



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JUCELI GONZALEZ GOUVEIA

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES DAS FAMÍLIAS
HEPTAPTERIDAE E PSEUDOPIMELODIDAE
(SILURIFORMES)”**

JUCELI GONZALEZ GOUVEIA

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES DAS FAMÍLIAS
HEPTAPTERIDAE E PSEUDOPIMELODIDAE
(SILURIFORMES)”**

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

Orientadora: *Dra. Ana Lúcia Dias*

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G719e Gouveia, Juceli Gonzalez.

Estudos citogenéticos em peixes das famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae
(Siluriformes) / Juceli Gonzalez Gouveia. – Londrina, 2012.

72 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2012.

Inclui bibliografia.

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

CDU 576.312.32:597

JUCELI GONZALEZ GOUVEIA

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES DAS FAMÍLIAS
HEPTAPTERIDAE E PSEUDOPIMELODIDAE (SILURIFORMES)”**

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

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Alberto Sergio Fenocchio
Universidade Nacional de Misiones

Profª Dra. Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina

Profª Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 17 de fevereiro de 2012

A Deus, meus pais, Edson
e demais familiares!
Minha coragem vem de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força para enfrentar os desafios da vida e por me proporcionar tantas realizações durante a concretização desse sonho.

À minha orientadora prof^a Dra. Ana Lúcia Dias, por ter aceitado me orientar e ter me ensinado muitas coisas durante esses dois anos, principalmente a ter paciência e fazer cada coisa na sua hora certa.

Agradeço também às professoras Dra. Lucia Giuliano Caetano e Dra. Renata da Rosa, pelo apoio e contribuição a esse trabalho em minha banca de qualificação, e também por serem pessoas que estão sempre prontas a ajudar.

Aos membros da banca examinadora prof^o. Dr. Alberto Sergio Fenocchio e à prof^a Dra. Lucia Giuliano Caetano, por aceitarem contribuir com sugestões neste trabalho. Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Sueli, secretária da Pós-Graduação da UEL, por ser prestativa e nos auxiliar nas partes burocráticas da Pós. Aos técnicos de laboratório, Dário e Melissa, pela ajuda no laboratório.

Aos colegas do laboratório de Citogenética Animal (LACA): Marceléia, Angélica de Paula, Natália, Angélica Rossoti, Larissa Pires, Tatiana, Larissa Lacerda, Jamille, Josivanda, Fabio, Vanessa, Ana Cláudia, Laura e Vivian, obrigada a todos pela disposição de me ajudar quando cheguei ao laboratório e por me acolherem, e auxiliarem nas técnicas que não tinha entendimento (Marce e Larissa Pires obrigada por me ajudarem com a FISH). E também muito obrigada pela oportunidade de conviver com vocês e pelos momentos de descontração.

As amigas, Laura, Glaucia, Vick, Priscila, Diana, Alessandra, Virgínea, amigadas que construí em Londrina e que quero levar para o resto da vida. Obrigada meninas pela parceria, pelos momentos e conversas agradáveis durante as saídas, reuniões em casa e principalmente por serem amigas para todas as horas.

À Edihanne, por me apresentar a UEL, me acolher na chegada em Londrina e pela amizade durante todos esses anos.

Aos amigos da faculdade e afins “amigos de caminhada”, Elton, Isis, Tatiana, Juliana, Tatiane, Rafael, Brunna, André, Gustavo, obrigada a todos pelos momentos

de alegrias que me proporcionam, mesmo estando longe, por sempre nos encontramos quando podemos e sempre são momentos maravilhosos. Muito Obrigada!

A Vivian, por ser amiga e parceira de verdade (inclusive na realização desse trabalho), nos momentos bons e difíceis e por me ensinar que quando pedimos para Deus com fé, ele nos atende.

Ao meu namorado Edson, pelo companheirismo, pela compreensão e o respeito por todos esses dias que estamos longe. Obrigada também pelos conselhos, pelo apoio e por sempre acreditar no meu potencial. Amo você!

Ao meu sogro Delmar e sogra Eva, cunhados e cunhadas, obrigada por me acolherem e me fazer sentir parte da família, pelos momentos de conversas e finais de semanas, pela viagem maravilhosa a Aparecida do Norte, momentos inesquecíveis, meu obrigada aos “Da Rosa”.

Em especial a minha família que é o meu porto seguro e a minha vida. Agradeço pelo carinho, apoio incondicional de meus pais Moisés e Digna, minha irmã Marta, meu irmão Jaime, por fazerem parte da minha vida e me ajudarem sempre que preciso, minimizando as dificuldades durante a caminhada. Obrigada minhas sobrinhas Leticia e Gabriele (e o sobrinho que esta chegando), pelas alegrias que trazem a nossa família e por serem crianças maravilhosas. Obrigada a todos vocês e demais familiares por fazer valer a pena cada esforço que tenho.

Enfim, obrigada amigos, colegas, professores, namorado, familiares, entre outros, por tornarem essa jornada mais fácil e possível devido ao apoio e dedicação de todos. Muito obrigada!

*“ A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento
envolvido e não na vitória propriamente dita”
(Mahatma Gandhi)*

*“Seja fiel nas pequenas coisas porque
é nelas que mora sua força”
(Madre Teresa de Calcutá)*

*“A humildade é a única base
sólida de todas as virtudes”
(Confúcio)*

GOUVEIA, Juceli Gonzalez. **Estudos citogenéticos em peixes das famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae (Siluriformes)**. 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

RESUMO

As famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae, da ordem Siluriformes, são compostas por peixes de couro endêmicos da região Neotropical. A família Heptapteridae é composta por 24 gêneros e 189 espécies válidas e Pseudopimelodidae por 5 gêneros e 29 espécies descritas. Estudos citogenéticos nessas duas famílias ainda são escassos, principalmente entre os pseudopimelodídeos. Portanto, visando ampliar as informações citogenéticas da ictiofauna da região neotropical, o presente trabalho foi realizado em três espécies da família Heptapteridae (*Imparfinis schubarti*, *Imparfinis mirini* e *Pimelodella meeki*) e duas espécies da família Pseudopimelodidae (*Pseudopimelodus pulcher* e *Microglanis cottoides*). As duas espécies estudadas de heptapterídeos do gênero *Imparfinis* apresentaram $2n=58$ e número fundamental (NF) igual a 116, com fórmulas cariotípicas diferenciadas: *Imparfinis schubarti* possui $30m+28sm$ e *Imparfinis mirini* com $36m+22sm$. *Pimelodella meeki* apresentou $2n=46$ com $26m+14sm+6st$ e $NF=92$, confirmando uma variabilidade no $2n$ da família Heptapteridae. Ambas as espécies de *Imparfinis* possuem RONS intersticiais no par 1 coincidentes com uma constrição secundária e *P. meeki* apresentou RON terminal no par 17. Todas as AgRONS foram coincidentes com a sonda de DNAr 18S e positivas para o fluorocromo CMA₃, ricas portanto, em bases GC. A distribuição e composição da heterocromatina foram variáveis entre as espécies. *Pimelodella meeki* apresentou pouca quantidade, rica em bases AT e GC. A heterocromatina em *Imparfinis schubarti* mostrou-se positiva apenas para CMA₃. Em *Imparfinis mirini* um fato interessante foi observado: além da heterocromatina ser positiva para o DAPI, o braço longo de um dos cromossomos do par 19, apenas dos indivíduos machos, mostrou-se totalmente heterocromático. Após análises meióticas, esse heteromorfismo pode ser facilmente identificado em fases de paquíteno e metáfase I, apresentando-se heteropicnótico e DAPI positivo. Essa característica pode ser um indício de diferenciação inicial de cromossomos sexuais em *Imparfinis mirini*, reforçando a grande variabilidade cariotípica da família. Entre os pseudopimelodídeos estudados, *Pseudopimelodus pulcher* e *Microglanis cottoides* apresentaram $2n=54$, o que corrobora com o $2n$ descrito para as espécies da família estudadas, citogeneticamente, até o momento. *Pseudopimelodus pulcher* possui $20m+16sm+10st+8a$ e $NF=90$, apresentou de 2 a 4 AgRONS no braço curto de um par par 12 e do par 23. Já *Microglanis cottoides* com $30m+14sm+6st+4a$ e $NF=104$, apresentou apenas um par de cromossomos portador da RON (par 24). Todas as RONS foram coincidentes com as marcações pela sonda de DNAr 18S e fluorocromo CMA₃. Uma fêmea de *Microglanis cottoides* apresentou $45m+21sm+9st+6a$ totalizando 81 cromossomos mais 2 cromossomos extras do tipo metacêntricos pequenos e a RON desse indivíduo foi localizada em três cromossomos subtelocêntricos (24), coincidentes com sítios de DNAr 18S e CMA₃, confirmando a ocorrência de triploidia natural com cromossomos supranumerários. A distribuição da heterocromatina nas duas espécies mostrou-se semelhante sendo observada nas regiões pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos, entretanto, em *Pseudopimelodus pulcher* a heterocromatina foi positiva tanto para CMA₃ como para DAPI, sendo assim rica tanto em pares GC quanto AT, e em *Microglanis cottoides* foi apenas DAPI positiva, inclusive os cromossomos supranumerários do triplóide. Este indivíduo poliplóide pode ter se originado a partir de um gameta feminino diplóide, pois tanto a fêmea quanto o triplóide apresentaram dois cromossomos do primeiro

par parcialmente heterocromáticos, fato este não evidenciado nos machos. Os dados apresentados são inéditos para *P. pulcher* e mostram a primeira descrição de triploidia natural com presença de cromossomos supranumerários na família. Esses resultados contribuem com mais informações citogenéticas para Heptapteridae e Pseudopimelodidae, revelando a importância dos bandamentos para uma melhor caracterização da estrutura cromossômica das espécies, buscando assim, um maior entendimento dos processos envolvidos na evolução cariotípica desses grupos de peixes.

Palavras-chave: Bandamento cromossômico. Cromossomos extras. Heterocromatina. Heteromorfismo. Ostariophysi. Poliploidia. Variabilidade cariotípica.

GOUVEIA, Juceli Gonzalez. **Cytogenetic studies in fishes of the families Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Siluriformes)**. 2012. 72f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

ABSTRACT

The Heptapteridae and Pseudopimelodidae families from Siluriformes order are composed for catfishes endemics from Neotropical region. The Heptapteridae family is composed for 24 genera and 189 valid species and Pseudopimelodidae for 5 genus and 29 valid species. Cytogenetics studies in those families are scarce yet, specially between pseudopimelodids. So, with the aim of increase cytogenetics informations from neotropical region ichthyofauna, the present study was realized in three Heptapteridae family species (*Imparfinis schubarti*, *Imparfinis mirini* and *Pimelodella meeki*) and two Pseudopimelodidae family species (*Pseudopimelodus pulcher* and *Microglanis cottoides*). The two heptapterids species from *Imparfinis* genus presented $2n=58$ and fundamental number (FN) of 116, with different karyotypes: *Imparfinis schubarti* has $30m+28sm$ and *Imparfinis mirini* has $36m+22sm$. *Pimelodella meeki* presented $2n=46$ with $26m+14sm+6st$ and $FN=92$, confirming a variability in the diploid number of Heptapteridae family. Both species from *Imparfinis* genus has interstitial NOR located in one chromossomic par with a secondary constriction and *P. meeki* presented terminal NOR in the par 17. All AgNORs was coincidents with the data obtained with hybridization with the probe rDNA 18S and CMA_3^+ , therefore rich in GC bases. The distribution and composition of heterochromatin was variable across the species. *Pimelodella meeki* showed small quantity of heterochromatin, composed with AT and GC bases. The heterochromatin in *Imparfinis schubarti* showed positive for CMA_3 . In *Imparfinis mirini*, an interesting fact was noted. The heterochromatin was positive for DAPI, and the long arms of just one chromosome from the 19th pair, just in males, showed completely heterochromatic. After meiotic analysis, this heteromorphism was easily identified in pachytene and metaphase I, been heteropicnotic and $DAPI^+$. This characteristic should be an hint of inicial differentiation of sexual chromosomes in *Imparfinis mirini*, reinforcing the great kariotypic variability of this family. In the pseudopimelodid studied, *Pseudopimelodus pulcher* and *Microglanis cottoides* presented $2n=54$, corroborating with $2n$ discribed for species from this family stydiyed until now. *Pseudopimelodus pulcher* with $20m+16sm+10st+8a$ and $FN=90$, presented 2-4 AgNORs in the short arm from a submetacentric chromosome pair (pair 12) and in a subtelocentric chromosome pair (pair 23). *Microglanis cottoides* with $30m+14sm+6st+4a$ and $FN=104$, showed just a pair of chromosome bearing the NOR (pair 24). All the NORs was coincidents with the FISH with the rDNA 18S probe and with the fluorochrome CMA_3 . One female of *Microglanis cottoides* presented $45m+21sm+9st+6a$, totalizing 81 chromosomes plus 2 small metacentric chromosomes extra and the NOR in this specimen was located in three subtelocentrics chromosomes (24), coincident with the rDNA 18S probe and CMA_3 , confirming the occurrence of natural triploidy with supernumerary chromosomes. The heterochromatin distribution in both species showed similar, where was possible see heterochromatin in pericentromeric and terminal regions of some chromosomes, however in *Pseudopimelodus pulcher* the heterochromatin was positive for CMA_3 and DAPI, wherefor rich in GC and AT, and in *Microglanis cottoides* was just DAPI positive, including the supernumerary chromosomes of the triploidy specimen. The formation of this triploidy specimen could be from a diploid female gamete, for as the female as the triploid presented two chromosomes of the first pair parcially heterochromatics, what wasn't seen in the males. This data are unprecedented for *P. pulcher* and are the first discription of natural triploidy and

supernumerary chromosomes in this family. These results contribute with more information's to Heptapteridae and Pseudopimelodidae revealing the importance of the chromosome banding for a better characterization of the karyotypic structure and of the processes involved in the evolution of these groups of fishes.

Key-words: Chromosome banding. Extra chromosome. Ostariophysi. Polyploid. Karyotype variability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados citogenéticos em espécies da família Heptapteridae 20

Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies da família Pseudopimelodidae 25

CAPÍTULO I: Considerações sobre a evolução cariotípica dos gêneros *Imparfinis* e *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae).

Tabela 1 - Dados citogenéticos em espécies de peixes do gênero *Imparfinis* e *Pimelodella* da família Heptapteridae 48

CAPÍTULO II: Tendências evolutivas na família Pseudopimelodidae (Siluriformes): triploidia natural e cromossomos supranumerários em *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891).

Tabela 1 - Dados citogenéticos em espécies da família Pseudopimelodidae 65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mapa do Brasil destacando os locais de coleta: (a) rio Jacutinga, ribeirão Três Bocas e rio Laranjinha pertencentes à bacia do Paranapanema, no estado de Paraná; (b) rio Forquetinha pertencente à bacia da Laguna dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul 29
- Figura 2-** Exemplos das espécies estudadas: (a) *Pimelodella meeki*; (b) *Imparfinis mirini*; (c) *Imparfinis schubarti*; (d) *Microglanis cottoides*; (e) *Pseudopimelodus pulcher*..... 30
- CAPÍTULO I: Considerações sobre a evolução cariotípica dos gêneros *Imparfinis* e *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae).....**
- Figura 1-** Cariograma das espécies da família Heptapteridae: *Imparfinis schubarti* (a), *Imparfinis mirini* (b) e *Pimelodella meeki* (c). Em destaque os pares da RON com coloração por nitrato de prata, CMA₃ e marcação com sonda de DNAr 18S das três espécies analisadas 49
- Figura 2-** Cariograma de *Imparfinis schubarti* (a), macho de *Imparfinis mirini* (b) e fêmea de *Imparfinis mirini* (c) com banda C. O primeiro par apresentando constrição secundária com bloco intercalar de heterocromatina e em (b) o par 19 de *Imparfinis mirini*, com heteromorfismo de heterocromatina..... 50
- Figura 3-** Metáfases somáticas com bandamento C de *Pimelodella meeki* (a, b, c): com Giemsa (a); DAPI (b) e CMA₃ (c). Setas indicam os pares da RON 51
- Figura 4-** Metáfases somáticas com bandamento C de *Imparfinis schubarti* (a, b, c) e *Imparfinis mirini*: macho (d, e, f) e fêmea (g, h, i); com Giemsa (a, d, g); DAPI (b, e, h) e CMA₃ (c, f, i). Cabeças de seta em d, e, f evidenciam o cromossomo 19 do macho de *Imparfinis mirini* com heteromorfismo da heterocromatina e as setas indicam os pares da RON 51
- Figura 5-** Células meióticas de *Imparfinis mirini* com bandamento C: (a-d) Giemsa, (e, g) DAPI; (f, h) CMA₃. Fase de paquíteno (a, e, f), diplóteno (b) e metáfase I (c, g, h) com 29 bivalentes e anáfase I (d). As cabeças de seta indicam, provavelmente, o cromossomo 19 e as setas em f, g, h indicam o par da RON.... 52

CAPÍTULO II: Tendências evolutivas na família Pseudopimelodidae (Siluriformes): triploidia natural e cromossomos supranumerários em *Microglanis cottoides* (Boulenger 1891).

- Figura 1-** Cariograma de *Pseudopimelodus pulcher* (a) e *Microglanis cottoides*: diploide (b); fêmea triploide (c). No Box em a, b e c, os pares da RON com coloração por nitrato de prata, CMA₃ e marcação com sonda de DNAr 18S das espécies analisadas 66
- Figura 2-** Metáfases somáticas de *Pseudopimelodus pulcher* com banda C: com Giemsa (a); DAPI (b); CMA₃ (c); e sobreposição DAPI/CMA₃ (d) Setas mostram o par cromossômico heterocromático com sítios AT na região pericentromérica e GC na região terminal do braço curto..... 67
- Figura 3-** Metáfases somáticas de *Microglanis cottoides* (triploide e diploides) com banda C sequencial: (a, d, g) Giemsa; (b, e, h) DAPI; (c, f, i) CMA₃. As cabeças de seta indicam os pares da RON. Setas indicam os dois cromossomos 1 com bloco de heterocromatina intersticial da fêmea diplóide (d) e da fêmea triploide (g) positivas para DAPI (e, h) e negativas para CMA₃ (f, i). O macho diploide (a, b, c) não possui bloco de heterocromatina no par 1 (setas). No box em (g, h) os dois cromossomos supranumerários com heterocromatina DAPI positiva 68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Considerações Gerais Sobre as Famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae	15
1.2 Citogenética da Família Heptapteridae	17
1.3 Citogenética da Família Pseudopimelodidae.....	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos:	26
3 LOCAIS DE ESTUDO E ESPÉCIES ESTUDADAS	27
3.1 Bacia do rio Paranapanema	21
3.2 Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos/RS.....	28
4 REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES SOBRE A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA DOS GÊNEROS <i>Imparfinis</i> e <i>Pimelodella</i> (SILURIFORMES HEPTAPTERIDAE)	36
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	39
Resultados.....	41
Discussão	43
Referências	52
CAPÍTULO II - TENDÊNCIAS EVOLUTIVAS NA FAMÍLIA PSEUDOPIMELODIDAE (SILURIFORMES): TRIPLOIDIA NATURAL E CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM <i>Microglanis cottoides</i> (BOULENGER 1891)	55
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	58
Resultados.....	59
Discussão	61
Referências	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS FAMÍLIAS HEPTAPTERIDAE E PSEUDOPIMELODIDAE

As famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae pertencentes à ordem Siluriformes são compostas por peixes de couro endêmicos dos Neotrópicos, possuindo uma ampla distribuição em cursos d'água da América Central e do Sul (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003; SHIBATTA, 2003a). Esse grupo de peixes é caracterizado pelo pequeno tamanho corpóreo, no entanto, a família Pseudopimelodidae possui alguns exemplares com porte médio, variando de 5 a 40 cm (SHIBATTA, 2003b) e para espécies de heptapterídeos os peixes apresentam no máximo 20 cm (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003).

