hilarii</i>	Ribeirão Jacutinga/ SP	58	0-3	m, pequeno	totalmente	5
<i>R.cf. hilarii</i>	Ribeirão Hortelã/ SP	58	0-3	m, pequeno	totalmente	5
<i>R.cf. hilarii</i>	Rio Araquá/SP	58	0-3	m, pequeno	totalmente	5
<i>R.cf. hilarii</i>	Rio Pardo/SP	58	0-3	m, pequeno	totalmente	5
<i>R. hilarii</i>	Reservatório Lobo/SP	58	0-3	m, médio	parcialmente	6
<i>R. hilarii</i>	Reservatório “29”/ SP	58	0-5	m, médio	parcialmente	6
<i>R. hilarii</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	58	-	-	-	6
<i>R. hilarii</i>	Rio Aguapey/Ar	58	-	-	-	6
<i>R. hilarii</i>	Rio São Francisco/MG	58	2	m, médio	parcialmente	6
<i>R. hilarii</i>	Rio Mogi-guaçu/SP	58	0-2	m, médio	parcialmente	7
<i>R. hilarii</i>	Rio Aguapey/Ar	58	-	-	-	8
<i>R. quelen</i>	Lagoa dos Quadros/ RS	58	0-2	m, médio	totalmente	9
<i>R. quelen</i>	Rio Guaíba/RS	58	0-2	m, médio	totalmente	9
<i>R. quelen</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	58	4	m, médio	parcialmente	6
<i>R. quelen</i>	Rio Iguaçu/SC	58	0-1	m, médio	parcialmente	6
<i>R. quelen</i>	Rio Paraná/Ar	58	-	-	-	6
<i>R. quelen</i>	Rio Paraná/Ar	58	-	-	-	8
<i>R. quelen</i>	Rio Iguaçu/PR	58	0-1	m	totalmente	10
<i>R. quelen</i>	Rio Taquarussu/PR	58	1-4	m, médio à grande	parcialmente	11
<i>R. quelen</i>	Ribeirão Maringá/PR	58	-	-	-	11
<i>R. quelen</i>	Rio Uberabinha/MG	58	0-7	m,sm, a, pequeno à médio	total ou parcialmente	12
<i>R. quelen</i>	Ribeirão Lindóia/PR	58	-	-	-	13
<i>R. quelen</i>	Planalto da Bodoquena/ MS	58	1-2	m e sm, pequeno	eucromático	19
<i>R. quelen</i>	Rio Água dos Patos/SP	58	1-2	m, pequeno	totalmente	20
<i>R. quelen</i>	Rio Água das Pedras/PR	58	1-2	m, pequeno	totalmente	20
<i>R. quelen</i>	Rio Taquari/PR	58	1-2	m, pequeno	totalmente	20
<i>R. quelen</i>	Piscicultura FUNPIVI/SC	58	1-2	m, pequeno	parcialmente	20
<i>R.sapo</i>	Buenos Aires/Ar	58	0-1	m e a	-	17
<i>R.sp.</i>	Rio Iguaçu/PR	58	0-2	m, pequeno	eucromático	1
<i>R.sp.</i>	Ribeirão Grande	58	0-4	m, pequeno	totalmente	18
<i>R. voulezi</i>	Rio Iguaçu/PR	58	0-2	m, médio	eucromático	1

Ref.: 1) Abucarma e Martins-Santos, 2001; 2) Roman e Margarido, 2002; 3) Ferrari e Toledo, 1976; 4) Fenocchio e Bertollo, 1990; 5) Vissotto et al., 1999; 6) Fenocchio et al., 2000; 7) Maistro et al., 2002; 8) Fenocchio et al., 2003; 9) Hochberg e Erdtmann, 1988; 10) Swarça et al., 2003a; 11) Stivari e Martins-Santos, 2003; 12) Guilherme, 2005; 13) Tsuda, 2005; 17) Valcarcel et al., 1993; 18) Garcia et al., 2003; 19) Moraes, 2007; 20) presente estudo

CAPÍTULO 3

Bandamento cromossômico em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)
de diferentes populações: considerações evolutivas sobre o gênero *

* Este artigo será enviado para Genetical Research

Bandamento cromossômico em *Rhamdia quelen* de diferentes populações:
considerações evolutivas sobre o gênero *

Vivian Patrícia Oliveira de Moraes, Juliana de Souza Carneiro & Ana Lúcia Dias

Resumo

Neste trabalho foram analisadas 4 populações de *R. quelen*. Todas apresentaram a mesma fórmula cariotípica constituída por $36m+16sm+6st$ e $NF = 116$. As populações dos rios Água dos Patos (SP), Água das Pedras (PR) e da Piscicultura FUNPIVI (SC) apresentaram uma constrição secundária no braço curto do par 28 (st), coincidente com a NOR, enquanto que na população do Rio Taquari, a NOR foi visualizada na região terminal do braço curto do par 23(sm), onde os cromossomos homólogos apresentaram um heteromorfismo desta região entre eles. A hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S foi realizada apenas na população da Piscicultura, confirmando 1 par de cromossomos com cístrons ribossômicos. Em todas as populações foram encontrados cromossomos B metacêntricos de tamanho médio. O padrão de distribuição da heterocromatina foi semelhante em todas as populações, restringindo-se a fracas marcações nas regiões terminais dos cromossomos, sendo a NOR banda C positiva. O tratamento com CMA₃ revelou apenas a NOR com marcação fluorescente e com DAPI não foi evidenciada nenhuma região cromossômica. A associação das técnicas de BC + CMA₃ mostrou somente a heterocromatina associada à NOR GC rica. Resultados com BC+DAPI foram favoráveis apenas em duas populações, sendo observadas algumas marcações fluorescentes, demonstrando, portanto, algumas regiões heterocromáticas ricas em AT.