Os heptapterídeos e pseudopimelodídeos de forma geral, são encontrados no fundo de pequenos corpos d'água ou escondidos na vegetação, vivem em águas calmas, possuindo estratégias para captura de presas. Esses animais não apresentam dimorfismo sexual aparente ou cuidado parental da prole, possuem fertilização externa e hábitos alimentares variados sendo constituídos, em sua maioria, por formas carnívoras ou onívoras (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003; SHIBATTA, 2003a). Em uma revisão recente da ordem Siluriformes, Ferraris (2007), propôs que a família Heptapteridae é composta por 24 gêneros e 189 espécies válidas e Pseudopimelodidae por 5 gêneros e 29 espécies válidas.

A classificação sistemática desse grupo sofreu alterações nos últimos anos. Anteriormente, Heptapteridae e Pseudopimelodidae pertenciam à família Pimelodidae, dividida em três subfamílias monofiléticas: Pimelodinae, Heptapterinae e Pseudopimelodinae, de acordo com Shibatta (2003b). Por apresentarem características morfológicas diferenciadas, segundo a classificação de Reis et al. (2003), grande parte dos pimelodídeos foi dividida em famílias distintas, como Heptapteridae descrita por Bockmann e Guazzelli (2003) e Pseudopimelodidae descrita por Shibatta (2003a). Portanto, as espécies da família Heptapteridae e Pseudopimelodidae são intimamente relacionadas e, conseqüentemente, são consideradas como grupos irmãos (SULLIVAN et al., 2006).

Essas relações taxonômicas fazem com que os peixes desse grupo sejam de grande interesse para estudos biológicos, sistemáticos e citogenéticos. Tais estudos na família Pseudopimelodidae ainda são escassos, portanto, sua biologia ainda é pouco conhecida. Elas se diferenciam de outros bagres, por apresentarem uma boca larga, olhos pequenos, margem orbital e barbilhões curtos. São peixes com uma coloração bonita e, algumas espécies do gênero *Pseudopimelodus* e *Cephalosilurus*, são conhecidas como bagre-sapo ou jaú-sapo

(SHIBATTA, 2003a). Dos poucos estudos existentes nessa família, alguns são relacionados com *Lophiosilurus alexandri* por ser uma espécie considerada ameaçada de extinção (ROSA; MENEZES, 1996 apud SHIBATTA, 2003a).

Os peixes da família Pseudopimelodidae são descritos para diferentes rios e bacias, como, o gênero *Batrachoglanis*, que possui aproximadamente 5 espécies e com representantes já coletados na bacia do rio Amazonas, bacias Maracaibo, Orinoco e Magdalena; o gênero *Cephalosilurus*, apresenta 4 espécies distribuídas no Orinoco, Amazônia e bacia do rio São Francisco; *Lophiosilurus*, com somente uma espécie descrita, *Lophiosilurus alexandri*, possui localização apenas na bacia do rio São Francisco; o gênero *Microglanis*, com 14 espécies e a maior distribuição, desde a vertente Ocidental dos Andes, no Peru, na bacia do rio La Plata e também na Argentina; *Pseudopimelodus*, com 5 espécies, é o segundo gênero com maior distribuição, nos rios da América do Sul e América Central (SHIBATTA, 2003a).

Na família Heptapteridae os gêneros *Imparfinis*, *Pimelodella* e *Rhamdia*, também constituem espécies amplamente distribuídas nos rios de água doce Neotropicais. O gênero *Imparfinis*, com 18 espécies válidas, é um dos gêneros filogeneticamente menos resolvidos na família (BOCKMANN, 1994 apud KANTEK et al., 2009). *Pimelodella* com cerca de 71 espécies distribuídas desde a bacia do rio La Plata, no sul da América do Sul, até o Panamá, na América Central é um dos gêneros mais diversificados da família (REIS et al., 2003). O gênero *Rhamdia* com 17 espécies descritas, também possui ampla distribuição nos rios de água doce Neotropical (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003) e consiste num complexo de espécies, sendo sua sistemática, portanto, bastante confusa.

Por possuírem pequeno tamanho corpóreo os peixes dessas duas famílias apresentam pouca importância para a pesca, esportiva ou comercial (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003). Entretanto, alguns gêneros da família Heptapteridae como *Pimelodella* e *Brachyrhamdia*, são utilizados em aquários e algumas espécies do gênero *Rhamdia* são empregadas em projetos de piscicultura (SALHI et al., 2004). Na família Pseudopimelodidae o gênero *Batrachoglanis* e *Microglanis* são apreciados por aquaristas, por serem considerados peixes sociáveis (SHIBATTA, 2003a).

1.2 CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE

Vários trabalhos citogenéticos vêm sendo realizados na família Heptapteridae, utilizando tanto técnicas clássicas quanto de citogenética molecular, procurando uma melhor caracterização da sua estrutura e evolução cariotípica. No entanto, esses dados continuam sendo escassos para esse grupo de peixes, pois apenas 33 de 189 espécies descritas foram estudadas cariotipicamente, até o momento. Dentro das 33 espécies, 17 apresentam-se como espécies sem classificação, sugerindo que podem se tratar de espécies novas (tabela 1).

Nesses estudos é possível verificar que os heptapterídeos possuem uma ampla variação cariotípica, podendo ser encontrado desde $2n=42$ em *Imparfinis hollandi* (MARGARIDO; MOREIRA-FILHO, 2008) a $2n=58$ em *Imparfinis schubarti* (KANTEK et al., 2009), havendo predomínio de $2n=58$ em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (MORAES et al., 2009; GARCIA et al., 2010).

Os cromossomos dos heptapterídeos apresentam, de modo geral, pequeno tamanho, o que contribui para a dificuldade na identificação de sua morfologia e localização de bandas, sendo esses, em sua maioria, cromossomos do tipo metacêntrico e submetacêntrico, corroborando para um número fundamental (NF) bastante elevado, variando de 84 a 116 (Tabela 1).

Estudos demonstram a ocorrência de polimorfismos numéricos e estruturais nesse grupo de peixes, como cromossomos supranumerários ou Bs, bastante relatados em *Rhamdia quelen* (STIVARI et al., 2004; MORAES et al., 2009; GARCIA et al., 2010) e, mais recentemente, em *Pimelodella* sp (GARCIA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010).

A presença de Bs em *Rhamdia* é uma característica do grupo, sendo encontrados em 72,98% das diferentes populações e/ou espécies analisadas, em diferentes tipos e tamanhos, mostrando variação intra e interindividual segundo Moraes et al. (2009). Esses cromossomos foram observados totalmente eucromáticos em *Rhamdia quelen*, coletada na serra da Bodoquena/MS (MORAES et al., 2007) e parcialmente ou totalmente heterocromáticos em outras populações desta espécie (MORAES et al., 2009; GARCIA et al., 2010). Em *Pimelodella* sp analisada por Garcia; Almeida-Toledo (2010) os cromossomos Bs mostraram-se eucromáticos e apresentaram sinais após a coloração com cromomicina A_3 (CMA_3) e hibridação com sonda de DNAr 18S, em regiões não detectadas pela prata, sugerindo, segundo as autoras, uma possível relação de homologia parcial desses cromossomos com sítios de DNAr 18S e uma ausência de atividade destas regiões.

Outros tipos de polimorfismos também já foram encontrados, como a ocorrência de triploidia natural relatada em *Rhamdia quelen* (GARCIA et al., 2003, TSUDA et al., 2010; SILVA et al., 2011), assim como sistemas de cromossomos sexuais, que já foram descritos em *Pimelodella* sp (DIAS; FORESTI, 1993) e *Pimelodella boschmai* (GARCIA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010).

Os heptapterídeos, no geral, apresentam pouca quantidade de heterocromatina (KANTEK et al., 2009), geralmente distribuída em regiões pericentroméricas e terminais e as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) normalmente apresentam padrão simples, ou seja, apenas um par cromossômico nucleolar (Tabela 1). Nos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdia* a RON foi observada em região terminal do braço curto de cromossomos submetacêntricos e em algumas espécies de *Imparfinis* e *Cetopsorhamdia* foi evidenciada RON intersticial no braço longo de um par de cromossomos metacêntricos, como relacionado na tabela 1. Heteromorfismo de tamanho da RON entre os cromossomos homólogas foi observado em *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA et al., 2003a), *Pimelodella meeki* (VIDOTTO et al., 2004) e *Imparfinis schubarti* (STOLF et al., 2004).

As RONs após coloração com cromomicina A₃, tem sido positivas para este fluorocromo em *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA et al., 2003a), *Imparfinis schubarti* (STOLF et al., 2004) *Pimelodella meeki* (VIDOTTO et al., 2004) e espécies do gênero *Rhamdia* (FENOCCHIO et al., 2003b; GARCIA et al., 2003, 2010) sendo, portanto, regiões ricas em bases GC. A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), com sonda de DNAr 18S, tem confirmado o número e a exata localização das RONs e na família Heptapteridae. A localização desses genes ribossômicos tem sido conservada, onde a maioria das espécies apresentam RONs simples como *Imparfinis schubarti* (STOLF et al., 2004) e *Pimelodella meeki* (VIDOTTO et al., 2004) sendo coincidentes com a coloração por nitrato de prata e, em *Rhamdia quelen* de acordo com Garcia et al. (2010) o par cromossômico da RON é conservado também em diferentes populações.

Um recente trabalho utilizando sonda de DNAr 5S, Martinez et al. (2011) observaram variação na localização desse sítio nos cromossomos de *Rhamdia quelen* de diferentes populações de duas bacias hidrográficas (Paraná e Araguaia), sugerindo que tal variação estaria relacionada a um provável complexo de espécies. Silva et al. (2011) verificaram dois cromossomos com sítios de DNAr 5S em indivíduos diploides e três para indivíduos triploides de *R. quelen* produzidos em cativeiro.

Em hibridação com sonda telomérica nos cromossomos de *Imparfinis hollandi*, Margarido e Moreira-Filho (2008) observaram quatro pares de cromossomos

assimétricos (os maiores do complemento), sem marcação com esta sonda, sendo que os autores propuseram uma possível inativação do telômero, provavelmente devido à ocorrência de fusões cromossômicas na evolução cariotípica desta espécie, que apresenta o menor número de cromossomos ($2n=42$) entre os heptapterídeos.

A tabela abaixo relaciona os dados cariótipos de espécies de heptapterídeos analisados até o momento, atualizados a partir de Moraes (2007).

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies da família Heptapteridae. m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st = subtelo-cêntrico; a = acrocêntrico; p = braço curto; q = braço longo; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; BC=banda C; RON=região organizadora de nucléolo; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	RON	BC	Referência
<i>Cetopsorhamdia</i>							
<i>C. iheringi</i>	R. Capivara/SP	58	28m+24sm+6st	110	1 par sm, q, intersticial	Centroméricas e teloméricas	Vissotto et al. (1999b)
<i>C. iheringi</i>	R.Pardo/SP	58	28m+24sm+6st	110	1 par sm, q, intersticial	Centroméricas e teloméricas	Vissotto et al. (1999b)
<i>C. iheringi</i>	R. São Francisco/MG	58	22m+16sm+10st+10a	-	1 par sm, q, intersticial	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>C. iheringi</i>	R. das Marrecas/PR	58	22m+16sm+10st+10a	-	1 par sm, q, intersticial	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>Cetopsorhamdia</i> sp.	Rb. Canta Galo/SP	58	22m+16sm+10st+10a	-	1 par m, bloco intersticial	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>Heptapterus</i>							
<i>H. longicauda</i>	Rb. Quinta/SP	52	22m+26sm+4st	106	1 par m, p e 1 par st, p,terminal	Centromérica, intersticial e telomérica	Vissotto et al. (1999b)
<i>Imparfinis</i>							
<i>I. minutus</i>	Cunha/SP	58	42m+12sm+4st	116	1 par m, q, intersticial	Centroméricas e pericentroméricas	Garcia e Almeida-Toledo (2006)
<i>I. mirini</i>	R. Jacutinga/SP, R. Quinta/SP	58	22m+34sm	-	1 par m, q intersticial	Centroméricas e pericentroméricas	Vissotto et al. (1997)
<i>I. mirini</i>	Pilar do Sul/SP	58	42m+12sm+4st	116	1 par m, q, intersticial	Centroméricas e pericentroméricas	Garcia e Almeida-Toledo (2006)
<i>Imparfinis</i> cf. <i>piperatus</i>	R. Juquiá /SP	56	24m+12sm+20st	-	1 par st, q, intersticial	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>Imparfinis</i> cf. <i>pipetarus</i>	R. Juquiá/SP	56	22m+26sm+4st+4a	102	1 par a, q, intersticial	Pericentroméricas e teloméricas	Vissotto et al. (2001)
<i>I. piperatus</i>	R. Araras/SP	58	32m+26sm	116	1 par m, q, intersticial	Pericentroméricas e teloméricas	Vissotto et al. (2001)
<i>I. piperatus</i>	R. Grande/SP	58	26m+22sm+8st+2a	106	1 par m, q, intersticial	Pericentroméricas e teloméricas	Vissotto et al. (2001)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	Rb.Marrequinhas/ PR	58	28m+28sm+2st	116	1 par m, q, intersticial	Escassa	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	Rb Três Bocas/ PR	58	28m+28sm+2st	116	1 par m, q, intersticial	Escassa	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	R. Água da Floresta/PR	58	28m+28sm+2st	116	1 par m, q, intersticial	Escassa	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	R.Vinicius/PR	58	28m+28sm+2st	116	1 par m, q, intersticial	Escassa	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	R. Taquari/PR	58	28m+28sm+2st	116	1 par m, q, intersticial	Escassa	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	R.Jataizinho/PR	58	28m+28sm+2st	116	1 par m, q, intersticial	Escassa	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	Rb. Canta Galo/SP	58	22m+18sm+10st+8a	-	1 par m, q, intersticial	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>Imparfinis</i> aff. <i>schubarti</i>	Rb. Três Bocas/PR	58	22m+18sm+10st+8a	-	1 par m, q, intersticial	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>Imparfinis</i> cf. <i>schubarti</i>	R. Paraná	58	24m + 22sm + 12st	-	1 par sm, q, intersticial	pericentromérica	Borba et al. (2011)
<i>I. hollandi</i>	Salto Osório, R. Iguaçu/PR	42	22m+10sm+10st	-	Par 18st terminal	Par 8m e 18st terminal e 12sm intersticial	Margarido e Moreira-Filho (2008)
<i>I. schubarti</i>	Drenagem Piumhi/MG	58	18m+34sm+6st	116	Constricção 2 ^{ária} , q, intersticial	Baixa quantidade, q intersticial no par da constricção	Kantek et al. (2009)
<i>Pimelodella</i>							
<i>P. avanhandavae</i>	R. Araquá/SP	46	20m+20sm+6st	86	1 par st, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999b)
<i>P. avanhandavae</i>	R.Capivara/SP	46	20m+20sm+6st	86	1 par st, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999b)
<i>Pimelodella</i> aff. <i>avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	30m+22sm	104	1 par m, p, terminal	Centromérica e telomérica	Swarça et al. (2003a)

<i>P. boschmai</i>	Mogi-Guaçu Araras/SP	46	38m+8sm XY/XX	92	Par 21, p terminal	Centromérica e telomérica	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>P. gracialis</i>	Paraná Mariópolis/SP	46	34m+12sm	92	Par 18, p terminal	Intersticial	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	R. Limoeiro/PR	46	30m+12sm+4st	92	1 par sm, p, terminal	-	Vidotto et al. (2004)
<i>P. meeki</i>	R. Couro de Boi/PR	46	30m+12sm+4st	92	1 par sm, p, terminal	-	Vidotto et al. (2004)
<i>P. meeki</i>	R. Gabriel da Cunha/PR	46	30m+12sm+4st	92	1 par sm, p, terminal	-	Vidotto et al. (2004)
<i>P. meeki</i>	São Miguel Arcanjo/SP	46	28m+12sm+6st	92	1 par sm, p, terminal	Pericentromérica	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	Pilar doSul/SP	46	28m+12sm+6st	92	1 par sm, p, terminal	Pericentromérica	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	R. Paraná	46	26m +16sm +4st	-	1 par sm, p, terminal	Pericentromérica	Borba et al. (2011)
<i>P. lateristriga</i>	Paraíba do Sul Angra/RJ	58	36m+22sm	116	par 20, p terminal	Pericentroméricas e teloméricas	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella</i> sp.	R. Mogi-Guaçu/SP	46	40m-sm+6st-a XX/XY	-	1 par m-sm, p, terminal	-	Dias e Foresti (1993)
<i>Pimelodella</i> sp.1	R. Paraná/PR	46	20m+20sm+6a	92	1 par sm, p, terminal, BC+	Centroméricas e teloméricas	Vasconcelos e Martins- Santos (2000)
<i>Pimelodella</i> sp.2	R. Paraná/PR	52	22m+22sm+8st	104	1 par sm, p, terminal, BC+	Centroméricas e teloméricas	Vasconcelos e Martins- Santos (2000)
<i>Pimelodella</i> sp.	Pardo Cardoso/SP	46	34m+12sm	92	par 21, p, terminal	Pericentromérica	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Phenacorhamdia</i>							
<i>P. tenebrosa</i>	R. Paraná	58	15m+11sm+3st	-	1 par sm, q, terminal	Pericentromérica	Bosrba et al. (2011)
<i>Rhamdella</i>							
<i>R. microcephala</i>	R.Machado/MG	56	18m+30sm+8st-a	84	1 par sm, q, intersticial, BC+	Pericentromérica	Fonseca et al. (2003)
<i>Rhamdella</i> sp.	Itaeté/BA	56	26m-sm+30st-a	82	-	-	Souza et al. (1994)
<i>Rhamdia</i>							
<i>R. branneri</i> .	Us. Salto Segredo - R.Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, p e 1 par st, q, terminal	Teloméricas, intersticial q, pares sm e st	Abucarma e Martins- Santos (2001)
<i>R. hilarii</i>	R. Onça/SP	58	36m+18sm+8a	116	-	-	Toledo e Ferrari (1976)
<i>R. hilarii</i>	Monjolinho/SP	58	-	>100	1 par, p terminal, BC+	Escassa	Fenocchio e Bertollo (1990)
<i>Rhamdia</i> cf. <i>hilarii</i>	Rv. Jurumirim/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, p,terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999a)
<i>Rhamdia</i> cf. <i>hilarii</i>	Rb. Quinta/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999a)
<i>Rhamdia</i> cf. <i>hilarii</i>	Rb. Jacutinga/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999a)
<i>Rhamdia</i> cf. <i>hilarii</i>	Rb. Hortelã/ SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999a)
<i>Rhamdia</i> cf. <i>hilarii</i>	R. Araquá/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999a)
<i>Rhamdia</i> cf. <i>hilarii</i>	R. Pardo/SP	58	30m+18sm+10st	106	1 par sm, p, terminal	Centroméricas	Vissotto et al. (1999a)
<i>R. hilarii</i>	Rv. Lobo/SP	58	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	Restringia-se a RON	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	Rv. "29"/SP	58	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	Restringia-se a RON	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	~108	1 par st, p,	Restringia-se a	Fenocchio et

<i>R. hilarii</i>	R. São Francisco/MG	58	-	~108	terminal, BC+	RON	al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	Restringia-se a RON	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-guaçu/SP	58	58m/sm	116	1 par m-sm, p, terminal, BC+	Teloméricas	Maistro et al. (2002)
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	108	1 par a, p, terminal	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>R. laticauda</i>	EUA	58	-	100±4	-	-	Le Grande (1981)
<i>R. quelen</i>	R. Oeste – Cascavel/PR	58	36m+10sm+12st	116	Par 27st, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Sangão – Cascavel/PR	58	32m+8sm+12st+6a	110	Par 26, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Angra dos Reis/RJ	58	40m+10sm+8st	116	Par 24, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	R. São José /RJ	58	36m+14sm+8st	116	Par 27, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Paraíba do Sul/RJ	58	36m+14sm+8st	116	Par 27, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Araras/SP	58	40m+10sm+8st	116	Par 24, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Capivra-Botucatu/SP	58	44m+12sm+2st	116	Par 26, p terminal	Intersticial centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Colina/SP	58	36m+10sm+12st	116	Par 27, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Guapiara/SP	58	36m+10sm+12st	116	Par 27, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Iguapé/SP	58	36m+10sm+12st	116	Par 27, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Passa Cinco – Ipeúna/SP	58	34m+16sm+8st	116	Par 24, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Fortuna – Mariápolis/SP	58	40m+10sm+8st	116	Par 24, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Piquete/SP	58	40m+10sm+8st	116	Par 24, p terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Sto. Antônio do Pinhal/SP	58	30m+14sm+12st+2a	114	Par 27, p, terminal	Intersticial, centromérica e terminal	Garcia et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Paraná	58	32m+18sm+ 8st	-	1 par sm, q terminal	Pericentomérica	Borba et al. (2011)
<i>R. quelen</i>	Lg. dos Quadros/RS	58	52m/sm/st+6a	110	1 par a, p, terminal	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>R. quelen</i>	R.Guaíba/RS	58	52m/sm/st+6a	110	1 par a, p, terminal	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>R. quelen</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	Restringia-se a RON	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. quelen</i>	R.Iguaçu/SC	58	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	Restringia-se a RON	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. quelen</i>	R.Paraná/Ar	58	-	~108	1 par st, p, terminal, BC+	Restringia-se a RON	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	108	1 par a, p, terminal	-	Fenocchio et al. (2003a)
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	108	1 par st, p, terminal,	Teloméricas	Fenocchio et al. (2003b)
<i>R. quelen</i>	R.Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	116	1 par st, p, terminal, BC+	Teloméricas	Swarça et al. (2003b)

<i>R. quelen</i>	R. Taquarussu/PR	58	26m+20sm+6st+6a	110	1 par st, p, terminal	Teloméricas e centroméricas	Stivari e Martins-Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	Rb. Maringá/PR	58	26m+22sm+6st+4a/ 26m+24sm+8st	110	1 par sm, p, terminal	Teloméricas e centroméricas	Stivari e Martins-Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	R. Uberabinha/MG	58	26m+20sm+8st+4a	-	1 par m, p, terminal	-	Guilherme (2005)
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	58	30m+14sm+10st+4a	112	1 par sm, p, terminal	Teloméricas e centroméricas	Tsuda et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	3n=87	45m+21sm+15st+6a	168	1 par sm, p, terminal	Teloméricas e centroméricas	Tsuda et al. (2010)
<i>R. quelen</i>	Cg. Caetano/MG	58	-	-	1 par m, p, terminal	-	Silva e Morelli (2005)
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	-	-	1 par sm, p, terminal	Teloméricas	Coles et al. (2006)
<i>R. quelen</i>	Serra da Bodoquena/MS	58	36m+16sm+6st	116	Par 20, p terminal	Pericentroméricas e teloméricas	Moraes et al. (2007)
<i>R. quelen</i>	Água dos Patos/SP	58	36m+16sm+6st	116	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes et al. (2009)
<i>R. quelen</i>	Água das Pedras/PR	58	36m+16sm+6st	116	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes et al. (2009)
<i>R. quelen</i>	Taquari/PR	58	36m+16sm+6st	116	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes et al. (2009)
<i>R. quelen</i>	FUNPIVI/SC	58	36m+16sm+6st	116	-	Terminais e Pericentroméricas	Moraes et al. (2009)
<i>R. quelen</i>	Mogi-Guaçu	58	11m+18sm+12st+6a	-	1 par a, p terminal	Terminais e pericentroméricas	Martinez et al. (2011)
<i>R. quelen</i>	Araguaia	58	18m+18sm+14st+8a	-	1 par a, p terminal	Terminais e pericentroméricas	Martinez et al. (2011)
<i>R. quelen</i>	Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	58	38m/sm+14st+6a	110	1 par st, p terminal	Telomérica e bitelomérica	Silva et al. (2011)
<i>R. quelen</i>	Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	3n=87	57m/sm+21st+9a	-	1 par st, p terminal	Telomérica e bitelomérica	Silva et al. (2011)
<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>Rhamdia sp.</i>	EUA	58	-	100±4	-	-	Le Grande (1981)
<i>Rhamdia sp.</i>	Us. Salto Segredo–R. Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4a	112	1 par a, p, terminal	Teloméricas e centroméricas	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>Rhamdia sp.</i>	Rb. Grande	58	46m/sm+12st/a	-	1 par st, p, terminal	Centroméricas e teloméricas	Garcia et al. (2003)
<i>Rhamdia sp.</i>	Rb. Grande	3n=87	69m/sm+18st/a	-	1 par st, p, 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, p e 1 par st, q, terminal	Teloméricas e centroméricas	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>Taunaya</i>							
<i>T. bifasciata</i>	R. Paraná	58	20m+18sm+ 20st	-	1 par sm, q intersticial	Pericentromérica	Borba et al. (2011)

1.3 CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA PSEUDOPIMELODIDAE

Os estudos citogenéticos na família Pseudopimelodidae são escassos, sendo que a descrição cariotípica foi realizada, até o momento, em apenas quatro gêneros e seis espécies (Tabela 2). Esses estudos revelam que todos os exemplares analisados, apresentaram $2n= 54$ mostrando, por enquanto, uma evolução conservada em relação ao número diplóide dessa família. Os cromossomos em sua maioria são do tipo submetacêntricos, mas apresentam também acrocêntricos e metacêntricos (MARTINEZ et al., 2004, 2008; SWARÇA et al., 2007).

Os dados citogenéticos demonstram que, neste grupo de peixes, as RONS mostram tanto um padrão simples, como em *Cephalosilurus apurensis* e *Pseudopimelodus mangurus* quanto múltiplo como em *Microglanis* aff. *cottoides* e *Pseudopimelodus bufonius* (tabela 2).

Análises com fluorocromos cromomicina A₃ (GC específico) e DAPI (AT específico), foram realizadas apenas em *Pseudopimelodus mangurus* (MARTINEZ et al., 2004) e *Lophosilurus alexandri* (MARQUES et al., 2008), que apresentaram sinais positivos para CMA₃ em região terminal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos, correspondentes às Ag-RONS. Nesta última espécie, a marcação pela sonda de DNAr 18S foi coincidente com a Ag-RON, e o sítio de DNAr 5S foi evidenciado no braço longo de um outro par de cromossomos submetacêntricos, mostrando portanto que esses genes não apresentam sintenia nessa espécie (MARQUES et al., 2008), sendo estes os únicos dados de localização de genes ribossômicos nessa família.

Os peixes dessa família apresentam pouca heterocromatina, geralmente localizada em algumas regiões pericentroméricas e terminais dos cromossomos e em apenas alguns pares, sendo que em *Pseudopimelodus mangurus* (MARTINEZ et al., 2004) e *Microglanis cottoides* (VISSOTO et al., 1999b) a região organizadora de nucléolo é banda C positiva.

A tabela abaixo relaciona os dados cariótipos de espécies de pseudopimelodídeos observados até o momento.

Tabela 2- Dados citogenéticos em espécies da Família Pseudopimelodidae. m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; a=acrocêntrico; p=braço curto; q=braço longo; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; R= rio; Rb= ribeirão.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	RON	BC	Referência
<i>Cephalosilurus</i>							
<i>C. apurensis</i>	R. Orinoco, Caicara Del Orinoco, Bolívar, Venezuela	54	6m+28sm+14st+6a	-	Par 19 st p terminal	Terminal	Martinez et al. (2008)
<i>Lophiosilurus</i>							
<i>L. alexandri</i>	R. São Francisco	54	16m+18sm+10st+10a		1 par sm, p, terminal	Terminais e pericentroméricas	Marques et al. (2008)
<i>Microglanis</i>							
<i>M. cottoides</i>	R. Araquá e R. Capivara	54	22m+20sm=12st	96	Par 1m, q, terminal	Terminais e centroméricas	Vissotto et al. (1999b)
<i>Microglanis aff. cottoides</i>	Rb Cavalo, Jaraguá do Sul/SC	54	10m+32sm+10st+2a	-	Par 23st, p e par 22st, q, terminal	Terminais e pericentroméricas	Martinez et al. (2008)
<i>Pseudopimelodus</i>							
<i>P. bufonius</i>	Amazônia	54	12m+30sm+12st	-	Pares 9, 10 e 11 sm, p, terminal	Terminais e pericentroméricas	Martinez et al. (2008)
<i>P. mangurus</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	54	6m+26sm+12st+10a	-	Par 19st, p, terminal	Terminais e pericentroméricas	Martinez et al. (2004)
<i>P. bufonius</i>	R. Capim/PR	54	18m+22sm+6st+8a	100	1 par m,p terminal	Terminais e pericentroméricas	Souza et al. (2003)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente espécies de peixes das famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae de diferentes bacias hidrográficas e comparar os resultados obtidos com outras espécies e/ou populações já estudadas, inferindo sobre as tendências evolutivas desses grupos de peixes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o número diplóide, fórmula cariotípica, localização das AgRONS e distribuição da heterocromatina de diferentes espécies das famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae.
- Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases AT e GC, utilizando os fluorocromos base-específicos 4,5-diamino-phenylindole (DAPI) e cromomicina A₃ (CMA₃), respectivamente.
- Localizar sítios de DNAr 18S nos cromossomos das diferentes espécies das famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae, por meio da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).
- Comparar os dados obtidos com os da literatura, procurando compreender melhor os processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica nas famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae.

3 LOCAIS DE ESTUDO E ESPÉCIES ESTUDADAS

Os exemplares analisados das famílias Heptapteridae e Pseudopimelodidae foram coletados em diferentes locais pertencentes à bacia do rio Paranapanema/PR e ao Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos/RS (Figura 1).

O rio Paranapanema e seus afluentes abrangem 55.530 km² no estado do Paraná, formando uma fronteira com o estado de São Paulo numa extensão de 392,9 quilômetros e sua nascente se localiza em Capão Bonito, na Serra de Paranapiacaba (MAACK, 2002). A bacia do Paranapanema tem como principal tributário o rio Tibagi localizado ao norte, o conjunto faz parte da grande bacia do rio Paraná, um dos formadores da bacia do rio Prata (DE FRANÇA, 2002). O rio Paranapanema é bastante utilizado para o abastecimento de energia, possuindo cerca de dez usinas hidrelétricas em operação e, devido à presença dessas usinas ao longo de seu curso, o rio tornou-se uma sucessão de reservatórios justapostos, que são classificados em dois tipos básicos: reservatórios de acumulação e reservatórios fio d'água. Essa classificação segue segundo suas características e formas de operação, influenciado diretamente pela qualidade da água e a distribuição da vida aquática, inclusive a fauna de peixes (DUKE ENERGY, 2003).

O Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos abrange como principais massas de água a laguna dos Patos com 9.280 km², a laguna Mirim com 3.520 km² e a lagoa Mangueira com 802 km² (Schwarzbold e Schaeffer, 1984 apud Malabarba, 1989), destacando-se como principais contribuintes os rios Jacuí, Camaquã e Jaguarão. A maior parte desta área situa-se no estado do Rio Grande do Sul, estando somente parte da margem oeste da laguna Mirim e dois de seus maiores afluentes em território uruguaio. Todo este complexo de rios, lagoas e lagunas é interligado, possuindo uma única saída para o mar através da laguna dos Patos, na cidade de Rio Grande. Este sistema limita-se ao Norte e a Oeste com as cabeceiras dos afluentes do rio Uruguai e a sudoeste com as cabeceiras do rio Negro, ambos desaguando no rio da Prata (Malabarba, 1989).

A Laguna dos Patos constitui-se em um dos maiores reservatórios de água doce do planeta, quase um terço de toda área da planície costeira do estado do Rio Grande do Sul (TOLDO et al., 2006). A sua grande dimensão e conexão com o mar, fazem da Laguna um recurso hídrico considerável que, além de ser um lugar de refúgio e reprodução de diversas espécies de animais, tem sido utilizado para navegação, irrigação, turismo, lazer e outras atividades (CARVALHO et al., 2004).

Abaixo estão relacionadas às espécies estudadas e os locais onde foram coletadas:

3.1 BACIA DO RIO PARANAPANEMA

- **Ribeirão Jacutinga** (Figura 1a)- localizado na cidade de Ibiporã/PR na coordenada 23°13'25.3"S e 50°58'47.37"W:
Pimelodella meeki (Figura 2a) = 6 indivíduos (3 fêmeas e 3 com sexo não identificado).
Imparfinis mirini (Figura 2b) = 5 indivíduos (2 fêmeas, 2 machos e 1 com sexo não identificado);
- **Ribeirão Três Bocas** (Figura 1a)- localizado na cidade de Londrina/PR na coordenada 23°23'06.6"S e 51°04'35.8"W:
Imparfinis schubarti (Figura 2c) = 6 indivíduos (2 machos e 4 fêmeas).
- **Rio Laranjinha** (Figura 1a)- localizado na cidade de Ribeirão do Pinhal/PR na coordenada 23°24'9.11"S e 50°27'16.4"W:
Imparfinis schubarti= 6 exemplares (3 machos e 3 fêmeas);
Pseudopimelodus pulcher (Figura 2d) = 5 indivíduos (2 machos, 2 fêmeas e 1 sexo não identificado).

3.2 SISTEMA HIDROGRÁFICO DA LAGUNA DOS PATOS/RS

- **Rio Forquetinha** (Figura 1b)- localizado na cidade de Forquetinha/RS, na coordenada 29°24'21.8"S e 52°03'18.3"W:
Microglanis cottoides (Figura 2e) = 6 indivíduos (4 machos e 2 fêmeas).

Figura 1- Mapa do Brasil destacando os locais de coleta: (a) rio Jacutinga, ribeirão Três Bocas e rio Laranjinha pertencentes à bacia do Paranapanema, no estado de Paraná; (b) rio Forquetinha pertencente ao Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul.

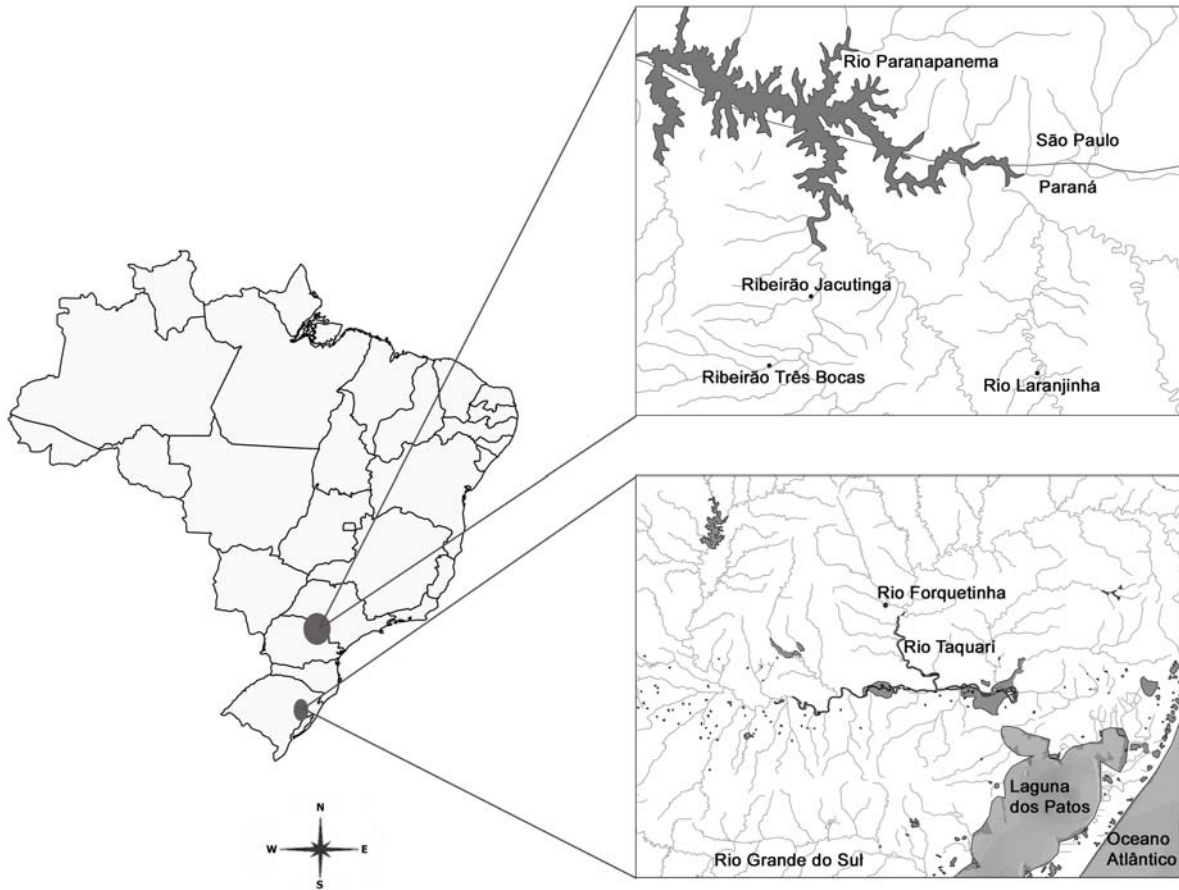
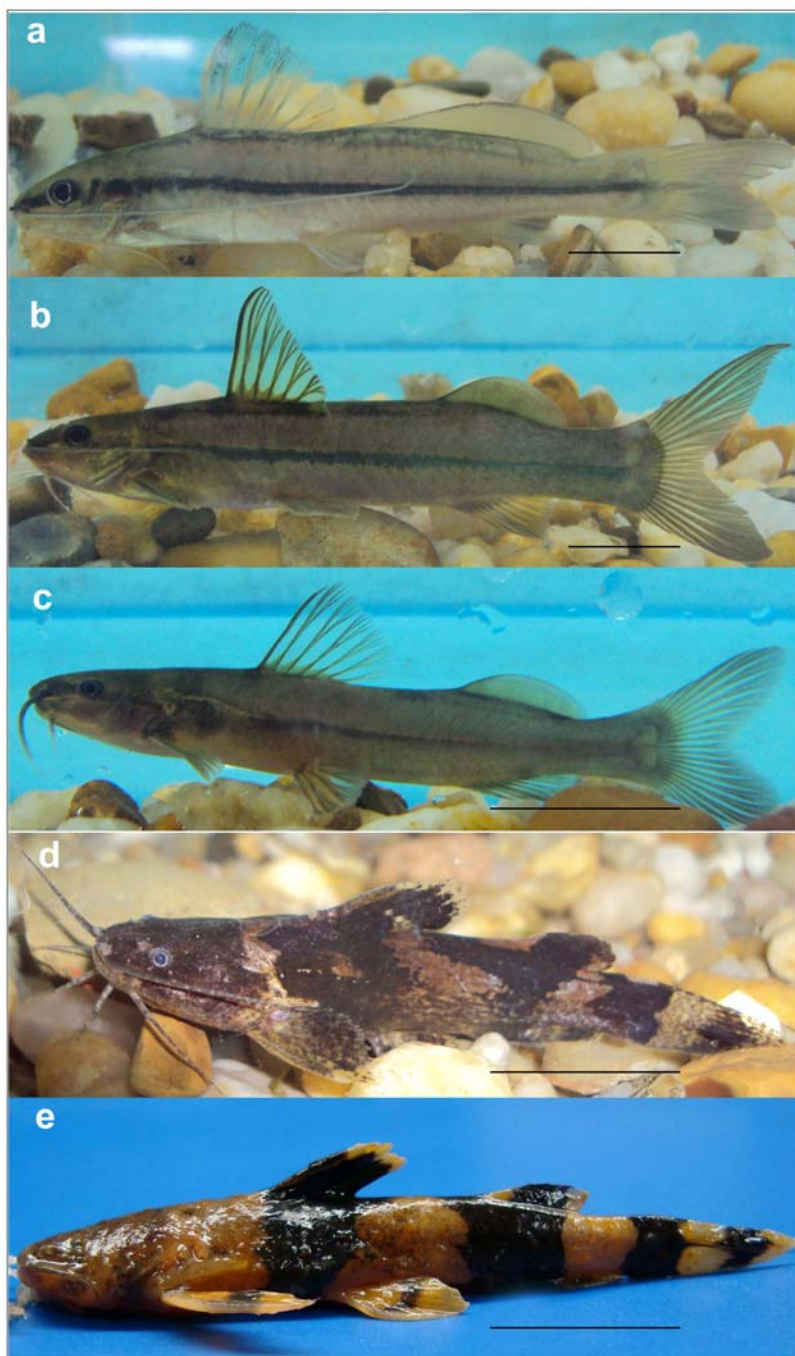


Figura 2- Exemplos das espécies estudadas: (a) *Pimelodella meeki*; (b) *Imparfinis mirini*; (c) *Imparfinis schubarti*; (d) *Microglanis cottoides*; (e) *Pseudopimelodus pulcher*; barra= 1 cm.