Palavras – chave: *Rhamdia quelen*. NOR. BC. CMA₃, DAPI .

Introdução

O gênero *Rhamdia*, pertencente à família Heptapteridae, compreende cerca de 28 espécies válidas (Froese e Pauly, apud Stivari e Martins-Santos, 2004), das quais apenas sete foram analisadas citogeneticamente: *Rhamdia sapo*, *Rhamdia* sp, *Rhamdia branneri*, *Rhamdia laticauda*, *Rhamdia voulezi*, *Rhamdia hilarii* e *Rhamdia quelen*.

Estudos citogenéticos revelaram para a maioria das populações de *Rhamdia* analisadas um número diplóide igual a 58 cromossomos (Fenocchio et al., 2000; Maistro et al., 2002; Swarça et al., 2003; entre outros); entretanto, variações numéricas intra e interindividuais já foram encontradas em várias populações e/ou espécies do gênero, devido à presença de cromossomos supranumerários ou Bs, sendo a maior quantidade encontrada por Guilherme (2005), na população de *Rhamdia quelen* do rio Uberabinha/MG, que apresentou, em um mesmo indivíduo, até 7 cromossomos B.

A região organizadora de nucléolos (NORs) para o gênero *Rhamdia* está localizada, geralmente, em um único par cromossômico, na região terminal do braço curto, podendo ser do tipo submetacêntrico (Vissotto et al., 1999; Stivari e Martins-Santos, 2004) ou subteloentríco (Fenocchio et al., 2000; Swarça et al., 2003; Stivari e Martins-Santos, 2004).

A heterocromatina neste grupo de peixes tem sido encontrada em pequena quantidade, basicamente distribuída em algumas regiões terminais dos braços cromossômicos (Fenocchio et al., 2000; Swarça et al., 2003).

O tratamento com fluorocromos base específicos têm sido amplamente utilizado nos cromossomos de *Rhamdia*. A cromomicina A₃ (G-C específico) revela, geralmente, marcação fluorescente coincidente com a NOR (Garcia et al., 2003; Fenocchio et al., 2003), enquanto que o DAPI (A-T específico) tem apresentado marcação homogênea em todos os cromossomos (Swarça et al., 2003).

Por fim, uma outra técnica que vem sendo realizada é a hibridação *in situ* com fluorescência, principalmente com sondas de DNAr 18S, sendo visualizados com precisão e exatidão a localização de cístrons ribossômicos. Tais dados já foram obtidos por Fenocchio et al. (2003b) em *R. quelen* e Garcia et al. (2003) em *Rhamdia* sp.

O presente estudo tem como objetivo uma análise comparativa entre 4 populações de *Rhamdia quelen*, através de diferentes bandamentos cromossômicos, visando compreender o processo de evolução cariotípica neste grupo de peixes.

Material e Métodos

Foram analisados 25 exemplares de *Rhamdia quelen* de quatro localidades distintas, sendo nove exemplares (3 machos, 5 fêmeas e 1 de sexo indeterminado) coletados no Rio Água dos Patos, Iepê/SP, cinco exemplares (1 macho e 4 fêmeas) do Rio Água das Pedras, Londrina/PR, sete exemplares (3 machos, 3 fêmeas e 1 de sexo indeterminado) do Rio Taquari, Jataizinho/PR e quatro exemplares da Piscicultura FUNPIVI (Fundação de Piscicultura do Vale do Itajaí), em Timbó/SC.

As preparações cromossômicas foram obtidas, para as populações de Água das Pedras, Água dos Patos e do Rio Taquari através da técnica de preparação direta descrita por Bertollo et al. (1978), onde foi utilizado o rim posterior dos exemplares. Para as populações da Piscicultura e também de Água das Pedras foi realizada a técnica de cultura de linfócitos proposta por Fenocchio e Bertollo (1988). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), segundo a metodologia proposta por Levan et al. (1964), sendo todos considerados com dois braços para cálculo do número fundamental (NF).

O padrão de distribuição da heterocromatina foi obtido realizando-se a técnica de Banda C descrita por Sumner (1972). A detecção da região organizadora de nucléolos foi realizada através da impregnação por nitrato de prata e pela técnica de hibridação *in situ* com fluorescência, proposta por Howell & Black (1980) e Swarça *et al.* (2001), respectivamente. Os tratamentos com fluorocromos base específicos cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI foram realizados, respectivamente, segundo as metodologias descritas por Schmid (1980) e Schweizer (1976).

Resultados

Todos os exemplares analisados apresentaram número diplóide igual a 58 cromossomos com fórmula cariotípica de 36m + 16sm + 6st e NF = 116 (Figura 1a). Os indivíduos dos rios Água das Pedras e Água dos Patos e da Piscicultura apresentaram constrição secundária no braço curto do par 28 (st). Em todas as populações foram encontrados cromossomos B, com variação inter e intraindividual de 1 a 2 (Figura 1a).