REFERÊNCIAS

- ABUCARMA, M., MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçú Basin. **Cytologia**, 66: 299-306, 2001.
- BOCKMANN, F. A., GUAZZELLI, G. M. Family Heptapteridae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S. O., FERRARIS JR., C. J. **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipurcs, Porto Alegre, p. 406-431, 2003.
- BORBA, R. S.; SILVA, E. L.; PACHECO, A. C.S.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; ALVES, A. L. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish Family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, DOI 10.1007/s11160-011-9245-3, 2011.
- CARVALHO, L.; LACERDA, C.; GRIEP, G. **Mapa de sensibilidade ambiental da Lagoa dos Patos e região costeira oceânica do Rio Grande do Sul, Brasil: histórico e perspectivas**. In: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Copyright: Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP, 2004.
- COLES, F.C., SÁNCHEZ, S. E JORGE, L.C. 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, 1., São Carlos. **Anais...** São Carlos: SBG. p.181, 2006.
- DE FRANÇA, V. O rio Tibagi no contexto hidrogeográfico Paranaense. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (editores). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: EDUEL, 2002, Cap. 3, p. 46-47.
- DIAS, A. L., FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Rev. Brasil. Genet.**, 16,3,:585-600, 1993..
- DUKE ENERGY INTERNACIONAL. **Peixes do rio Paranapanema**. Copyright da edição: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema. São Paulo: Ed. Horizonte Geográfico, 2003, 112p.
- FENOCCHIO, A. S., BERTOLLO, L. A. C. Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**, 81: 193-198, 1990.
- FENOCCHIO, A. S., BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S., CAMACHO, J. P. M. B Chromosomes in two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biologica (Kraków)**, 48: 3-4, 2000.
- FENOCCHIO, A. S., BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S., DIAS, A. L., SWARÇA, A. C. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). **Cytologia**, 68(4): 363-368, 2003a.
- FENOCCHIO, A.S., SWARÇA, A.C., CESTARI, M.M., DIAS, A.L. Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguaçú River (Brazil). **Folia Biologica (Kraków)**, 51: 3-4, 2003b.

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

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

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

GARCIA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 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, 2006.

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

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

GUILHERME, L. C. **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.** Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 85p. 2005.

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

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná.** Imprensa Oficial do Paraná, Ed. 3, p. 320, Curitiba, 2002.

MAISTRO, E. L., OLIVEIRA, C. E FORESTI, F. 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, 2002.

MALABARBA, L. R. **Comunicação Museu Ciências da PUCRS.** Série Zoologia, 2(8):107-179, 1989.

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

- MARQUES, M. B. A.; MOREIRA-FILHO, O.; GARCIA, C.; MARGARIDO, V. P. Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco river basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31(1): 215-221, 2008.
- MARTINEZ, E. R. M., NIRCHIO, M., GRANADO, A., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31(3): 692-696, 2008.
- MARTINEZ, E. R. M., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Cytogenetic analyses of *Pseudopimelodus mangurus* (Teleostei: Siluriformes: Pseudopimelodidae). **Cytologia**, 69(4): 419-424, 2004.
- MARTINEZ, J. F., LUI, R. L., BLANCO, D. R., TRALDI, J. B., SILVA, L. F., VENERE, P. C., SOUZA, I. L., MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. **Caryologia**, Vol. 64, no. 1: 121-128, 2011.
- MORAES, V. P. O. **Análise citogenética comparativa de diferentes Populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina. 92p. 2007.
- MORAES, V. P. O., CARNEIRO, J. S., DIAS, A. L. B. Chromosomes in Four Different Populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): A Comparative Study of Frequency and Distribution. **Folia Biologia**, 57(3-4): 165-169, 2009.
- MORAES, V. P. O., CEREALI S. S., FROEHLICH, O., DIAS, A. L. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, 6(3): 627-633, 2007.
- REIS, R. E.; KULLANDER, FERRARIS JR., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 742 p. 2003.
- SALHI, M., BESSONART, M., CHEDIAK, G., BELLAGAMBA, M., CARNEVIA, D. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. **Aquaculture**. 231: 435-444, 2004.
- SHIBATTA, O. A. Family Pseudopimelodidae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S. O., FERRARIS JR., C. J. **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipurcs, Porto Alegre, p. 406-431, 2003a.
- SHIBATTA, O. A. Phylogeny and Classification of 'Pimelodidae'. In: ARRATI, G., KAPOOR, B. G., CHARDON, M., DIOGO, R. **Catfishes**. Science Publishes, Enfield/USA, p.386-399, 2003b.
- SILVA, M., MATOSO, D. A., LUDWIG, L. A. M., GOMES, E., ALMEIDA, M. C., VICARI, M. R., ARTONI, R. F. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. **Environment Biology Fish**, 91: 361-366, 2011.

SILVA, S. V. S., MORELLI, S. Análise cariotípica em *Rhamdia quelen* do córrego do Caetano da região de Uberlândia – MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG. p. 397, 2005.

SOUZA, I. L., MOREIRA-FILHO, O., CASTRO, R. M. C. Informações citogenéticas preliminares de uma nova espécie de Pimelodidae cego de cavernas (Itaetê,BA). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, p.18, 1994.

SOUZA, L., GIULIANO-CAETANO, L., SHIBATTA, O. Citogenética de *Pseudopimelodus bufonius* (Siluriformes, Pseudopimelodidae). In: 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2003. **CD-Rom**.

species (Pimelodidae, Siluriformes). **Genética**, 119:87-92, 2003b.

STIVARI, M. K., MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). **Cytologia**, 69(1): 25-34, 2004.

STOLF, R., SWARÇA, A. C., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A. L. Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. **Caryologia**, 57 (4): 348-352, 2004.

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

SWARÇA, A. C., FENOCCHIO, A. S., DIAS, A. L. An update Cytogenetic Review for Species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a Cytotaxonomical Classification. **Caryologia**. 60(4):338-348, 2007.

SWARÇA, A. C., FENOCCHIO, A. S., CESTARI, M. M., DIAS, A. L. Analysis of the heterocromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish

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

TOLDO E. E. Jr., DILLENBURG, S. R., CORRÊA, I. C. S., ALMEIDA, L. E. S. B., WESCHENFELDER, J., GRUBER, N. L. S. Sedimentação de Longo e Curto Período na Lagoa do Patos, Sul do Brasil. **Pesquisas em Geociências**, 33(2):79-86,2006.

TOLEDO, V., FERRARI, I. Estudos citogenéticos de três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). **Científica**, 4(2): 101-106, 1976.

TSUDA, J. R., DE MORAES, V. P. O., GIULIANO-CAETANO L., DIAS A. L. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). **Genetics and Molecular Research**, 9(3): 1929-1935, 2010.

VALCARCEL, A., BRUNNER, P., MAGGESE, M. C. B- chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. **Aquaculture**, 110:111-118, 1993.

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

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

VISSOTTO, P. C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). **Cytologia**, 62:61-66, 1997.

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

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

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

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES SOBRE A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA DOS GÊNEROS *Imparfinis* e *Pimelodella* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE)

*Este artigo será submetido à publicação na revista Cytogenetic and Genome Research

Considerações sobre a evolução cariotípica dos gêneros *Imparfinis* e *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae)

Juceli Gonzalez Gouveia, Vivian Patrícia Oliveira de Moraes, Tatiane Ramos de Sampaio, Renata da Rosa e Ana Lúcia Dias.

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone (43) 3371-4527 (e-mail: anadias@uel.br).

Resumo

Heptapteridae é uma das famílias de peixes da ordem Siluriformes com uma ampla distribuição nas bacias da região Neotropical. Estudos cariotípicos na família ainda são escassos, sendo realizados em menos de $\frac{1}{4}$ do total das espécies descritas e os gêneros *Imparfinis* e *Pimelodella* apresentam poucas espécies e/ou populações com alguma informação cromossômica. Foram analisados citogeneticamente espécimes de *Imparfinis schubarti*, *Imparfinis mirini* e *Pimelodella meeki* de diferentes locais pertencentes à bacia do Paranapanema/PR/Brasil. As duas espécies do gênero *Imparfinis* apresentaram $2n=58$ e $NF=116$: *Imparfinis schubarti* com $30m+28sm$ e *Imparfinis mirini* com $36m+22sm$. *Pimelodella meeki* apresentou $2n=46$ com $26m+14sm+6st$ e $NF=92$, confirmando uma variabilidade no $2n$ da família Heptapteridae. Ambas as espécies de *Imparfinis* possuem RONS intersticiais no par 1 coincidentes com uma constrição secundária e *P. meeki* apresentou RON terminal no braço curto do par 17. Todas as AgRONS foram coincidentes com a sonda de DNAr 18S e positivas para CMA_3 . A distribuição e composição da heterocromatina mostrou-se variável entre as espécies. *Pimelodella meeki* apresentou pouca quantidade, rica em bases AT e GC sendo, portanto, positiva para os fluorocromos DAPI e CMA_3 , respectivamente. A heterocromatina em *Imparfinis schubarti* mostrou-se positiva para CMA_3 . Em *Imparfinis mirini* além da heterocromatina ser positiva para o DAPI, o braço longo de um dos cromossomos do par 19, apenas dos indivíduos machos, mostrou-se totalmente heterocromático. Após análises meióticas, esse heteromorfismo pode ser facilmente identificado em fases de paquíteno e metáfase I, apresentando-se heteropicnótico e DAPI positivo. Essa característica pode ser um indicio de diferenciação inicial de cromossomos sexuais em *Imparfinis mirini*, reforçando a grande variabilidade cariotípica da família. Os dados obtidos confirmam uma diversidade cariotípica entre os heptapterídeos e revelam a importância dos bandamentos cromossômicos para maior caracterização citogenética das espécies, buscando assim um melhor entendimento das relações evolutivas neste grupo de peixes.

Palavras-chave: Bandamento cromossômico, Heteromorfismo, Pisces, Variabilidade cariotípica.

Introdução

Os Siluriformes compõem uma das ordens mais representativas da ictiofauna de água doce da região neotropical, com 478 gêneros e 3093 espécies distribuídos em 36 famílias e, dentre estas, Heptapteridae é uma das famílias de peixes com uma ampla distribuição nas bacias dessa região, possuindo 24 gêneros e 189 espécies válidas [Ferraris, 2007]. O gênero *Pimelodella*, é um dos gêneros mais diversificados da família, com 71 espécies distribuídas desde a bacia do rio La Plata, no sul da América do Sul, até o Panamá, na América Central; o gênero *Imparfinis*, com 18 espécies, também possui ampla distribuição nos rios de água doce da América Central e do Sul [Reis et al., 2003].

Até o momento, estudos cariotípicos na família Heptapteridae foram realizados em apenas 33 espécies, menos de $\frac{1}{4}$ do total das espécies descritas [Gouveia, em preparação] e os gêneros *Imparfinis* e *Pimelodella* apresentam apenas algumas poucas espécies e/ou populações com informações cromossômicas (tabela 1).

O gênero *Imparfinis* apresenta um predomínio de espécies com $2n=58$ (tabela 1), sendo observado um $2n=56$ apenas em uma população de *Imparfinis* cf. *piperatus* [Vissotto et al., 2001] e $2n=42$ em *Imparfinis hollandi* Haseman 1911 [Margarido e Moreira-Filho, 2008], na qual os autores sugerem a ocorrência de fusões cromossômicas para gerar um $2n$ menor. O gênero *Pimelodella* apresenta uma maior variação cariotípica sendo encontradas diferentes espécies com $2n=46$, 52 e 58 e distintas fórmulas cariotípicas (tabela 1).

Polimorfismos numéricos e estruturais já foram descritos em *Pimelodella* e *Imparfinis* como a presença de cromossomos B em *Pimelodella* sp [Garcia e Almeida-Toledo, 2010] e sistemas de cromossomos sexuais em *Imparfinis mirini* Haseman 1911 [Vissoto et al., 1997] e em *Pimelodella* sp [Dias e Foresti, 1993], sendo que polimorfismos de heterocromatina também já foram descritos para diferentes populações de *Imparfinis mirini* [Vissoto, 2000].

As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) em espécies de *Pimelodella* e *Imparfinis* apresentam-se simples, sendo terminais nas espécies de *Pimelodella* e intersticiais na maioria das espécies de *Imparfinis*, confirmadas pela localização de sonda de DNAr 18S em algumas espécies dos dois gêneros (tabela 1).

A sonda de DNAr 5S foi utilizada por Garcia e Almeida Toledo [2010] em *Pimelodella meeki* Eigenmann 1910, *P. boschmai* Van der Stigchel 1964 e *P. lateristriga* Lichtenstein 1823, cujos sítios ribossômicos localizam-se na região terminal de um par de cromossomos submetacêntricos e *Pimelodella gracilis* [Valenciennes, 1835] com quatro

cromossomos portadores desses sítios. No gênero *Imparfinis*, apenas *I. schubarti* [Gomes, 1956] possui dados sobre os genes de DNAr 5S, estando localizados na região intersticial de um par de cromossomos submetacêntricos apresentando sintenia com o sítio de DNAr 18S [Kantek et al., 2009].

Apesar de escassos, os dados demonstram que *Pimelodella* e *Imparfinis* são um excelente grupo para estudos citogenéticos comparativos e evolutivos, e reforçam a importância de análises citogenéticas mais refinadas, pois geralmente esses resultados se restringem apenas a uma descrição cariotípica. Diante disso, o presente estudo visa realizar análises de citogenética convencional e molecular em espécies dos gêneros *Pimelodella* e *Imparfinis* com o objetivo de trazer novas informações e contribuir assim para um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação e evolução cromossômica deste grupo de peixes.

Material e Métodos

Foram analisados 6 indivíduos de *Pimelodella meeki* Eigenmann 1910 (3 fêmeas e 3 com sexo não identificado) e 5 indivíduos de *Imparfinis mirini* Haseman 1911 (2 fêmeas, 2 machos e 1 com sexo não identificado), provenientes do ribeirão Jacutinga/Ibiporã/PR (23°13'25.3"S e 50°58'47.37"W); 12 indivíduos de *Imparfinis schubarti* [Gomes, 1956], sendo 6 indivíduos (4 fêmeas e 2 machos) foram coletados no ribeirão Três Bocas/Londrina/PR (23°23'06.6"S e 51°04'35.8"W) e 6 exemplares (3 fêmeas e 3 machos) provenientes do rio Laranjinha/Ribeirão do Pinhal/PR (23°24'9.11"S e 50°27'16.4"W). Os exemplares foram coletados com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com protocolo número: 11399-1. Os espécimes estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Paraná, Brasil, com números de voucher: 5766 (*P. meeki*); 5765 (*I. mirini*); 5762 (*I. schubarti* do ribeirão Três Bocas) e 5767 (*I. schubarti* do rio Laranjinha).

Coloração convencional: mitose e meiose

Após estimulação mitótica *in vivo* com a injeção prévia nos animais de solução de fermento biológico por 24h [Lee e Elder, 1980], os cromossomos mitóticos foram obtidos com a técnica de preparação direta segundo Bertollo et al. [1978] usando células do rim posterior. Os cromossomos foram visualizados por coloração convencional com Giemsa

5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8) e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), como comumente realizado em peixes [Bertollo et al., 1983; Morelli et al., 1983; Portela-Castro et al., 1988, entre outros]. O número fundamental (NF) foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como portadores de dois braços e cromossomos acrocêntricos portadores de um braço.

As fases meióticas foram obtidas a partir de gônadas dos machos. As gônadas foram retiradas e transferidas para uma pequena cuba de vidro contendo 8 a 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) por 30 min a temperatura ambiente, em seguida foi feita fixação com fixador recém preparado (álcool metílico: ácido acético, na proporção de 3:1) por 30 min (repetida 2 vezes). As gônadas foram guardadas em pequenos frascos plásticos, tipo “Ependorff” contendo fixador a 4°C, até o preparo das lâminas de acordo com Kligerman e Bloom [1977], com modificações, que consiste da maceração de pequenos pedaços da gônada em poços da placa de Kline contendo uma gota de ácido acético 45%; o material macerado é homogeneizado e pingado em uma lâmina de vidro em uma placa aquecedora (60°C); a coloração é feita com Giemsa 5%.

Bandamento cromossômico

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de prata [Howell e Black, 1980]. O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado pelo bandamento C corada com Giemsa e com fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,5-diamino-phenylindole (DAPI), após tratamento com HCl 0.1M, Ba(OH)₂ e 2xSSC, descrita por Sumner [1972]. Para a determinação dos sítios ricos em pares de base GC e AT foram utilizados os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,5-diamino-phenylindole (DAPI), segundo Schweizer [1978], respectivamente. As lâminas foram coradas com 0.5 mg/ml de CMA₃ por 1 hora, lavadas em água destilada e sequencialmente coradas com 0.5 mg/ml de DAPI por 15 minutos. As lâminas foram montadas com um meio composto de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0) 1:1, mais 2.5 mM de MgCl₂.

Hibridação fluorescente *in situ*

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com procedimento descrito por Pinkel et al. [1986], com modificações. A sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* [Hatanaka e Galetti, 2004] foi marcada com biotin-14-dATP por nick translation. As lâminas foram tratadas com 50 µL de mistura de hibridação contendo 100 ng de sonda marcada (7,5 µL), formamida 50% (30 µL), sulfato de dextrano 50% (12 µL), 20xSSC (10,5 µL). O mix de hibridação foi denaturado a 80°C, por 10 minutos e a hibridação foi realizada *overnight* a 37°C em câmara úmida. Após a hibridação as lâminas foram lavadas em 2xSSC por 5 minutos, em 1 x PBS e 1 x PBD (20xSSC, Triton 100, leite em pó desnatado e água destilada qsp 100; pH 7,0), todos a 45°C. A detecção do sinal foi feita utilizando 5 µL de FITC (1:100) e 45 µL de BSA (5%) e para amplificar o sinal foi utilizado 40 µL de solução de amplificação (1,0 µL anti-avidina-biotina conjugada e 39 µL de 1xPBD). As lâminas foram montadas com 25 µL da solução de DABCO (1,4-diazabicyclo (2.2.2)- octane (2,3%), 20 mM Tris HCl, pH 8.0, (2%) e glicerol (90%), em água destilada, 1 µL de MgCl₂ 50mM e 1 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL). As imagens foram obtidas com o fotomicroscópio Leica DM 4500 B, equipado com câmera DFC 300FX e o *software* 4.0 Leica IM50.

Resultados

Gênero *Imparfinis*

As duas espécies estudadas do gênero *Imparfinis* (*I. schubarti* e *I. mirini*), apresentaram 2n=58 cromossomos com número fundamental (NF) igual a 116, sem diferenças visíveis entre os sexos ou populações, sendo que *Imparfinis schubarti* apresentou 30m + 28sm e *Imparfinis mirini* 36m + 22sm (fig. 1a, b). Foi observada uma constrição secundária na região intersticial do braço longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos (par 1) em ambas espécies, coincidente com a Ag-RON, com a sonda de DNAr 18S e positiva para CMA₃ (fig. 1a, b-box).

Por meio da técnica de banda-C, a heterocromatina em *Imparfinis schubarti* e *Imparfinis mirini* mostrou forte marcação intercalar à constrição secundária do par 1 e fracas marcações nas regiões terminais e intersticiais de alguns cromossomos (fig. 2a, b, c), sendo que o braço longo de um dos cromossomos do par 19, dos indivíduos machos de *I. mirini*

mostrou-se totalmente heterocromático (fig. 2b). Essa característica não foi evidenciada nas fêmeas de *I. mirini* (fig. 2c).

Após coloração da banda C com fluorocromos a heterocromatina mostrou-se positiva para CMA₃ e negativa para DAPI em *Imparfinis schubarti* (fig. 4b e c) e a heterocromatina intercalar à constrição secundária apresentou marcação homogênea tanto para DAPI como para CMA₃ (fig. 4b, c). Em *Imparfinis mirini*, tanto nos machos como nas fêmeas, a heterocromatina mostrou-se positiva para o DAPI, inclusive aquela intercalar à constrição secundária do par 1 (fig. 4e, h); o braço longo heterocromático de um dos cromossomos do par 19 dos indivíduos machos também mostrou forte marcação pelo DAPI (fig. 4e). Este fato não foi evidenciado nas fêmeas de *Imparfinis mirini* (fig. 4h).

Foram observadas células meióticas masculinas de *Imparfinis mirini* em fase de paquíteno, diplóteno, metáfase I e anáfase (fig. 5a-d, respectivamente); após banda C, uma pequena região mais heterocromática mostrou-se DAPI positiva e CMA₃ negativa em fases de paquíteno e metáfase I (fig. 5e-h, respectivamente). Em paquíteno (fig. 5f) e metáfase I (fig. 5 g, h) pode ser evidenciada uma região CMA₃ positiva e DAPI negativa, provavelmente correspondente à RON.

Pimelodella meeki

Em *Pimelodella meeki* todos os indivíduos analisados apresentaram $2n=46$ cromossomos distribuídos em $26m + 14sm + 6st$, com número fundamental (NF) igual a 92 (fig. 1c).

A Ag-RON foi evidenciada na região terminal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (par 17), sendo coincidente com a coloração pelo fluorocromo base específico CMA₃ e com a sonda de DNAr 18S, identificada pela técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (fig. 1c-box).

Em relação à distribuição da heterocromatina de *Pimelodella meeki* foram observadas fracas marcações nas regiões terminais e pericentroméricas de poucos cromossomos, e a RON mostrou-se banda C positiva (fig. 3a). Quando coradas com fluorocromos, a heterocromatina apresentou-se positiva para DAPI e negativa para CMA₃ (fig. 3b, c).

Discussão

As espécies analisadas de Heptapteridae apresentaram $2n=58$ para o gênero *Imparfinis* e $2n=46$ para o gênero *Pimelodella* confirmando a variabilidade cariotípica da família, onde já foram evidenciados $2n$ de 46, 52, 56 e 58, segundo revisão feita por Swarça et al. [2007] e Gouveia [em preparação].

O número diplóide encontrado para as duas espécies de *Imparfinis* é considerado comum para o gênero, sendo observado em todas as populações já analisadas de *I. schubarti*, *I. mirini*, *I. minutus* [Lutken, 1874] e *I. piperatus* Eigenmann e Norris 1900 como relacionado na tabela 1, exceto *Imparfinis hollandi* [Margarido e Moreira-Filho, 2008] com $2n=42$ e *Imparfinis* cf. *piperatus* [Vissotto et al., 2001] que possui $2n=56$. No entanto, no gênero *Pimelodella* ocorrem espécies com $2n=46$ como *Pimelodella boschmai*, *Pimelodella gracilis*, e diferentes populações de *Pimelodella meeki* [Garcia e Almeida-Toledo, 2010], com $2n=52$ em *Pimelodella* aff. *avanhandavae* [Swarça et al., 2003] e também espécies como *Pimelodella lateristriga* com $2n=58$ [Garcia e Almeida-Toledo, 2010], além de espécies ainda sem descrição como relatado na tabela 1. Estes dados mostram que esse gênero apresenta considerável variabilidade em relação ao número diplóide, que pode servir como marcador para a caracterização das espécies desse grupo de peixes.

Recentemente, Borba et al. [2011] analisando diferentes espécies da família Heptapteridae e comparando com os dados já existentes, consideraram o $2n=58$ e cromossomos biarmados como o cariótipo plesiomórfico da família, por ser a categoria que mais prevalece neste grupo de peixes. Ainda segundo os autores, a redução do número diplóide nesta família, possivelmente seria resultado de eventos sucessivos de fusão como em *Imparfinis hollandi* com $2n=42$ [Margarido e Moreira-Filho, 2008].

Considerando que a hipótese acima seja válida, os gêneros *Pimelodella* e *Imparfinis*, são um bom exemplo de que rearranjos cromossômicos podem estar ocorrendo na evolução cariotípica dessa família, pois são os que mais possuem variação no $2n$ e na localização das RONS entre os heptapterídeos [Swarça et al., 2007], além da presença de cromossomos sexuais e polimorfismos (tabela 1).

Em três diferentes populações de *Pimelodella meeki* da bacia do Paranapanema, incluindo as do presente estudo, foram observadas diferenças sutis na fórmula cariotípica. Vidotto et al. [2004] analisaram esta espécie do rio Tibagi/PR, que apresentou um cariótipo com $30m+12sm+4st$; do rio Paranapanema/SP estudada por Garcia e Almeida-Toledo [2010] com $28m+12sm+6st$, e a população do ribeirão Jacutinga (presente estudo),

com 26m+14sm+6st; estas podem ser diferenças reais relacionadas com inversões cromossômicas ou diferenças nas medidas dos cromossomos entre os autores, que podem estar relacionadas com maior ou menor condensação dos cromossomos.

Um fato comum relatado no gênero *Imparfinis* é a presença de uma constrição secundária intersticial como evidenciado no primeiro par de cromossomos metacêntricos, tanto em *Imparfinis mirini* quanto em *Imparfinis schubarti*, e que já foi descrita para *Imparfinis mirini* [Vissotto et al., 1997], *Imparfinis piperatus* (Citótipo A) [Vissotto et al., 2001] e *Imparfinis* aff. *schubarti* [Stolf et al., 2004]. Fenocchio et al. [2003] colocam gêneros como *Rhamdia* e *Pimelodella*, com RONS simples localizadas nas regiões terminais dos cromossomos, em um grupo separado dos gêneros *Imparfinis* e *Cetopsorhamdia* que possuem RONS em posição intersticial dos cromossomos, coincidentes com as constrições secundárias como observado nas espécies de *Imparfinis* aqui analisadas. As RONS terminais observadas em *Pimelodella* (tabela 1), são mais comumente observadas nas espécies dessa família, podendo ser uma característica plesiomórfica como também sugerido por Borba et al. [2011].

Rearranjos cromossômicos como inversões poderiam ser responsáveis pelas RONS intersticiais na família Heptapteridae, assim como sua variação na localização cromossômica tanto em *Imparfinis* quanto em *Pimelodella* (tabela 1). Um fato interessante é que *Imparfinis hollandi* é a única espécie deste gênero com RON terminal e situada em um par subtelocêntrico [Margarido e Moreira-Filho, 2008], confirmando diversos caminhos evolutivos neste grupo de peixes.

Nas três espécies estudadas a hibridação com sonda de DNAr 18S confirmou os dados obtidos pela impregnação com nitrato de prata. Até o momento, apenas *Heptapterus longicauda* Bleeker 1858 [Vissotto et al., 1999b] apresenta RONS múltiplas, podendo ser considerado um caso raro na família. As RONS das espécies analisadas mostraram marcação positiva para o fluorocromo CMA₃, sendo, portanto, ricas em pares de bases GC. Essa associação foi relatada em outras populações de *Imparfinis* aff. *schubarti* [STOLF et al., 2004] e de *Pimelodella meeki* [Garcia e Almeida-Toledo, 2010], sendo estes os primeiros dados com coloração com CMA₃ e hibridação com sonda de DNAr 18S em *Imparfinis mirini*.

Vidotto et al. [2004] analisaram diferentes populações de *Pimelodella meeki* da bacia do rio Tibagi/PR, e observaram um heteromorfismo do tamanho da RON entre os homólogos, que não foi confirmado pela hibridação com sonda de DNAr 18S, e os autores sugeriram que esse heteromorfismo foi devido a diferenças na expressão de genes ribossomais

ou até mesmo acúmulo de heterocromatina ou crossing-over desigual, não relacionado a um maior número de cópias de genes de DNAr em um dos homólogos. Este fato não foi evidenciado na população do presente estudo, que também pertence à bacia do rio Tibagi/PR, provavelmente porque não houve a necessidade de um aumento na expressão destes genes entre os homólogos, ou outro tipo de evento como visto nas populações analisadas por Vidotto et al. [2004]. *Imparfinis schubarti* também não apresentou heteromorfismo de RON como evidenciado em outras populações dessa espécie [Stolf et al., 2004; Kantek et al., 2009].

Em relação à distribuição da heterocromatina, foram evidenciadas diferenças entre as três espécies analisadas. *Pimelodella meeki* e *Imparfinis mirini*, apresentaram pouca quantidade de heterocromatina, distribuída em algumas regiões pericentroméricas ou terminais, sendo este o padrão da família Heptapteridae. Entretanto, *Imparfinis schubarti* apresentou uma maior quantidade de heterocromatina, distribuída como blocos terminais em alguns cromossomos. Apesar desta diferença na quantidade de heterocromatina, as duas espécies de *Imparfinis* apresentaram um conspicuo bloco adjacente à constrição secundária, que também já foi observado em *Imparfinis piperatus* por Vissotto et al. [2001], em *Imparfinis schubarti* e *Imparfinis* aff. *schubarti* observado por Kantek et al. [2009] e Stolf et al. [2004], respectivamente, mostrando que esse par cromossômico apresenta diversas características comuns, sugerindo uma homeologia entre as diferentes espécies de *Imparfinis*, onde eventos evolutivos mantiveram esse par e suas características conservadas neste grupo de peixes.

Em *Pimelodella meeki* as RONS estão associadas à heterocromatina, como já relatado em *Pimelodella* sp1 e *Pimelodella* sp2 [Vasconcelos e Martins-Santos, 2000], *Pimelodella* aff. *avanhandavae* [Swarça et al., 2003] e *Pimelodella gracilis* [Garcia e Almeida-Toledo, 2010b], podendo ser uma característica do gênero.

Quando corada com fluorocromos base-específicos a heterocromatina apresentou padrões diferentes de composição de bases entre as espécies. *Imparfinis mirini* apresentaram regiões heterocromáticas positivas tanto para DAPI como para CMA₃ sendo, portanto, neutras para os pares de bases AT e GC e *Pimelodella meeki* positivas para DAPI; *Imparfinis schubarti*, entretanto, apresentou heterocromatina constituída preferencialmente por bases GC, sendo positiva para CMA₃.

O heteromorfismo da heterocromatina observado entre os cromossomos do par 19 de *Imparfinis mirini* do rio Jacutinga, poderia estar caracterizando o início de diferenciação cromossômica sexual do tipo XX/XY nesta espécie, pois foi evidenciado apenas nos indivíduos machos. Diversos trabalhos destacam o heteromorfismo da heterocromatina

importante para mudanças na morfologia e/ou tamanho dos cromossomos sexuais relatados em peixes [Moreira-Filho et al., 1993; Centofante et al., 2002; Mariotto et al., 2004; Rosa et al., 2006]. Vissotto et al. [1997], analisando duas populações de *I. mirini*, observaram um heteromorfismo semelhante apenas em indivíduos fêmeas, e os autores sugeriram um possível sistema sexual do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo W (submetacêntrico) das fêmeas era tido como portador de um grande bloco heterocromático terminal localizado no braço longo.

Entretanto, Vissotto [2000] analisou outras cinco populações de *I. mirini*, pertencentes a afluentes do rio Tietê e Paranapanema, e observou que esse polimorfismo, dependendo da população, aparece em homozigose (presente nos homólogos), em heterozigose (presente em apenas um dos cromossomos) ou ausente, tanto nos indivíduos machos como nas fêmeas, não confirmando assim um sistema cromossômico sexual. Todos esses dados demonstram que esse polimorfismo parece ser importante na evolução e diferenciação cromossômicas dessa espécie e que, os dados obtidos na população do presente estudo, sugerem que pode estar ocorrendo uma diferenciação sexual em *I. mirini*.

As fases meióticas de *Imparfinis mirini* mostraram um comportamento regular e confirmaram o número diplóide encontrado, sendo observados 29 bivalentes em diplóteno e metáfase I; e outras fases como paquíteno e anáfase I apresentaram características comuns, já descritas para outros grupos de peixes [Portela-Castro et al., 2001; Gross et al., 2009; Sampaio et al., 2011]. Nessas fases, o cromossomo com heteromorfismo da heterocromatina, além de apresentar um comportamento regular na meiose, pode ser facilmente observado após bandamento C, pois apresentou-se heteropicnótico, sendo um dos bivalentes DAPI positivo; essa configuração poderia ser a confirmação de uma diferenciação cromossômica sexual.

Em fases de paquíteno e metáfase I, após coloração com fluorocromos, observou-se uma região menos condensada, provavelmente a constrição secundária, que foi positiva para CMA₃ e negativa para DAPI, caracterizando-a, portanto, como o par da RON de *I. mirini*. Estas informações de meiose são inéditas para a espécie e mostram a importância desta análise no comportamento meiótico dos cromossomos, principalmente quando se tem a presença de um heteromorfismo como evidenciado em *I. mirini*.

Os dados obtidos, além de contribuir com novas informações, confirmam uma diversidade cariotípica entre os heptapterídeos e mostram a importância dos bandamentos cromossômicos, convencional ou molecular, para revelar divergências estruturais entre as espécies, como a localização das RONS e o polimorfismo de

heterocromatina, buscando uma melhor caracterização citogenética e entendimento dos mecanismos envolvidos na evolução cariotípica deste grupo de peixes.

Tabela 1- Dados citogenéticos em espécies dos gêneros *Imparfinis* e *Pimelodella* (Heptapteridae). m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st = subtolocêntrico; a = acrocêntrico; p = braço curto; q = braço longo; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; RON=região organizadora de nucléolo; R= rio; Rb= ribeirão.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	RON	DNAr 18S	Referência
<i>Imparfinis minutus</i>	R. Cunha/SP	58	42m+12sm+4st	116	Par 1 m, q, intersticial	-----	Garcia e Almeida-Toledo (2006)
<i>I. mirini</i>	R. Jacutinga/SP, R. Quinta/SP	58	22m+34sm ZZ/ZW	----	Par 1 m, q, intersticial	-----	Vissotto et al. (1997)
<i>I. mirini</i>	R. Pilar do Sul/SP	58	42m+12sm+4st	116	Par 1 m, q, intersticial	-----	Garcia e Almeida-Toledo (2006)
<i>I. mirini</i>	Rb. Jacutinga/PR	58	36m+22sm	116	Par 1 m, q, intersticial	Par 1 m, q, intersticial	Presente estudo
<i>Imparfinis cf. piperatus</i>	R. Juquiá /SP	56	24m+12sm+20st	----	Par 22 sm, q, intersticial	-----	Fenocchio et al. (2003)
<i>Imparfinis cf. pipetarus</i>	R. Juquiá/SP	56	22m+26sm+4st+4a	102	Par 28 a, q, intersticial	-----	Vissotto et al. (2001)
<i>I. piperatus</i>	R. Araras/SP	58	32m+26sm	116	Par 1 m, q, intersticial	-----	Vissotto et al. (2001)
<i>I. piperatus</i>	R. Grande/SP	58	26m+22sm+8st+2a	106	Par 1 m, q, intersticial	-----	Vissotto et al. (2001)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb.Marrequinhas, RbTrês bocas, R Água da Floresta, R. Vinicius, R. Taquari, R. Jataizinho-PR	58	28m+28sm+2st	116	Par 1 m, q, intersticial	Par 1 m, q, intersticial	Stolf et al. (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb. Canta Galo/SP, Rb. Três Bocas/PR	58	22m+18sm+10st+8a	----	Par 1 m, q, intersticial	-----	Fenocchio et al. (2003)
<i>Imparfinis cf. schubarti</i>	R. Paraná	58	24m + 22sm + 12st	----	Par 14 sm, q, intersticial	Par 14 sm, q, intersticial	Borba et al. (2011)
<i>I. schubarti</i>	Rb. Três Bocas, R. Laranjinha/PR	58	30m+28sm	116	Par 1 m, q, intersticial	Par 1 m, q, intersticial	Presente estudo
<i>I. hollandi</i>	R. Salto Osório, R. Iguaçú/PR	42	22m+10sm+10st	----	Par 18 st, p, terminal	Par 18 st, p, terminal	Margarido e Moreira-Filho (2008)
<i>I. schubarti</i>	Drenagem Piumhi/MG	58	18m+34sm+6st	116	Par 10 sm, q, intersticial	Par 10 sm, q, intersticial	Kantek et al. (2009)
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	R. Araquá/SP, R. Capivara/SP	46	20m+20sm+6st	86	1 par st, p, terminal	-----	Vissotto et al. (1999)
<i>Pimelodella aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	30m+22sm	104	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	Swarça et al. (2003)
<i>P. boschmai</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	46	38m+8sm XY/XX	92	Par 21 st, p, terminal	Par 21 st, p, terminal	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. gracialis</i>	R. Paraná/SP	46	34m+12sm	92	Par 18 sm, p, terminal	Par 18 sm, p, terminal	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	R. Limoeiro/PR, R. Couro de Boi/PR, R. Gabriel da Cunha/PR	46	30m+12sm+4st	92	1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	Vidotto et al. (2004)
<i>P. meeki</i>	R. São Miguel Arcanjo/SP, R. Pilar do Sul/SP	46	28m+12sm+6st	92	Par 20 sm, p, terminal	Par 20 sm, p, terminal	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>P. meeki</i>	Rb. Jacutinga/PR	46	26m+14sm+6st	92	Par 17 sm, p, terminal	Par 17 sm, p, terminal	Presente estudo
<i>P. meeki</i>	R. Paraná	46	26m +16sm +4st	----	Par 15 sm, p, terminal	Par 15 sm, p, terminal	Borba et al. (2011)
<i>P. lateristriga</i>	R. Paraíba do Sul Angra/RJ	58	36m+22sm	116	Par 20 sm, p, terminal	Par 20 sm, p, terminal	Garcia; Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella sp.</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	46	40m-sm+6st-a XX/XY	----	1 par sm, p, terminal	-----	Dias e Foresti (1993)
<i>Pimelodella sp.1</i>	R. Paraná/PR	46	20m+20sm+6a	92	Par 12 sm, p, terminal	-----	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodella sp.2</i>	R. Paraná/PR	52	22m+22sm+8st	104	Par 18 st, p, terminal	-----	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodella sp.</i>	R. Pardo Cardoso/SP	46	34m+12sm e Bs	92	Par 21sm, p, terminal	Par 21 sm, p, terminal e Bs	Garcia; Almeida-Toledo (2010)

Figura 1- Cariograma das espécies da família Heptapteridae: *Imparfinis schubarti* (a), *Imparfinis mirini* (b) e *Pimelodella meeki* (c). Em destaque os pares da RON com coloração por nitrato de prata, CMA₃ e marcação com sonda de DNAr 18S das três espécies analisadas; barra= 5µm.