A banda C revelou fracas marcações nas regiões terminais de quase todos os cromossomos, sendo que, em alguns, esta marcação foi observada em ambos os braços (Figura 1b). A constrição secundária no par 28 dos exemplares de Água dos Patos, Água das Pedras e Piscicultura apresentou-se heterocromática (Figura 2a), assim como a região terminal do braço curto do par sm 23 da população do Rio Taquari, sendo nesta última observado heteromorfismo entre os cromossomos homólogos (Figura 2b).

Quando realizada a técnica de impregnação por nitrato de prata, as marcações foram coincidentes com a constrição secundária do par 28 subtelocêntrico nas três populações onde esta era visualizada (Figura 2a), e na população do Rio Taquari a NOR apresentou-se na região terminal do braço curto do par 23 submetacêntrico (Figura 2b), mantendo o heteromorfismo observado na banda C. Foi realizada hibridação *in situ* com fluorescência

(FISH), com sonda de DNAr 18S, apenas na população da Piscicultura, onde foi confirmada a localização da NOR no par 28(st).

O tratamento com o fluorocromo CMA₃ apresentou em todas as populações marcação coincidente com a NOR (Figura 3a) e com o DAPI a coloração apresentou-se homogênea (Figura 3b).

A associação de BC + CMA₃ apresentou marcação fluorescente em apenas 1 par cromossômico (Figura 3c) e BC+DAPI mostrou resultados favoráveis apenas em duas populações, Água das Pedras e Água dos Patos, sendo observados alguns cromossomos com marcações fluorescentes (Figura 3d).

Discussão

As quatro populações de *Rhamdia quelen* aqui analisadas apresentaram o número diplóide $2n=58$, corroborando com os dados obtidos, até então, em todas as populações e/ou espécies de *Rhamdia*, sendo esta uma característica conservada neste grupo de peixes (Tabela 1). Apenas uma população de *R. sapo*, estudada por Gonzáles (1994) apresentou um $2n=56$. Entretanto, apesar da conservação do número diplóide, variações na fórmula cariotípica são encontradas no gênero. A distribuição de $36m + 16sm + 6st$ foi constante nas populações do presente estudo, anteriormente descrita apenas para *R. quelen* do Planalto da Bodoquena por Moraes (2007) sendo, portanto, diferente de todas as outras (Tabela 1) mantendo, porém, a predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, revelando um número fundamental maior que 100 para o gênero.

Estas divergências em relação a fórmula cariotípica, podem ser atribuídas a rearranjos cromossômicos que vem ocorrendo nas populações ao longo dos anos ou, ainda, por

diferenças na condensação dos cromossomos, levando os autores à diferenças nas medidas cromossômicas, visto que neste gênero os cromossomos são muito pequenos.

Stivari e Martins-Santos (2004) analisando uma população de *R. quelen* do ribeirão Maringá, obtiveram dois citótipos, onde 77,42% dos exemplares apresentaram a fórmula cariotípica de $26m + 22sm + 6st + 4a$ e 22,58% apresentaram $26m + 24sm + 8st$. Segundo os autores, isto estaria ocorrendo devido a rearranjos cromossômicos estruturais, caracterizando uma diferença intrapopulacional. Embora ocorram variações na macroestrutura cariotípica tanto inter quanto intrapopulacionais no gênero, este fato não foi observado entre as quatro populações aqui analisadas, mantendo-as conservadas em relação à constituição cromossômica.

A presença de cromossomos supranumerários ou Bs também tem sido característica do gênero *Rhamdia* (Tabela 1). As populações de *R. quelen* do presente estudo apresentaram este tipo de cromossomo, cuja ocorrência e frequência foram analisadas por Moraes (2007), sendo evidenciados Bs total e parcialmente heterocromáticos.

O padrão de distribuição da heterocromatina foi semelhante em todas as populações de *R. quelen* aqui analisadas, sendo observadas com fracas marcações terminais nos cromossomos, bem como em ambos os braços de alguns deles e também na constrição secundária das populações de Água das Pedras, Água dos Patos e da Piscicultura e no braço curto do par 23 do Rio Taquari. A distribuição de fracas marcações heterocromáticas terminais é típica do gênero, sendo descrita em diversas populações, no entanto, marcações nas regiões terminais de ambos os braços cromossômicos apenas foram descritas por Fenocchio e Bertollo (1990) em *Rhamdia hilarii* e por Garcia et al. (2003) em *Rhamdia* sp, portanto em *R. quelen* este é o primeiro relato de heterocromatina em ambas extremidades, podendo ser considerada uma importante característica para diferenciação entre as populações e/ou espécies do gênero.

A NOR foi coincidente com a banda C, estando presente na constrição secundária no par 28 (st) das populações dos rios Água dos Patos, Água das Pedras e da Piscicultura, e no braço curto do par 23 (sm) nos indivíduos do Rio Taquari, apresentando um heteromorfismo de tamanho desta região entre os homólogos, como visualizado na banda C. Portanto, em todas as populações de *R. quelen* aqui analisadas, a NOR mostrou-se heterocromática.