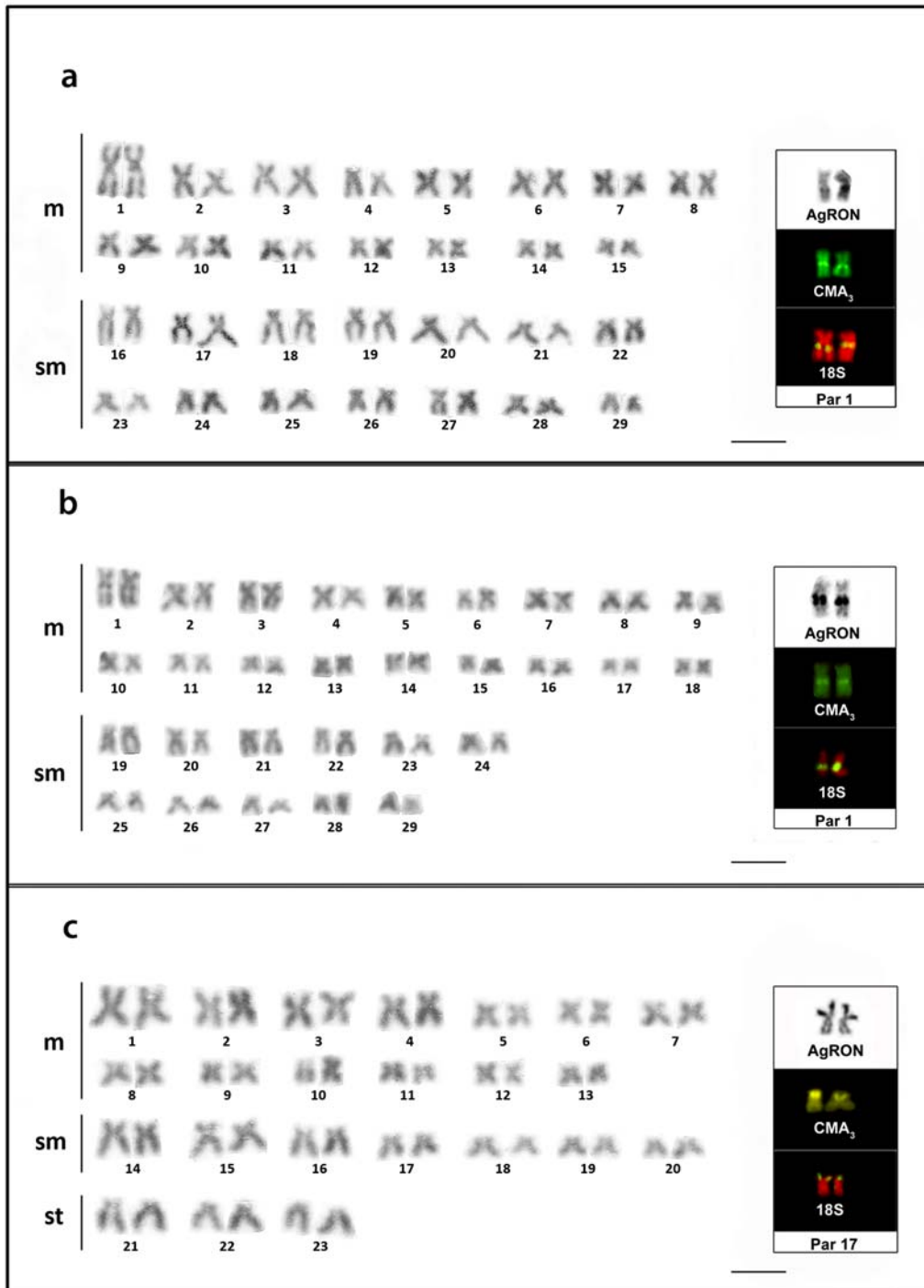


Figura 2- Cariograma de *Imparfinis schubarti* (a), macho de *Imparfinis mirini* (b) e fêmea de *Imparfinis mirini* (c) com banda C. O primeiro par apresentando constrição secundária com bloco intercalar de heterocromatina e em (b) no destaque, o par 19 de *Imparfinis mirini*, com heteromorfismo de heterocromatina; barra= 5µm.

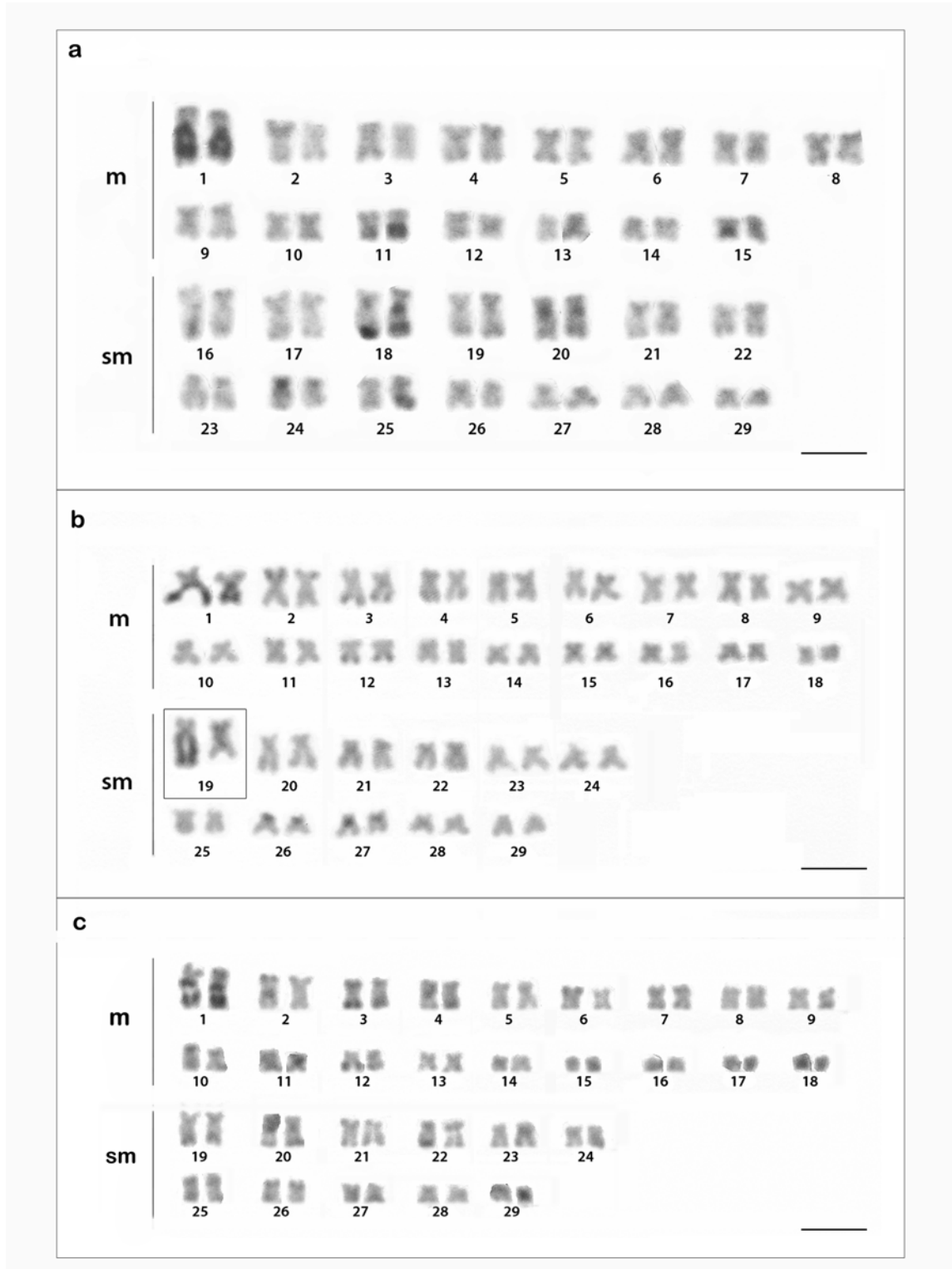


Figura 3- Metáfases somáticas com bandamento C de *Pimelodella meeki* (a, b, c): com Giemsa (a); DAPI (b) e CMA₃ (c). Setas indicam os pares da RON; barra= 5µm

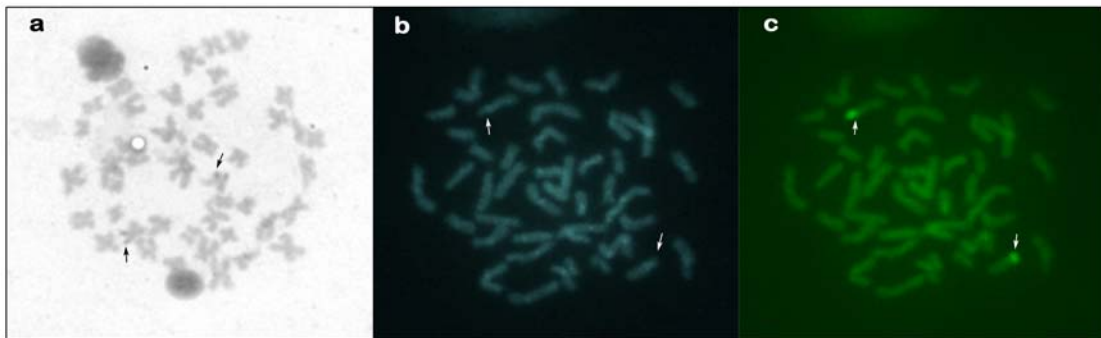


Figura 4- Metáfases somáticas com bandamento C de *Imparfinis schubarti* (a, b, c) e *Imparfinis mirini*: macho (d, e, f) e fêmea (g, h, i); com Giemsa (a, d, g); DAPI (b, e, h) e CMA₃ (c, f, i). Cabeças de seta em d, e, f evidenciam o cromossomo 19 do macho de *Imparfinis mirini* com heteromorfismo da heterocromatina e as setas indicam os pares da RON; barra= 5µm.

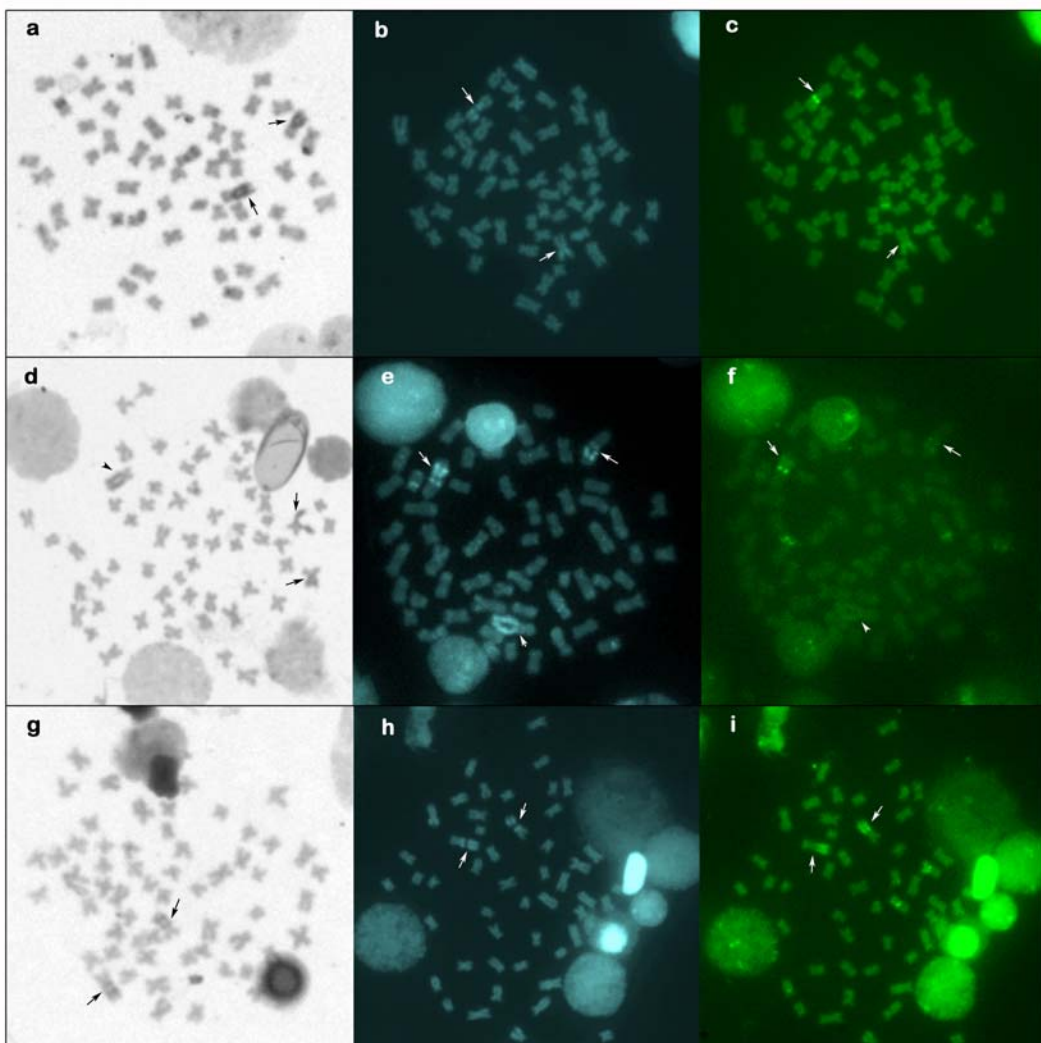
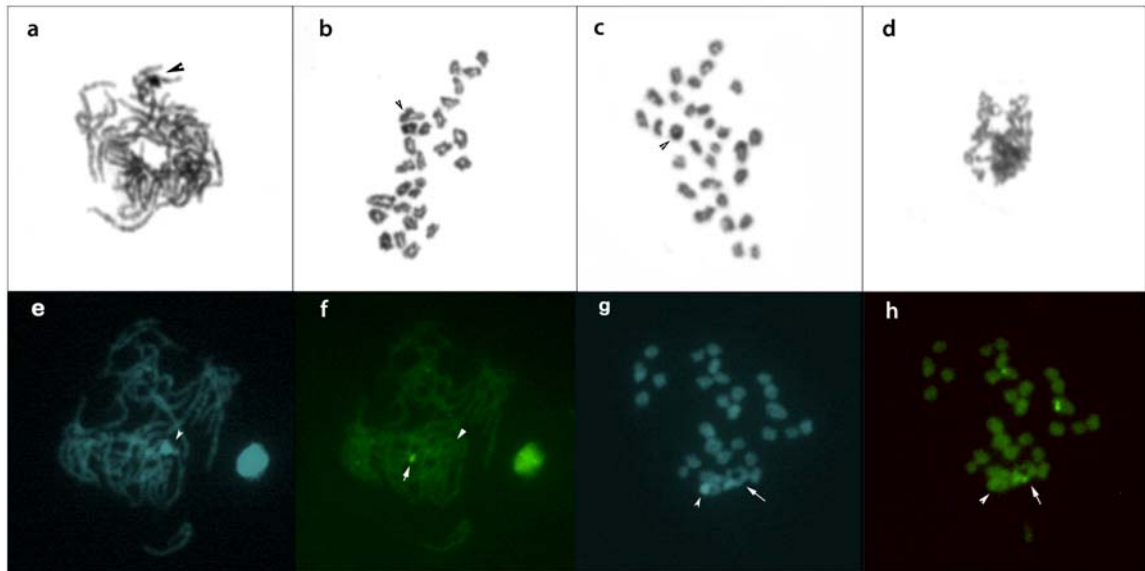


Figura 5- Células meióticas de *Imparfinis mirini* com bandamento C: (a-d) Giemsa, (e, g) DAPI; (f, h) CMA₃. Fase de paquíteno (a, e, f), diplóteno (b) e metáfase I (c, g, h) com 29 bivalentes e anáfase I (d). As cabeças de seta indicam, provavelmente, o cromossomo 19 e as setas em f, g, h indicam o par da RON.



Referências

- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1(2):103-120 (1978).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia* 48:1-12 (1983).
- Borba RS, Silva E L, Pacheco ACS, Parise-Maltempi PP, Alves AL: Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish Family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* DOI 10.1007/s11160-011-9245-3 (2011).
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parondon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55:139-150 (2002).
- Dias AL, Foresti F: Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev Brasil Genet* 16(3):585-600 (1993).
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Dias AL, Swarça AC: Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* 68(4):363-368 (2003).
- Ferraris CJ Jr: Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* pp.180-356 (2007).

- Garcia C, Almeida-Toledo LF: 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. International Congress of Fishes Genetics, São Carlos: SBG. p.110 (2006).
- Garcia C, Almeida-Toledo LF: Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* 63(1):32-40 (2010).
- Gross MC, Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C: Intriguing evidence of translocations in *Discus* fish (Symphysodon, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity* 1-7 (2009).
- Hatanaka TE, Gatetti PM Jr: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244 (2004).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015 (1980).
- Kantek DLZ, Peres WAM, Buckup PA, Moreira-Filho O: Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainagem, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *Zoologia* 26(4):733-738 (2009).
- Kligerman AD, Bloom SE: Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J Fish Res Board Can* 34:266-269 (1977).
- Lee MR, Elder FFB: Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 52:36-40 (1980).
- Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS: Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay river basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 57:327-331 (2004).
- Margarido V P, Moreira-Filho O: Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* 31(1):235-238 (2008).
- Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo-Filho S: Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia* 36(3):235-244 (1983).
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti PM Jr: Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46:115-125 (1993).
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934-2938 (1986).
- Portela-Castro ALB, Galetti PM Jr, Bertollo LAC: Consideration on the Chromosome Evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* 11:307-316 (1988).
- Portela-Castro ALB, Júlio HF Jr, Nishiyama PB: New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paran'á River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genética* 110:277-283 (2001).

- Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr: Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Edipucrs, Porto Alegre, p.742 (2003).
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP: Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. *Genética* 128:159-166 (2006).
- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias ALB: microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comparative Cytogenetics* 5(4):301-313 (2011).
- Schweizer D: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324 (1978).
- Stolf R, Swarça AC, Guiliano-Caetano L, Dias AL: Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. *Caryologia* 57(4):348-352 (2004).
- Sumner ATA: Simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306 (1972).
- Swarça AC, Vidotto AP, Dias AL: Cytogenetic characterization of *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State, Brazil). *Caryologia* 56(4):421-425 (2003).
- Swarça AC, Fenocchio AS, Dias AL: An update Cytogenetic Review for Species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a Cytotaxonomical Classification. *Caryologia* 60(4):338-348 (2007).
- Vasconcelos C, Martins-Santos IC: Chromosome Polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* 132:103-109 (2000).
- Vidotto AP, Swarça CA, Fenocchio AS, Dias AL: Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity* 95(6):517-520 (2004).
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C: A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia* 62:61-66 (1997).
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C: Karyotype description of Five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3:1-7 (1999).
- Vissotto PC: Análise citogenética no gênero *Imparfinis* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). Tese (Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, p.108 (2000).
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C: Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Science* 5: 97-103 (2001).

CAPÍTULO II

**TENDÊNCIAS EVOLUTIVAS NA FAMÍLIA PSEUDOPIMELODIDAE
(SILURIFORMES): TRIPLOIDIA NATURAL E CROMOSSOMOS
SUPRANUMERÁRIOS EM *Microglanis cottoides* (BOULENGER 1891)**

*Este artigo será submetido à publicação na revista Rev Fish Biol Fisheries

Tendências evolutivas na família Pseudopimelodidae (Siluriformes): triploidia natural e cromossomos supranumerários em *Microglanis cottoides* (Boulenger 1891).

Juceli Gonzalez Gouveia, Vivian Patrícia Oliveira de Moraes, Larissa Bettin Pires, Renata da Rosa e Ana Lúcia Dias

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone (43) 3371-4527 (e-mail: anadias@uel.br).

Resumo A família Pseudopimelodidae compreende 29 espécies amplamente distribuídas pelos rios da região Neotropical. Os estudos citogenéticos foram realizados em apenas seis espécies de quatro gêneros distintos. Neste trabalho foram reunidos dados cariotípicos de *Pseudopimelodus pulcher* e *Microglanis cottoides* de diferentes bacias hidrográficas, utilizando marcadores cromossômicos convencionais e moleculares. As duas espécies apresentaram $2n=54$, com $20m+16sm+10st+8a$ e $NF=90$ para *Pseudopimelodus pulcher* e $30m+14sm+6st+4a$ e $NF=104$ para *Microglanis cottoides*, sendo encontrada uma fêmea desta última espécie com $45m+21sm+9st+6a$ totalizando 81 cromossomos mais 2 cromossomos extras do tipo metacêntrico pequenos, sugerindo a ocorrência de triploidia natural com cromossomos supranumerários. *P. pulcher* apresentou de 2 a 4 AgRONS no braço curto do par 12 e 23, coincidentes com marcações pela sonda de DNAr 18S e positivas para o fluorocromo CMA₃. *Microglanis cottoides* apresentou apenas um par de cromossomos portador da RON (par 24) que também foi coincidente com a marcação com sonda de DNAr 18S e CMA₃. A fêmea triplóide de *Microglanis cottoides* apresentou três cromossomos subteloicêntricos positivos para AgRONS, sonda de DNAr 18S e CMA₃. A distribuição da heterocromatina nas duas espécies mostrou-se semelhante sendo observada nas regiões pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos, entretanto a composição apresentou diferenças: em *Pseudopimelodus pulcher* a heterocromatina foi positiva tanto para CMA₃ como para DAPI, sendo assim rica tanto em pares GC quanto AT. E em *Microglanis cottoides* foi apenas DAPI positiva, inclusive os cromossomos supranumerários do triplóide. A formação deste indivíduo poliplóide parece ter vindo a partir de um gameta feminino diplóide, pois tanto a fêmea quanto o triplóide apresentam dois cromossomos do primeiro par parcialmente heterocromáticos, fato este não evidenciado nos machos. Os dados apresentados são inéditos para *P. pulcher* e mostram a primeira descrição de triploidia natural com presença de cromossomos supranumerários na família. Apesar de escassos os dados citogenéticos neste grupo de peixes o $2n=54$ parece ser uma característica conservada, no entanto, diferenças significativas ocorreram em relação às RONS, podendo sugerir a presença de rearranjos cromossômicos na evolução cariotípica dos pseudopimelodídeos.