Este padrão de NOR simples é bem conservado no gênero *Rhamdia*, entretanto, NORs múltiplas foram encontradas em *R. branneri* e *Rhamdia* sp. provenientes do Reservatório da Usina de Salto Segredo (Governador Ney Braga)/ Rio Iguaçu –PR descritas por Abucarma e Martins-Santos (2001), sendo estas as únicas descrições de NORs múltiplas para este gênero. A variabilidade nos tipos cromossômicos portadores da NOR, entre as populações e/ou espécies de *Rhamdia* (Tabela 1), como foi observado no presente estudo, pode também ser atribuída à ocorrência de rearranjos cromossômicos, como inversões e/ou translocações.

O heteromorfismo da NOR entre os cromossomos homólogos que foi observado apenas na população do rio Taquari, também já foi descrito por Fenocchio et al. (2003) e Stivari e Martins-Santos (2004) em *R. quelen*. Através da hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) Fenocchio et al. (2003) confirmaram que este heteromorfismo era apenas funcional. No presente trabalho, a hibridação com sonda de DNAr 18S foi realizada apenas na população da piscicultura, confirmando, que os cístrons ribossômicos estavam localizados no par cromossômico 28 (st).

Pelo tratamento com o fluorocromo cromomicina A₃ as NORs nas quatro populações mostraram-se positivas sendo, portanto GC ricas. Com o DAPI não foi evidenciada nenhuma marcação mais fluorescente para as populações, revelando a ausência de regiões cromossômicas ricas em AT para estes indivíduos. Os mesmos resultados foram obtidos por Swarça et al. (2003) e Stivari e Martins-Santos (2004) analisando outras populações de *R.*

quelen, entretanto apenas os primeiros autores utilizaram também o DAPI, onde a NOR se apresentou mais pálida em relação aos demais cromossomos.

Quando a banda C foi corada com CMA₃, apenas a NOR mostrou marcação fluorescente nas 4 populações de *R. quelen*, mostrando que a heterocromatina presente nesta região é GC rica. BC+DAPI foi realizada apenas em exemplares de Água das Pedras e Água dos Patos, onde foram evidenciadas mais regiões heterocromáticas ricas em AT, provavelmente devido ao pré-tratamento com banda C, que relaxa o DNA e aumentando a acessibilidade deste fluorocromo, uma vez que o tratamento simples não identificou nenhuma marcação fluorescente. Portanto, a heterocromatina nestas duas últimas populações parece ter diferente composição apresentando, tanto regiões GC quanto AT. em sua composição.

Swarça et al. (2003), utilizaram esta mesma associação para a população de *R. quelen* do Rio Iguaçu, e observaram resultados diferentes dos apresentados aqui. Tanto BC+CMA₃ quanto BC+DAPI mostraram vários cromossomos com marcações fluorescentes, o que levou os autores a sugerirem que a heterocromatina desta população apresenta-se rica em pares GC intercalados com AT. Desta forma, fica claro que a composição da heterocromatina desta população do rio Iguaçu, é distinta das populações de *R. quelen* aqui analisadas, que mantiveram conservadas entre si a constituição heterocromática dos seus cromossomos.

As quatro populações de *R. quelen* aqui analisadas revelaram uma grande similaridade cariotípica entre elas, pois, além do número diplóide característico do gênero, apresentaram fórmula cariotípica, padrão de distribuição e composição da heterocromatina, e NOR simples iguais, sem contar a presença de Bs, mesmo sendo uma população de Piscicultura e as outras três naturais. A única variação mais evidente observada foi em relação ao par portador da NOR. Estas mesmas características podem ser observadas nos dados descritos na literatura para o gênero, demonstrando que o processo evolutivo neste grupo de peixes é mais

conservativo, não descartando, no entanto, que rearranjos cromossômicos possam estar ocorrendo entre algumas populações e/ou espécies de *Rhamdia*.

Bibliografia

Abucarma, M e Martins-Santos, I.C.(2001) Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia*, 66: 299-306

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. e Guazzelli, G.M. (2003) Family Heptapteridae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O. E FERRARIS JR.,C.J. Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipurcs, Porto Alegre. p. 406-431

Dias, A.L. e Foresti, F. (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética.*, 16,3,:585-600

Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C.(1988) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética.*, 11,4

Fenocchio, A.S. e 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). *Folia biologica* (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. e 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 biologica* (Kraków), 51: 3-4

Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. e Centofante, L. (2003) B Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia sp.* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68(4): 403-411

Guilherme, L.C.(2005) Estudos Reprodutivos e Citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do Rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e Desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia-MG

Hochberg, V.B.M. e 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. (1980) Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015

Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 2001-220

Maistro, E.L., Oliveira, C. e Foresti, F. (2002) Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pemelodidae): C-banding, Silver Nitrate and CMA₃ Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia*, 67: 25-31

Moraes, V.P.O., 2007. Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) do Planalto da Bodoquena/MS. In: Análise Citogenética Comparativa de Diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina – PR. p.92.

Schmid, M. (1980) Chromosome banding in Amphibia:IV. Differentiation of G-C and A-T rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103

Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.