Palavras-chave: Cromossomos extras, Heterocromatina, DNAr 18S, Pisces, poliploidia.

Introdução

A família Pseudopimelodidae compreende 29 espécies amplamente distribuídas pelos rios da região Neotropical. É composta por cinco gêneros: *Batrachoglanis*, com cerca de 5 espécies encontradas nas bacias Amazônica, do Maracaibo, Orinoco e Magdalena; *Cephalosilurus*, com 4 espécies distribuídas no Orinoco, Amazônia e bacia do rio São Francisco; *Lophiosilurus*, com somente uma espécie descrita, *L. alexandri* Steindachner, 1877, com localização apenas na bacia do rio São Francisco; *Microglanis*, com 14 espécies e a maior distribuição, desde a vertente Ocidental dos Andes, no Peru, na bacia do rio La Plata e também na Argentina e *Pseudopimelodus*, com 5 espécies com ampla distribuição, nos rios da América do Sul e América Central (Shibatta 2003).

Os estudos citogenéticos são muito escassos nessa família e descrições cariotípicas foram realizadas em apenas seis espécies de quatro gêneros distintos: *Cephalosilurus apurensis* (Mees 1978), *Microglanis* aff. *cottoides*, *Microglanis cottoides* (Boulenger 1891), *Pseudopimelodus bufonius* (Valenciennes 1840), *Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes 1835) (revisão de Swarça et al. 2007) e *Lophiosilurus alexandri* (Marques et al. 2008). Estas análises revelaram $2n=54$ para todos os exemplares analisados, indicando uma evolução cariotípica bem conservada em relação ao número diplóide.

A heterocromatina em Pseudopimelodidae mostra-se distribuída como blocos heterocromáticos em alguns cromossomos, geralmente em regiões pericentroméricas e terminais (Vissotto et al. 1999; Martinez et al. 2008; Marques et al. 2008). As RONS neste grupo de peixes podem ser simples como em *Lophiosilurus alexandri* (Marques et al. 2008) ou múltiplas como em *Pseudopimelodus bufonius* (Martinez et al. 2008).

Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada, até o momento, apenas em *Lophiosilurus alexandri* por Marques et al. (2008). Os autores confirmaram a ocorrência de RONS simples nesta espécie utilizando a sonda de DNAr 18S e o sítio de DNAr 5S foi evidenciado em outro par de cromossomos não sendo sintênico com a RON. Marques et al. (2008) também utilizaram os fluorocromos cromomicina A₃ (GC específico) e DAPI (AT específico) em *L. alexandri*, assim como Martinez et al. (2004) em *Pseudopimelodus mangurus* e as duas espécies mostraram sinais positivos para CMA₃ correspondentes às Ag-RONS.

Neste trabalho foram apresentados dados cariotípicos de *Pseudopimelodus pulcher* (Boulenger 1887) e *Microglanis cottoides*, utilizando marcadores cromossômicos convencionais (Giemsa, RON e banda C) e moleculares (fluorocromos e FISH com sonda de

DNAr 18S), visando um melhor entendimento da evolução cromossômica na família Pseudopimelodidae. Os dados apresentados são inéditos para *P. pulcher* e mostram a primeira descrição de triploidia natural com presença de cromossomos supranumerários na família Pseudopimelodidae, em *M. cottoides*.

Material e Métodos

Foram analisados 5 indivíduos de *Pseudopimelodus pulcher* (Boulenger 1887) (2 machos, 2 fêmeas e 1 sexo não identificado) provenientes do rio Laranjinha pertencente a bacia do Paranapanema, localizado na cidade de Ribeirão do Pinhal/PR (23°24'9.11"S e 50°27'16.4"W) e 6 exemplares de *Microglanis cottoides* (Boulenger 1891) (4 machos e 2 fêmeas), do rio Forquetinha, pertencente ao Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos localizado na cidade de Forquetinha/RS (29°24'21.8"S e 52°03'18.3"W). Os exemplares foram coletados com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com protocolo número: 11399-1. Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL).

Coloração convencional

Após estimulação mitótica *in vivo* com a injeção prévia nos animais de solução de fermento biológico por 24h (Lee e Elder 1980), os cromossomos mitóticos foram obtidos com a técnica de preparação direta segundo Bertollo et al. (1978) usando células do rim posterior. Os cromossomos foram visualizados por coloração convencional com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8) e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), como comumente realizado em peixes (Bertollo et al. 1983; Morelli et al. 1983; Portela-Castro et al. 1988, entre outros). O número fundamental (NF) foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como portadores de dois braços e cromossomos acrocêntricos portadores de um braço.

Bandamento cromossômico

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de prata (Howell e Black 1980). O padrão de

distribuição da heterocromatina foi determinado pelo bandamento C com Giemsa após tratamento com HCl 0.1M, Ba(OH)₂ e 2xSSC, descrita por Sumner (1972). Para a determinação dos sítios ricos em pares de base GC e AT foram utilizados os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,5-diamino-phenylindole (DAPI), segundo Schweizer (1978), respectivamente. As lâminas foram coradas com 0.5 mg/ml de CMA₃ por 1 hora, lavadas em água destilada e sequencialmente coradas com 0.5 mg/ml de DAPI por 15 minutos. As lâminas foram montadas com um meio composto de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0) 1:1, mais 2.5 mM de MgCl₂.

Hibridação fluorescente *in situ*

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com procedimento descrito por Pinkel et al. (1986), com modificações. A sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti 2004) foi marcada com biotin-14-dATP por nick translation. As lâminas foram tratadas com 50 µL de mistura de hibridação contendo 100 ng de sonda marcada (7,5 µL), formamida 50% (30 µL), sulfato de dextrano 50% (12 µL), 20xSSC (10,5 µL). O mix de hibridação foi denaturado a 80°C, por 10 minutos e a hibridação foi realizada *overnight* a 37°C em câmara úmida. Após a hibridação as lâminas foram lavadas em 2xSSC por 5 minutos, em 1 x PBS e 1 x PBD (20xSSC, Triton 100, leite em pó desnatado e água destilada qsp 100; pH 7,0), todos a 45°C. A detecção do sinal foi feita utilizando 5 µL de FITC (1:100) e 45 µL de BSA (5%) e para amplificar o sinal foi utilizado 40 µL de solução de amplificação (1,0 µL anti-avidina-biotina conjugada e 39 µL de 1xPBD). As lâminas foram montadas com 25 µL da solução de DABCO (1,4-diazabicyclo (2.2.2)- octane (2,3%), 20 mM Tris HCl, pH 8.0, (2%) e glicerol (90%), em água destilada), 1 µL de MgCl₂ 50mM e 1 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL). As imagens foram obtidas com o fotomicroscópio Leica DM 4500 B, equipado com câmera DFC 300FX e o *software* 4.0 Leica IM50.

Resultados

Pseudopimelodus pulcher

Em *Pseudopimelodus pulcher* o número diplóide encontrado foi de 54 cromossomos com fórmula cariotípica de 20m+16sm+10st+8a e número fundamental (NF) igual a 90 (Fig. 1a).

Foram observadas de 2 a 4 AgRONS no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Par 12) e de um par de cromossomos subteloacêntricos (Par 23), coincidentes com marcações pela sonda de DNAr 18S, por meio da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (Fig. 1a-box). Na coloração com os fluorocromos também foram observados quatro cromossomos com sinais fluorescentes para CMA₃ e negativos para DAPI, coincidentes com as RONS (Fig. 1a-box).

A heterocromatina apresentou-se distribuída nas regiões pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos e, após coloração com fluorocromos foi positiva tanto para CMA₃ como para DAPI (Fig. 2a-d); um par submetacêntrico, de tamanho grande, provavelmente o par 12 da RON, mostrou marcação heterocromática na região pericentromérica e terminal do braço curto (Fig. 2a), sendo que a marcação pericentromérica foi positiva para CMA₃ e DAPI e a terminal foi positiva apenas para CMA₃ (Fig. 2b,c, d).

Microglanis cottoides

Microglanis cottoides também apresentou o número diplóide de 54 cromossomos com 30m+14sm+6st+4a e número fundamental (NF) igual a 104 (Fig. 1b). Uma fêmea de *Microglanis cottoides* apresentou 45m+21sm+9st+6a totalizando 81 cromossomos mais 2 cromossomos extras do tipo metacêntricos pequenos (Fig. 1c).

A AgRON dos indivíduos diplóides de *Microglanis cottoides* foi localizada no braço curto do par 24, subteloacêntrico, e do indivíduo triplóide foi localizada em três cromossomos subteloacêntricos (24). Em ambos os cariótipos (diploides e triploide) a RON foi coincidente com a marcação pela sonda de DNAr 18S, sendo também positiva para coloração com fluorocromo cromomicina A₃ (Fig. 1b, c-box).

A heterocromatina de *Microglanis cottoides* tanto dos diplóides como do triplóide, apresentou-se distribuída em regiões terminais e pericentroméricas de alguns cromossomos, sendo que o par da RON (24) foi banda C positiva, mostrando-se heterocromático na região terminal do braço curto (Fig. 3a, d, g) e os cromossomos supranumerários do indivíduo triplóide apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Fig. 3g-box).

Todas as regiões heterocromáticas dos indivíduos diplóides e do triplóide, mostraram-se positivas para DAPI e negativas para CMA₃ e somente o par da RON apresentou heterocromatina CMA₃ positiva (Fig. 3a-i).

O indivíduo triplóide apresentou dois dos primeiros cromossomos do complemento, um grande bloco de heterocromatina intersticial, assim como o primeiro par cromossômico da fêmea diplóide (Fig. 3d, g) que, após coloração com o fluorocromo DAPI mostrou-se bem mais evidente e positivo para este fluorocromo, assim como os cromossomos supranumerários da fêmea triplóide (Fig. 3e, h). Esse bloco de heterocromatina não foi evidenciado em nenhum dos indivíduos machos de *M. cottoides* (Fig. 3a, b, c).

Discussão

Tanto *Pseudopimelodus pulcher* como *Microglanis cottoides* apresentaram o número diplóide igual a 54 cromossomos, o que corrobora com o $2n$ descrito para as espécies de pseudopimelodídeos estudadas citogeneticamente até o momento, como relacionado na tabela 1, demonstrando que, apesar de poucas espécies analisadas cariotipicamente, apenas 7 das 29 espécies descritas na família, o número diploide indica uma evolução cromossômica conservativa neste grupo de peixes.

Estes são os primeiros dados cariotípicos para *Pseudopimelodus pulcher*, mas outras populações de *Microglanis cottoides* apresentaram fórmulas cariotípicas diferentes do presente estudo ($30m+14sm+6st+4a$), como as que foram analisadas por Vissotto et al. (1999) da bacia do Paranapanema, com $22m+20sm+12st$ e por Martinez et al. (2008) do ribeirão Cavalos/SC com $10m+32sm+10st+2a$. Essas diferenças podem estar relacionadas ao provável complexo de espécies do grupo “*cottoides*”, proposta por Mori (2005), que relaciona exemplares provenientes de drenagens litorâneas dos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, além da localidade tipo de *M. cottoides* que é o rio Camaquã (drenagem da Lagoa dos Patos/RS). Mori e Shibatta (2006) e Alcaraz et al. (2008), afirmam ainda que é necessário uma análise filogenética das espécies desse gênero que estão inclusas em diferentes complexos.

Além disso, *Microglanis cottoides* do rio Forquetinha apresentou um indivíduo com $45m+21sm+9st+6a + 2$ cromossomos pequenos, sugerindo a ocorrência de triploidia natural com cromossomos supranumerários ($3n=81+2$), sendo este o primeiro relato de tal evento na família Pseudopimelodidae. Triploidia natural em peixes neotropicais já foi relatada em diferentes espécies (Malacrida et al. 2003; Garcia et al. 2003; Kantek et al. 2007; Tsuda et al. 2010, entre outros) e uma das possíveis explicações para a ocorrência de tal evento estaria relacionada a mudanças de temperatura ambiental, que seriam responsáveis por facilitar a retenção do segundo corpo polar durante a divisão meiótica formando um gameta

diplóide que, após ser fecundado, originaria um indivíduo triplóide (Cuellar e Uyeno 1972). Os indivíduos de *M. cottoides* do presente estudo foram coletados num ambiente de águas frias, de serra e com constantes corredeiras, o que poderia então, facilitar algum tipo de choque térmico para formação deste gameta diplóide e, portanto, do indivíduo triplóide.

A fêmea triplóide de *Microglanis cottoides* apresentou um bloco heterocromático intersticial em dois dos três cromossomos 1 do complemento. A fêmea diploide também apresentou esta mesma característica no par 1 e em ambos indivíduos a heterocromatina foi positiva para DAPI. Essa característica poderia ser um marcador cromossômico confirmando a fêmea como portadora de um gameta diplóide, pois não foi evidenciada heterocromatina intersticial no primeiro par cromossômico em nenhum dos indivíduos machos, ou seja, os dois cromossomos heterocromáticos da fêmea triplóide teriam se originado de um gameta feminino diplóide e o cromossomo 1 eucromático do gameta masculino haplóide.

A presença de pouca heterocromatina em *Pseudopimelodus pulcher* e *Microglanis cottoides*, onde apenas alguns cromossomos apresentam bandas positivas, também já foi descrito para *Microglanis cottoides* (Vissotto et al. 1999) *Pseudopimelodus mangurus* (Martinez et al. 2004), *Cephalosilurus apurensis*, *Microglanis aff. cottoides* e *Pseudopimelodus bufonius* (Martinez et al. 2008), sugerindo que esta pode ser uma característica dos peixes dessa família. Todos os indivíduos de *Microglanis cottoides* (diplóides e triplóide) apresentaram RON com banda C positiva o que já foi observado por Martinez et al. (2008) em *Cephalosilurus apurensis* e *Pseudopimelodus mangurus* e também em *Microglanis aff. cottoides* por Martinez et al. (2004).

Após tratamento da banda C com fluorocromos CMA₃ e DAPI, pode-se observar que *Pseudopimelodus pulcher* apresenta heterocromatina rica em bases AT e GC, no entanto, um par submetacêntrico, de tamanho grande, provavelmente o par 12 da RON, revelou marcação pericentromérica positiva para CMA₃ e DAPI e a terminal foi positiva apenas para CMA₃, mostrando que estas regiões se diferenciam em relação à composição de bases da heterocromatina neste cromossomo, o que poderia sugerir um cromossomo marcador para esta espécie. Em *Pseudopimelodus mangurus*, Martinez et al. (2004) também observaram heterocromatina rica em bases GC. Já *Microglanis cottoides* do presente estudo, apresentou heterocromatina DAPI⁺, tanto nos indivíduos diploides como no triplóide.

A família Pseudopimelodidae, apesar de apresentar um número diplóide conservado, mostra grande variabilidade em relação às RONs, sendo observadas múltiplas e simples, tanto em espécies de diferentes gêneros como em diferentes espécies do mesmo

gênero, assim como variação na sua localização (tabela 1). As três diferentes populações de *Microglanis cottoides*, incluindo as do presente estudo, também mostram diferenças no padrão e na localização das RONS (tabela 1), além das fórmulas cariotípicas, como citado anteriormente, confirmando que podem ser realmente diferentes espécies e que merecem uma melhor análise filogenética e sistemática.

As diferenças observadas em diferentes espécies do mesmo gênero, como em *Pseudopimelodus mangurus* (Martinez et al. 2004) com RON simples e *Pseudopimelodus pulcher*, com RONS múltiplas, confirmam que as RONS são bons marcadores cromossômicos, podendo ser espécie-específicas e toda essa variabilidade indica que essas regiões não seguem um padrão na família e que rearranjos cromossômicos seriam eventos importantes durante a evolução cariotípica deste grupo de peixes. De acordo com Galetti Jr. (1998) um único par portador de DNAr 45S é considerado um caráter primitivo para peixes. Apesar do pequeno número de espécies estudadas, a maioria dos pseudopimelodídeos apresenta RONS simples, o que poderia ser considerado um caráter plesiomórfico para o grupo e as RONS múltiplas seriam derivadas, entretanto, este fato poderia ser confirmado com a análise de mais espécies dessa família.

As RONS de *Microglanis cottoides* e de *Pseudopimelodus pulcher* foram confirmadas pela hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S e estas regiões também mostraram-se positivas para cromomicina A₃, sendo portanto, ricas em bases GC. Coloração com fluorocromos tinha sido realizada apenas em *Pseudopimelodus mangurus* (Martinez et al. 2004), e *Lophiosilurus alexandri* (Marques et al. 2008), que também foram coincidentes com a RON e, sendo que nessa última espécie, também foi confirmada pela a hibridação com sonda de DNAr 18S.

O indivíduo triplóide de *Microglanis cottoides* apresentou três cromossomos portadores da RON, como já relatado em outros casos de triploidia em peixes (Maistro et al. 1994; Tsuda et al. 2010; Silva et al. 2011), tanto pela impregnação com nitrato de prata e CMA₃, como pela hibridação com sonda de DNAr 18S, não havendo portanto, a inativação de genes ribossomais e confirmando a triploidia.

Outro fato interessante em *Microglanis cottoides* é que foram evidenciados cromossomos supranumerários apenas no indivíduo triplóide, que se mostraram totalmente heterocromáticos e DAPI positivos. Cromossomos supranumerários totalmente heterocromáticos já foram relatados por Maistro et al. (1994) em um indivíduo triplóide de *Astyanax scabripinnis* (Jenyns 1842) e em *Curimata modesta* Walbaum 1792 por Venere e Galetti Jr. (1985). E o fato destes cromossomos serem evidenciados apenas no indivíduo

triploide de *Microglanis cottoides*, sugere que esta é uma condição única, e que poderia ser uma consequência do evento que levou a formação desse indivíduo. Este fato já foi mencionado por Pansonato-Alves et al. (2011) em um indivíduo triplóide de *Characidium* cf. *zebra* (Characiforme) que também apresentou cromossomos extras apenas neste indivíduo.

Este trabalho contribuiu com informações inéditas na família, como o primeiro relato citogenético de *Pseudopimelodus pulcher* e da população de *Microglanis cottoides* do Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos/RS, assim como a ocorrência de triploidia natural e cromossomos supranumerários. Apesar da escassez de dados cariotípicos em espécies da família Pseudopimelodidae a ocorrência de um $2n=54$ parece ser uma característica conservada, e diante dos resultados obtidos e os da literatura, pode-se observar que este grupo possui diferenças significativas no padrão das RONS e na distribuição e composição da heterocromatina, mostrando que estas diferenças podem ter surgido por caminhos evolutivos distintos, onde rearranjos cromossômicos tiveram um importante papel na evolução cariotípica desta família.

Tabela 1- Dados citogenéticos em espécies da Família Pseudopimelodidae. m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; a=acrocêntrico; p=braço curto; q=braço longo; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; R= rio; Rb= ribeirão; Aq= aquário.