Stivari, M.K. e Martins-Santos, I.C. (2004) Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia*, 69(1): 25-34

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

Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (2000) Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23,3: 589-593

Swarça, A.C., Guiliano-Caetano, L., Vanzela, A.L.L. & Dias, A.L. 2001. Heteromorphism of rDNA Size in *Pinirampus pinirampu* (Pisces: Pimelodidae) Detected by *in situ* Hybridization. *Cytologia*, 66: 275-278

Swarça, A.C., Fenocchio, A.S., Cestari, M.M. e Dias, A.L.(2003) Analysis of the heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119:87-92

Tsuda, J.R (2005) Análise citogenética em *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae) do Ribeirão Lindóia: Ocorrência de triploidia natural. Monografia. Universidade Estadual de Londrina –PR

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

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

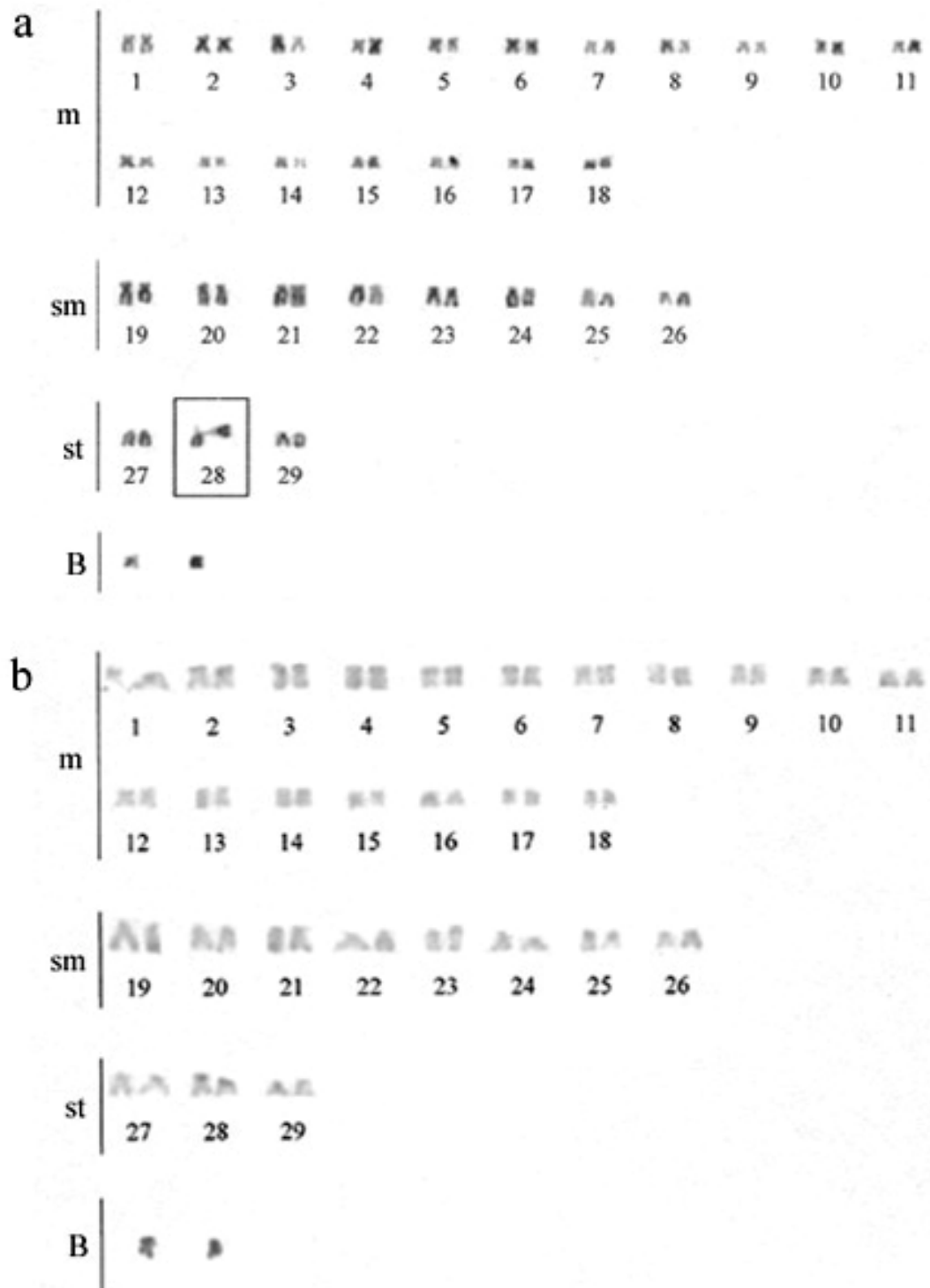


Figura 1 – Cariótipo *Rhamdia quelen* (a) Giemsa, (b) Banda C

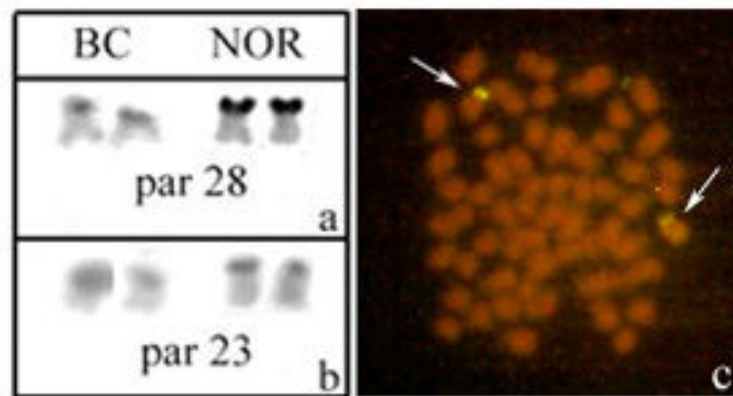


Figura 2 – (a) par 28 das populações do rio Água dos Patos, Água das Pedras e da Piscicultura FUNPIVI submetido a BC e a NOR (b) par 23 da população do Rio Taquari submetido a BC e a NOR (c) FISH da população da Piscicultura

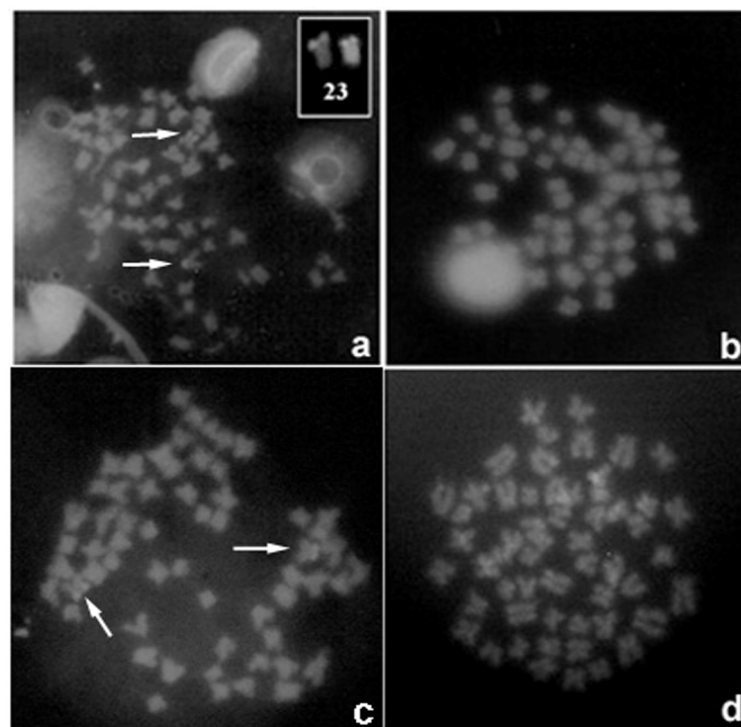


Figura 3 – Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* com: (a) CMA₃, (b) DAPI, (c) BC + CMA₃, (d) BC + DAPI das populações de Água dos Patos e Água das Pedras

Tabela 1 – Dados Citogenéticos no gênero *Rhamdia*: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, NOR = região organizadora de nucléolos, bc = braço curto, bl = braço longo, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, a = acrocêntrico, Ref. = referência

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	NOR	Ref.
<i>R. branneri</i>	Rio Iguçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, bc e 1 par st, bl	1
<i>R. hilarii</i>	Rio Onça / SP	58	36m+18sm+8a	116	-	2
<i>R. hilarii</i>	Represa Monjolinho / SP	58	-	> 100	1 par, bc, BC+	3
<i>R.cf. hilarii</i>	Reservatório Jurumirim/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Ribeirão Quinta/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Ribeirão Jacutinga/ SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Ribeirão Hortelã/ SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Rio Araçuá/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc	4
<i>R.cf. hilarii</i>	Rio Pardo/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, bc	4
<i>R. hilarii</i>	Reservatório Lobo/SP	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. hilarii</i>	Reservatório "29"/ SP	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. hilarii</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. hilarii</i>	Rio São Francisco/MG	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. hilarii</i>	Rio Aguapey/Ar	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. hilarii</i>	Rio Mogi-guaçu/SP	58	58 m/sm	116	1 par m-sm, bc, BC+	6
<i>R. hilarii</i>	Rio Aguapey/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	108	1 par a, bc	7
<i>R. quelen</i>	Lagoa dos Quadros/ RS	58	52m/sm/st+6a	110	1 par a, bc	8
<i>R. quelen</i>	Rio Guaíba/RS	58	52m/sm/st+6a	110	1 par a, bc	8
<i>R. quelen</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. quelen</i>	Rio Iguçu/SC	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. quelen</i>	Rio Paraná/Ar	58	-	~108	1 par st, bc, BC+	5
<i>R. quelen</i>	Rio Paraná/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	108	1 par a, bc	7
<i>R. quelen</i>	Rio Iguçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	108	1 par st, bc, BC+	9
<i>R. quelen</i>	Rio Iguçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	116	1 par st, bc, BC+	10
<i>R. quelen</i>	Rio Taquarussu/PR	58	26m+20sm+6st+6a	110	1 par st, bc	11
<i>R. quelen</i>	Ribeirão Maringá/PR	58	26m+22sm+6st+4a/ 26m+24sm+8st	110	1 par sm, bc	11
<i>R. quelen</i>	Rio Uberabinha/MG	58	26m+20sm+8st+4a	-	1 par m, bc	12
<i>R. quelen</i>	Ribeirão Lindóia/PR	58	30m+14sm+10st+4a	112	1 par sm, bc	13
<i>R. quelen</i>	Ribeirão Lindóia/PR	3n=87	45m+21sm+15st+6a	168	1 par sm, bc	13
<i>R. quelen</i>	Planalto da Bodoquena/ MS	58	36m + 16 sm + 6 st	116	1 par sm, bc	14
<i>R. quelen</i>	Rio Água dos Patos/SP	58	36m + 16 sm + 6 st	116	1 par sm, bc	17
<i>R. quelen</i>	Rio Água das Pedras/PR	58	36m + 16 sm + 6 st	116	1 par sm, bc	17
<i>R. quelen</i>	Rio Taquari/PR	58	36m + 16 sm + 6 st	116	1 par sm, bc	17
<i>R. quelen</i>	Piscicultura FUNPIVI/SC	58	36m + 16 sm + 6 st	116	1 par sm, bc	17
<i>R.sapo</i>	Buenos Aires/Ar	58	44 m/sm + 14st/a	-	-	15
<i>R. sp.</i>	Rio Iguçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, bc	1
<i>R.sp.</i>	Ribeirão Grande	58	46m/sm+12st/a	-	1 par st, bc	16
<i>R.sp.</i>	Ribeirão Grande	3n=87	69m/sm+18st/a	-	1 par st, bc	16
<i>R. voulezi</i>	Rio Iguçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, bc e 1 par st, bl	1