Gênero/Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	RON	DNAr 18S	Referência
<i>Cephalosilurus apurensis</i>	R. Orinoco/ Venezuela	54	6m+28sm+14st+6a	-	Par 19 st p terminal	-	Martinez et al. (2008)
<i>Lophosilurus alexandri</i>	R. São Francisco	54	16m+18sm+10st+10a		1 par sm, p, terminal	1 par sm, p, terminal	Marques et al. (2008)
<i>Microglanis aff. cottoides</i>	Rb. Cavalo, R. Jaraguá do Sul/SC	54	10m+32sm+10st+2a	-	Par 23st, p e par 22st, q, terminal	-	Martinez et al. (2008)
<i>Microglanis cottoides</i>	R. Araquá e R. Capivara	54	22m+20sm=12st	96	Par 1m, q, terminal	-	Vissotto et al. (1999)
<i>Microglanis cottoides</i>	R.Forquetinha/RS	54	30m+14sm+6st+4a	104	Par 24 st, p, terminal	Par 24 st, p, terminal	Presente estudo
<i>Pseudopimelodus bufonius</i>	Aq. Trade/ Amazonia	54	12m+30sm+12st	-	Pares 9, 10 e 11 sm, p, terminal	-	Martinez et al. (2008)
<i>Pseudopimelodus bufonius</i>	R. Capim/PR	54	18m+22sm+6st+8a	100	1 par m,p terminal	-	Souza et al. (2003)
<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	54	6m+26sm+12st+10a	-	Par 19st, p, terminal	-	Martinez et al. (2004)
<i>Pseudopimelodus pulcher</i>	R. Laranjinha/PR	54	20m+16sm+10st+8a	90	Par 12 sm e par 23st, p, terminal	Par 12 sm e par 23st, p, terminal	Presente estudo

Figura 1- Cariograma de *Pseudopimelodus pulcher* (a) e *Microglanis cottoides*: diploide (b); fêmea triploide (c). No Box em a, b e c, os pares da RON com coloração por nitrato de prata, CMA₃ e marcação com sonda de DNAr 18S das espécies analisadas; barra= 5µm

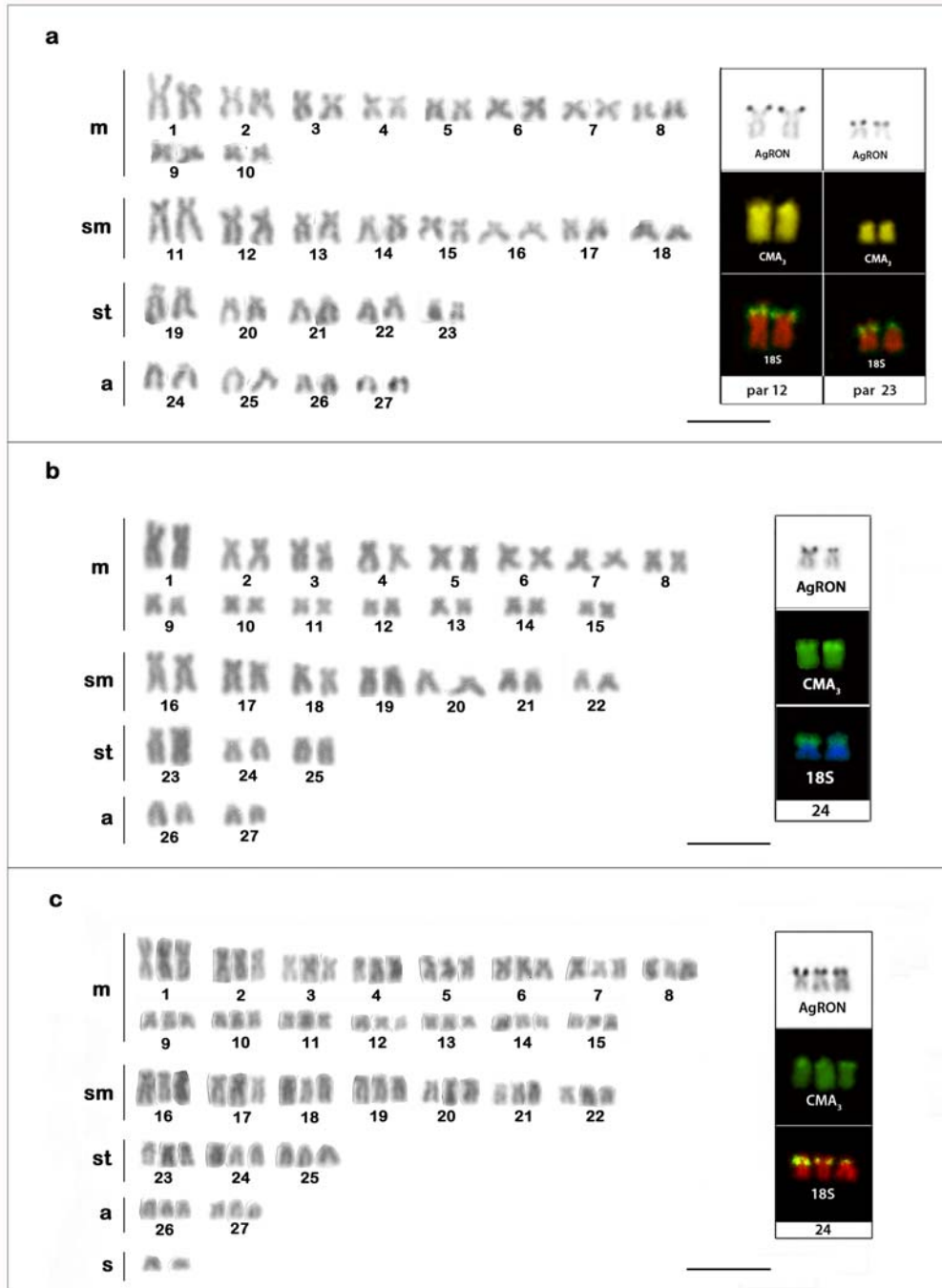


Figura 2- Metáfases somáticas de *Pseudopimelodus pulcher* com banda C: com Giemsa (a); DAPI (b); CMA₃ (c); e sobreposição DAPI/CMA₃ (d) Setas mostram o par cromossômico heterocromático com sítios AT na região pericentromérica e GC na região terminal do braço curto; barra= 5µm.

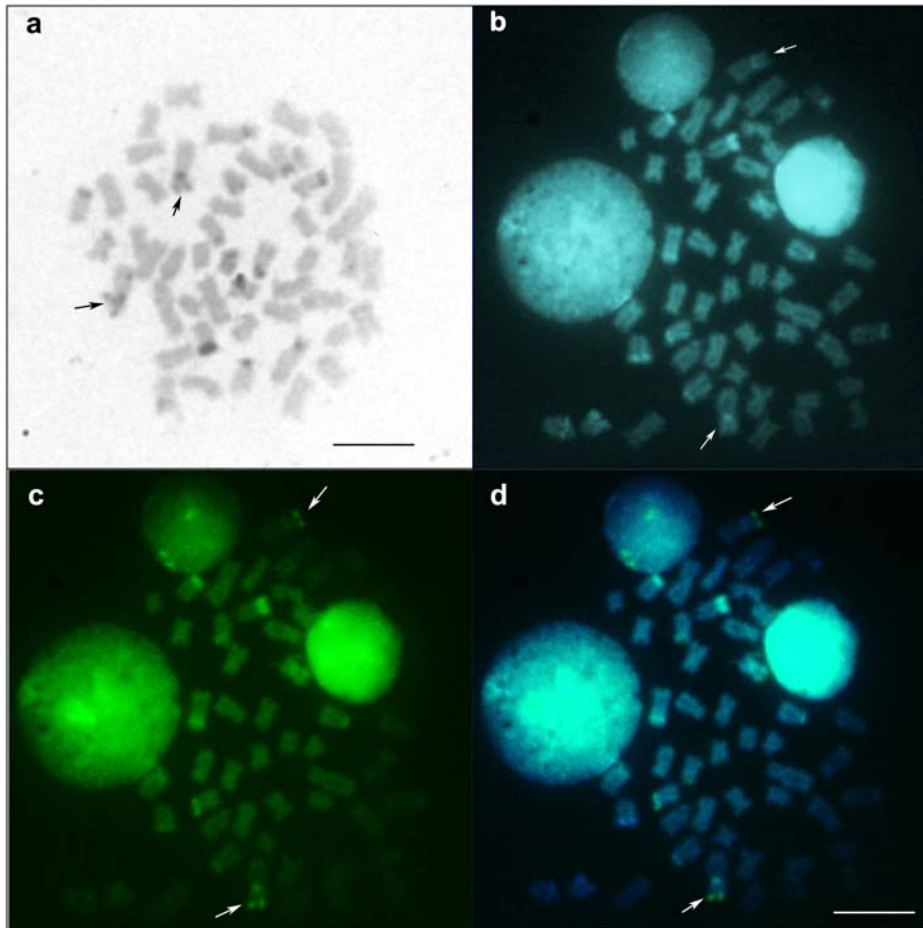
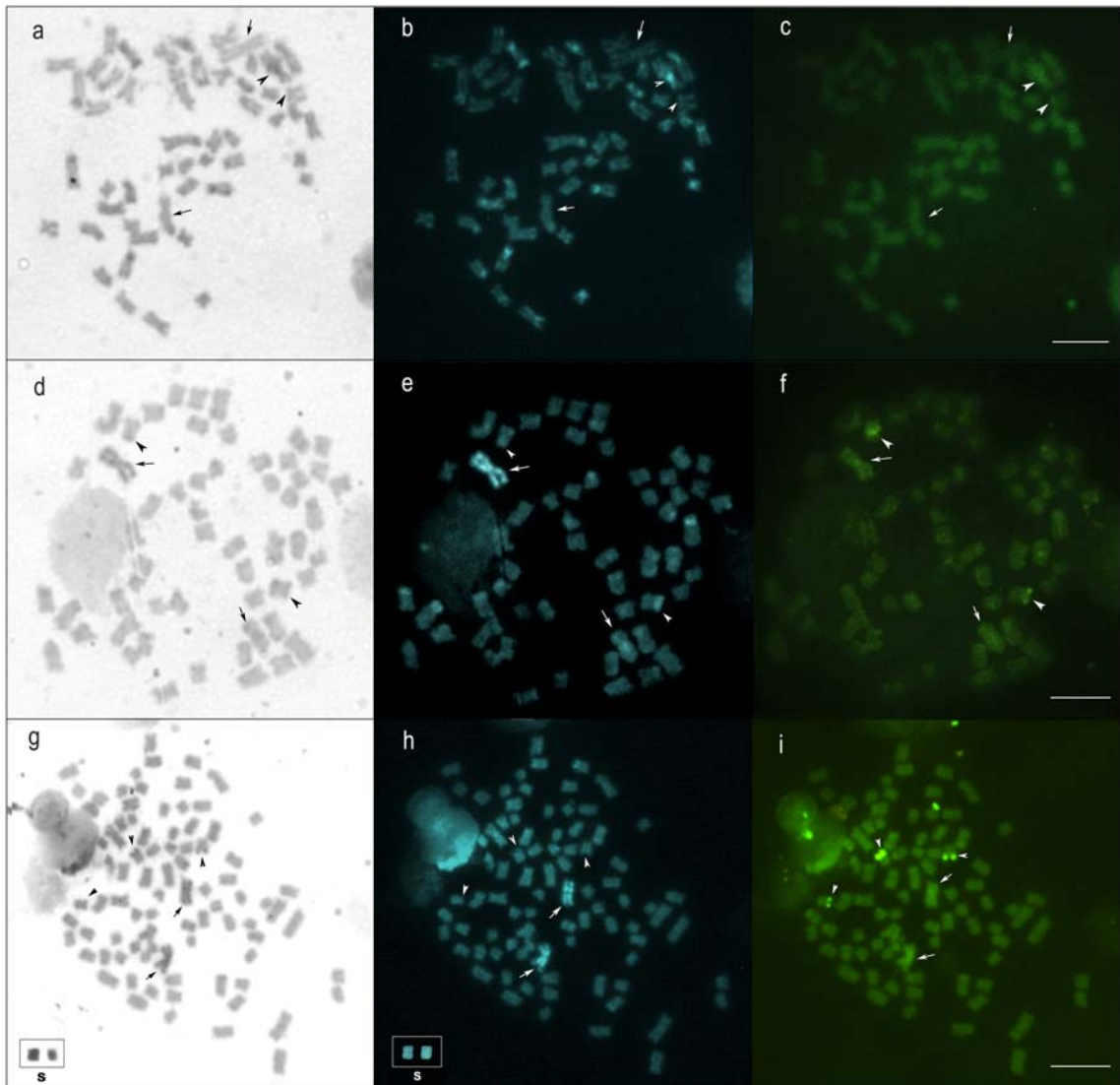


Figura 3- Metáfases somáticas de *Microglanis cottoides* (triploide e diploides) com banda C sequencial: (a, d, g) Giemsa; (b, e, h) DAPI; (c, f, i) CMA₃. As cabeças de seta indicam os pares da RON. Setas indicam os dois cromossomos 1 com bloco de heterocromatina intersticial da fêmea diplóide (d) e da fêmea triplóide (g), positivas para DAPI (e, h) e negativas para CMA₃ (f, i). O macho diploide (a, b, c) não possui bloco de heterocromatina no par 1 (setas). No box em (g, h) os dois cromossomos supranumerários totalmente heterocromáticos (g) e DAPI positiva (h); barra= 5µm.



Referências

- Alcaraz HSV, Da Graça WJ, Shibatta OA (2008) *Microglanis carlae*, a new species of bumblebee catfish (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the rio Paraguay basin in Paraguay. *Neotropical Ichthyology* 6(3):425-432
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1(2):103-120
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1983) Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia* 48:1-12
- Cuellar O, Uyeno T (1972) Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics* 11:508-515
- Galetti JrPM (1998) Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology* 65:53-56
- Garcia C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Centofante L (2003) B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* 68(4):403-411
- Hatanaka T, Galetti JrPM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015
- Kantek DLZ, Noletto RB, Fenocchio AS, Cestari MM (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu river basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:67-74
- Lee MR, Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 52:36-40
- Malacrida ACCP, Dias AL, Giuliano-Caetano L (2003) Natural triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. *Cytologia* 68(3):267-270
- Maistro EL, Dias AL, Foresti F, Oliveira C, Moreira-Filho O (1994) Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia* 47(3-4):233-239
- Marques MBA, Moreira-Filho O, Garcia C, Margarido VP (2008) Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco river basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology* 31(1):215-221
- Martinez ERM, Oliveira C, Foresti F (2004) Cytogenetic analyses of *Pseudopimelodus mangurus* (Teleostei: Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Cytologia* 69(4):419-424
- Martinez ERM, Nirchio M, Granado A, Foresti F, Oliveira C (2008) Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology* 31(3):692-696
- Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo-Filho S (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae): Karyotypic variability. *Caryologia* 36(3):235-244

- Mori H (2005) Três novas espécies de *Microglanis* Eigenmann, 1912 (Ostariophysi: Pseudopimelodidae) da bacia do leste e da bacia do rio São Francisco, com comentários sobre a distribuição do gênero em drenagens costeiras. Ph.D. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, pp 78
- Mori H, Shibatta OA (2006) A new species of *Microglanis* Eigenmann, 1912 (Siluriformes, Pseudopimelodidae) from rio São Francisco basin, Brazil. *Zootaxa* 1302: 31–42
- Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2011) Karyotypic conservatism in samples of *Characidium* cf. *zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genetics and Molecular Biology* 34(2):208-213
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Sci USA* 83:2934-2938
- Portela-Castro ALB, Galetti JrPM, Bertollo LAC (1988) Consideration on the chromosome evolution of *Tetragonopterinae* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* 11:307-316
- Souza L, Giuliano-Caetano L, Shibatta O (2003) Citogenética de *Pseudopimelodus bufonius* (Siluriformes, Pseudopimelodidae). In: 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, CD-Rom
- Schweizer D (1978) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and dapi. *Chromosoma* 58:307-324
- Shibatta OA (2003) Family Pseudopimelodidae, pp. 406-431. In: Reis, RE, Kullander SO, Ferraris JrCJ (eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre
- Silva M, Matoso DA, Ludwig LAM, Gomes E, Almeida MC, Vicari MR, Artoni R F (2011) Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçú basin, southern Brazil. *Environment Biology Fish* 91:361-366
- Sumner ATA (1972) Simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306
- Swarça AC, Fenocchio AS, Dias AL (2007) An update cytogenetic review for species of the families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a cytotaxonomical classification. *Caryologia* 60(4):338-348
- Tsuda JR, Moraes VPO, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2010) Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* 9(3):1929-1935
- Venere PC, Galetti JrPM (1985) Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Rev Brasil Genet* 7(4):681-687
- Visotto PC, Foresti F, Oliveira C (1999) Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3:1-7

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível evidenciar em diferentes espécies de duas famílias da ordem Siluriformes, características cromossômicas frequentemente encontradas em outras populações, assim como dados peculiares para cada família e de grande importância para inferências futuras no estudo desse grupo de peixes. De um modo geral, podem ser destacadas as seguintes considerações sobre o presente estudo:

1. As espécies da família Heptapteridae apresentaram variação no número diploide entre os dois gêneros analisados, onde as duas espécies do gênero *Imparfinis* apresentaram $2n=58$ e *Pimelodella* com $2n=46$ e todas as espécies apresentam diferentes fórmulas cariotípicas. As duas espécies analisadas da família Pseudopimelodidae, *Microglanis cottoides* e *Pseudopimelodus pulcher* apresentaram $2n=54$, com diferentes fórmulas cariotípicas.
2. Os indivíduos machos de *Imparfinis mirini*, da família Heptapteridae, apresentaram um heteromorfismo de heterocromatina no par 19, que apresentou-se DAPI⁺ e heteropicnótico em diferentes fases da meiose, podendo se tratar de uma diferenciação inicial de cromossomos sexuais nesta espécie.
3. *Microglanis cottoides* apresentou um indivíduo fêmea triploide ($3n=81$) com dois cromossomos extras, completamente heterocromáticos e DAPI⁺, constituindo no primeiro relato de poliploidia na família Pseudopimelodidae.
4. As RONS, pela impregnação com nitrato de prata e com a sonda de DNAr 18S, foram observadas em região intersticial do braço longo do par 1 em *Imparfinis schubarti* e *Imparfinis mirini*, coincidentes com a constrição secundária e na região terminal do braço curto do par 17 em *Pimelodella meeki*, confirmando a variabilidade das RONS da família Heptapteridae.

5. As RONS, pela impregnação com nitrato de prata e com a sonda de DNAr 18S, foram múltiplas em *Pseudopimelodus pulcher* sendo evidenciadas nas regiões terminais do braço curto do par 12 e 23; em *Microglanis cottoides* as RONS foram localizadas no braço curto do par 24, sendo que o indivíduo triploide dessa espécie apresentou três cromossomos portadores destas regiões.
6. Nas espécies da família Heptapteridae foram evidenciadas diferenças em relação à quantidade e composição da heterocromatina, onde *Imparfinis schubarti* apresentou blocos heterocromáticos $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ nas regiões pericentroméricas e terminais da maioria dos cromossomos. *I. mirini* e *Pimelodella meeki* apresentaram menor quantidade de heterocromatina, distribuída nas regiões pericentroméricas e terminais dos cromossomos, sendo que em *I. mirini* foi $\text{CMA}_3^-/\text{DAPI}^+$ e em *P. meeki* foi $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^+$.
7. Em *Pseudopimelodus pulcher* a heterocromatina apresentou-se distribuída nas regiões pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos, rica em bases AT e GC, onde um par submetacêntrico apresentou diferenças na composição de bases, sendo que na região terminal de braço curto apresentou heterocromatina CMA_3^+ e na região pericentromérica DAPI^+ . Esse par cromossômico poderia ser considerado como um marcador para *P. pulcher*.
8. A heterocromatina de *Microglanis cottoides* também se apresentou distribuída nas regiões pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos, podendo ser uma característica dos peixes da família Pseudopimelodidae, entretanto, em *M. cottoides* as regiões heterocromáticas foram DAPI^+ , inclusive no indivíduo triploide.
9. O indivíduo triploide de *Microglanis cottoides*, apresentou um grande bloco de heterocromatina em apenas dois dos primeiros cromossomos, assim como o primeiro par na fêmea diplóide. Essa característica não foi

evidenciada em nenhum dos indivíduos machos e pode ser considerada como um possível marcador para a formação desse indivíduo triploide: os dois cromossomos 1 heterocromáticos do triploide teriam se originado da fêmea com um óvulo diploide e o outro eucromático do macho com espermatozoide haploide.

10. Os dados aqui apresentados, além de contribuir para o aumento da documentação cariotípica para as duas famílias analisadas, mostram a importância do bandamento cromossômico (convencional e molecular) para uma melhor caracterização citogenética das espécies. Enquanto que Heptapteridae possui uma grande variação no número diploide, as espécies da família Pseudopimelodidae apresentam um $2n=54$ conservado. Entretanto, estes grupos de peixes mostram distintas fórmulas cariotípicas, diferentes padrões nas RONS e na distribuição e composição da heterocromatina, sugerindo que eventos de rearranjos cromossômicos estão envolvidos na evolução cariotípica dessas famílias.