Ref.: 1) Abucarma e Martins-Santos, 2001; 2) Toledo e Ferrari, 1976; 3) Fenocchio e Bertollo, 1990; 4) Vissotto et al., 1999; 5) Fenocchio et al., 2000; 6) Maistro et al., 2002; 7) Fenocchio et al., 2003a; 8) Hochberg e Erdtmann, 1988; 9) Fenocchio et al., 2003b; 10) Swarça et al., 2003a; 11) Stivari e Martins-Santos, 2004; 12) Guilherme. 2005; 13) Tsuda, 2005; 14) Moraes, 2007; 15) Valcarcel et al., 1993; 16) Garcia et al., 2003; 17) presente estudo

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A fórmula cariotípica obtida para *Rhamdia quelen* das cinco populações aqui analisadas foi de 36 m + 16 sm + 6 st, totalizando 58 cromossomos e NF = 116, sendo, portanto, características comuns a todas;
- Em todas as localidades os exemplares de *R. quelen* apresentaram de 1 a 2 cromossomos B de tamanho médio, com variação tanto inter como intraindividual;
- Os cromossomos B apresentaram-se totalmente heterocromáticos nas populações dos rios Água dos Patos, Água das Pedras e Taquari, parcialmente heterocromáticos nos exemplares da Piscicultura e eucromáticos nos exemplares do Planalto da Bodoquena indicando que, embora a origem destes cromossomos possa ser de um mesmo ancestral, eles estariam em diferentes estágios no processo de heterocromatinização;
- As NORs foram observadas na região terminal do braço curto de um par de cromossomos, a saber, o par 28 (st) em Água dos Patos, Água das Pedras e Piscicultura, sendo coincidente com a constrição secundária, o par 23 (sm) no Rio Taquari, onde os homólogos apresentaram heteromorfismo desta região, e o par 20 (sm) nos exemplares do Planalto da Bodoquena, sugerindo que rearranjos cromossômicos envolvendo estas regiões possam estar ocorrendo;
- A técnica de hibridação *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S, realizada em *R. quelen* da população da Piscicultura, confirmou a localização da NOR no par 28 (st);
- O fluorocromo CMA₃ evidenciou regiões ricas em GC apenas para as NORs em todas as populações. O DAPI não evidenciou marcações fluorescentes;
- Através da banda C, a maioria dos cromossomos do complemento normal, apresentaram marcações heterocromáticas nas regiões terminais de um ou ambos os braços cromossômicos para as cinco populações, sendo a NOR banda C positiva em todas elas. No

entanto, apenas a população da Bodoquena mostrou no par 2 (m) três bandas mais evidentes, duas terminais e uma pericentromérica, sugerindo ser um par marcador para esta população;

- A técnica BC+CMA₃ não apresentou diferença em relação ao tratamento simples, portanto apenas a heterocromatina associada à NOR apresentou-se rica em GC;
- BC+DAPI revelou resultados satisfatórios em 3 populações, Água das Pedras, Água dos Patos e Bodoquena, onde foram observadas várias marcações fluorescentes, sendo que nos exemplares da Bodoquena, o par 2(m) apresentou um dos homólogos mais fluorescente que os demais, indicando que a heterocromatina destas populações são ricas em pares de bases AT.
- Os dados apresentados mostram uma evolução cariotípica mais conservativa no gênero *Rhamdia*, revelando algumas características próprias na população do Planalto da Bodoquena/MS, não descartando, no entanto, que rearranjos cromossômicos possam estar ocorrendo neste grupo de peixes.

REFERÊNCIAS

- ABUCARMA, M ; MARTINS-SANTOS, I.C.(2001) Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia*, 66: 299-306
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI, F., TRAJANO, E. ; TRAJANO, S. (1992) Cytogenetics analysis of the Brazilian catfish *Pimelodella kronei* and its presumed ancestor *Pimelodella transitória*. *Caryologia*, 45: 255-262
- BOCKMANN, F.A. ; GUAZZELLI, G.M. (2003) Family Heptapteridae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O. E FERRARIS JR.,C.J. Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipurcs, Porto Alegre. p. 406-431
- BOGGIANI (1999) Por que Bonito é bonito? In: SCREMIN- DIAS, E., POTT, V.J., HORA, R.C. E SOUZA. P.R. Nos Jardins Submersos da Bodoquena. UFMS, Campo Grande. p. 10-23
- BURGESS, W. E.(1989) An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. Canadá: T. F. H. Publication.
- CAMACHO, J.P.M., SHARBEL, T.F. ; BEUKEBOOM, L.W. (2000) B-chromosome evolution.*Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 355: 163-178
- CEREALI, S.S. (2005) Estudos Citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina-PR
- COLES, F.C., SÁNCHEZ, S. ; JORGE, L.C. (2006) Estudos citogenéticos em *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) da Bacia do Rio Paraná, Corrientes, Argentina. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS, 11., INTERNATIONAL CONGRESS OF FISHES GENETICS^., São Carlos. Anais... São Carlos: SBG. p.181
- 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.(1988) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Rev.Brasl. Genet.* 11,4

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. (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69: 41-46

FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, CS., CAMACHO, J.P.M. (2000) B Chromosomes in two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica (Krakow)*, 48: 3-4

FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, CS., 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 Iguaçu River (Brazil). *Folia biologica (Krakow)*, 51: 3-4

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. (2003) B Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia sp.*(Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68(4): 403-411

GARCIA, C., MOREIRA-FILHO, O. ; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (2006). Estudos cariotípicos preliminares em sete populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) com ênfase na diversidade cromossômica e padrão de bandamento dos cromossomos supranumerários. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS, 11., INTERNATIONAL CONGRESS OF FISHES GENETICS,1., São Carlos. *Anais...* São Carlos: SBG. p.167

GARCIA, C. ; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (2006) Conservação cariotípica em populações de *Imparfinis* (Siluriformes, Heptapteridae) das Bacias do Mogi-Guaçu, Paranapanema e Paraíba do Sul. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS, 11., INTERNATIONAL CONGRESS OF FISHES GENETICS,1., São Carlos. *Anais...* São Carlos: SBG. p.110.

GARCIA, C. ; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (2006) Estudos cromossômicos em *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): descrição de um possível sistema sexual múltiplo em *Pimelodella boshimai*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS, II., INTERNATIONAL CONGRESS OF FISHES GENETICS, I., São Carlos. Anais... São Carlos: SBG. p. 183

GONZALEZ, A. (1994) Estudio citogenetico preliminar de tres especies pertenientes al orden Siluriformes (Pisces). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTRÓPICAI, 5, Botucatu. Anais... Botucatu: UNESP. p. 21.

GUILHERME, L.C.(2005) Estudos Reprodutivos e Citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do Rio Uberabinha no município de Uberlândia - MG e Desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia-MG. p.85.

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. Brasil. Genet.*, 11,3: 563-576.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A.(1980) 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. (2006) Citogenética de *Imparfinis* sp. da região de transposição do Rio Piumni-MG. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS, 11., INTERNATIONAL CONGRESS OF FISHES GENETICS, 1., São Carlos. Anais... São Carlos: SBG. p.104.

LEVAN, A.;FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 2001-220.

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.

SCHMID, M. (1980) Chromosome banding in Amphibia:IV. Differentiation of G-C and A-T rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.

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

- SILVA, S.V.S. ; MORELLI, S. (2005) Análise cariotípica em *Rhamdia quelen* do córrego do Caetano da região de Uberlândia - MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: SBG. p. 397.
- SILVA, S.V.S. ; MORELLI, S. (2006) Padrão de coloração de cromomicina A₃ na análise de regiões heterocromáticas em *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do córrego do Bebedouro, Uberlândia - MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52., 2006, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: SBG. p.308.
- SOUZA, I.L., MOREIRA-FILHO, O. ; CASTRO, R.M.C. (1994) Informações citogenéticas preliminares de uma nova espécie de Pimelodidae cego de cavernas (Itaetê,BA). In: Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada de Peixes Neotropicais, 5., 1994, Botucatu. Anais... Botucatu: UNESP, 1994. p.18
- SOUZA , L., GUILIANO-CAETANO, L. ; DIAS, A.L. (2003) Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River Basin. *Cytologia*, 68(4): 345-350.
- SOUZA , L., GUILIANO-CAETANO, L. ; DIAS, A.L. (2004) Banding Chromosome Pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Parana River Basin of Brazil. *Folia biologica (Krakow)* 52 (3-4) 165-169.
- 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. *Experimental Cell Research*, 75:304-306.
- SWARCA, A.C., GUILIANO-CAETANO, L. ; DIAS, A.L. (2000) Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23,3: 589-593
- SWARCA, A.C., GUILIANO-CAETANO, L., VANZELA, A.L.L. ; DIAS, A.L. (2001) Heteromorphism of rDNA Size in *Pinirampus pirinampu* (Pisces: Pimelodidae) Detected by *in situ* Hybridization. *Cytologia*, 66: 275-278

- SWARCA, A.C., FENOCCHIO, A.S., CESTARI, M.M. ; DIAS, A.L.(2003a) Analysis of the heterocromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119:87-92
- SWARCA, A.C., VIDOTTO, A.P.; DIAS, A.L. (2003b) Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil) . *Caryologia*, 56(4): 421-425
- TSUDA, J.R (2005) Análise citogenética em *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae) do Ribeirão Lindóia: Ocorrência de triploidia natural. **Monografia**. Universidade Estadual de Londrina -PR. p.23
- VASCONCELOS, C. ; MARTINS-SANTOS, I.C. (2000) Chromosome Polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132: 103-109.
- VIDOTTO, A.P., SWARQA, A.C., FENOCCHIO, A.S. ; DIAS, A.L. (2004) Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity*, 95(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). *Chromossome Science*, 3:1-7.
- VISSOTTO, P.C., FORESTI, F. ; OLIVEIRA, C. (2002) Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Silurifomes, Heptapteridae). *Chromosome Science*, 5: 97-103