



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA CAMPANER USSO

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES
RIBOSSOMAIS E DE DNASN U2 EM DIFERENTES
POPULAÇÕES DE *RHAMDIA QUELEN*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária

MARIANA CAMPANER USSO

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES
RIBOSSOMAIS E DE DNASN U2 EM DIFERENTES
POPULAÇÕES DE *RHAMDIA QUELEN*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**

MARIANA CAMPANER USSO

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES
RIBOSSOMAIS E DE DNASN U2 EM DIFERENTES
POPULAÇÕES DE *RHAMDIA QUELEN*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**

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

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Lúcia Dias

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

U87m Usso, Mariana Campaner.

Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de DNAsn U2 em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes Heptapteridae) / Mariana Campaner Usso. – Londrina, 2015.

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, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Peixe – Cariótipos – Teses. 3. Bagre (Peixe) – Teses. 4. Mapeamento cromossômico – Teses. 5. Sondas DNA – 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

MARIANA CAMPANER USSO

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES RIBOSSOMIAIS E DE
DNASN U2 EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *RHAMDIA QUELEN*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui
Universidade Estadual do Oeste do Paraná-
UNIOESTE

Prof^a Dra. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2015.

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, minha irmã, minha avó, minha tia e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À universidade Estadual de Londrina, em especial ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof^a Dr^a Ana Lúcia Dias pela orientação por toda a paciência e ensinamentos durante os dois anos de orientação, por nunca ter perdido a paciência mesmo em tempos de incertezas, e pelos incentivos de que tudo daria certo.

Agradeço também as professoras: Dr^a Lucia Giuliano Caetano e Dr^a Renata da Rosa, pelo apoio e contribuição na elaboração deste trabalho, por todos os esclarecimentos durante esses anos.

Um agradecimento especial a Dr^a Lucia Giuliano Caetano pela ajuda nas inúmeras coletas e por proporcionar momentos de muita descontração, reagado a muitas conversas e risadas.

Ao prof. Dr. José Luiz Birindelli, a sua aluna Julia e ao técnico Edson, por me aceitarem em suas coletas, em por todas as conversas e ensinamentos a beira do rio. Muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora Dr. Roberto Laridondo Lui e Dr^a Renata da Rosa, por aceitarem contribuir com sugestões neste trabalho. Muito obrigada!

A nossa eterna secretária Sueli, por toda ajuda, amizade e competência. Aos técnicos de laboratório Dário e Melissa, por toda a ajuda fornecida.

A minha amiga de graduação e companheira de mestrado Lilian Areal Marques, pela amizade e companheirismo, e por suportar meus momentos de desabafo.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal: Ana Beatriz, Angélica Rossotti, Angélica Tiepo, Fábio, Juceli, Mateus, Poliana, Raquel Bozini e Raquel Milanezi, pelos momentos de convivência e descontração e por toda ajuda prestada.

Um agradecimento muito especial a amiga Angélica Rossotti, por toda a amizade, por toda ajuda nos momentos mais difíceis, por ter me socorrido muitas vezes, quando achei que nada fosse dar certo. E por dividir comigo momentos de muita alegria também, afinal, amigos são para todas as horas.

A um amigo especial, Cristian, que aceitou nos ajudar mais de uma vez, que dedicou parte do seu tempo nos ensinando muito, por responder inúmeras mensagens de desespero total. Muito obrigada, devo muito do meu trabalho a você!

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelo empréstimo de seu laboratório na UNESP, que foi de extrema importância nesta pesquisa.

Em especial a minha família, meus pais Vera e Paulo e minha irmã Ana Paula, por me apoiarem e por fazerem parte da minha vida de forma tão especial, e me ajudarem sempre que preciso. A minha avó, Linda, que rezou inúmeras vezes para que tudo desse certo, mesmo não entendendo o que eu faço, apesar de várias tentativas de explicação, muito obrigada você é uma pessoa indispensável na minha formação.

Não poderia deixar de agradecer a minha tia amada, Inês, por ser minha maior incentivadora, por estar comigo em todos os momentos, me ajudando em todas as dificuldades, por agüentar meu nervosismo e estresse. Você é o meu maior orgulho e meu maior exemplo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

USSO, Mariana Campaner. **Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de DNAsn U2 em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Rhamdia quelen pertencente à família Heptapteridae é considerada um complexo de espécies devido a problemas taxonômicos e filogenéticos. A utilização de sondas de DNA repetitivo, que compõem grande parte do genoma eucarioto, pode auxiliar na elucidação destas questões. No presente trabalho, foram analisadas seis populações de *Rhamdia quelen*, onde todas apresentaram $2n=58$ com variações na fórmula cariotípica: $40m+10sm+4st+4a$ e número fundamental (NF) igual 112, para a população do rio Quexada/PR, $40m+12sm+6st$ (NF=116) para o Ribeirão do Penacho/PR, $32m+8sm+18st$ (NF=116) para o rio Cambé/PR e $34m+16sm+8st$ (NF =116) para o rio Miranda/MS. As duas outras populações, do rio Taquari e do Ribeirão Lindóia, ambas do estado do Paraná, foram anteriormente analisadas por outros autores, por meio de coloração convencional, impregnação por nitrato de prata e fluorocromos. A região organizadora de nucléolos (AgRONS) foi evidenciada na região terminal de um cromossomo submetacêntrico, nas quatro populações analisadas neste estudo. A coloração com fluorocromo CMA₃ foi positiva em um par de cromossomos, correspondente a AgRONS, sendo que a população do rio Quexada apresentou um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos. O mapeamento cromossômico de genes ribossomais 18S e 5S e de U2 DNAsn foi realizado nas seis populações de *Rhamdia quelen*, incluindo as do rio Taquari e do ribeirão Lindóia. Em todas a FISH com sonda de DNAr 18S confirmou o padrão simples da RON e os resultados mostraram diferentes padrões de distribuição de U2 DNAsn entre as populações, sendo que alguns sítios desta sequência mostraram-se co-localizados com genes ribossomais 18S. A utilização da sonda de DNAr 5S evidenciou um padrão simples para este sítio, exceto para a população do rio Miranda, que também mostrou-se diferente das demais populações em relação à sequência de DNAsn U2, apresentando um sítio simples. Os dados aqui apresentados confirmam, de modo geral, a evolução cariotípica conservativa de *Rhamdia quelen*, contudo, particularidades foram encontradas na população do rio Miranda revelando uma variação interpopulacional na microestrutura da espécie nunca antes evidenciada.

Palavras-chaves: Citogenética de peixes. Complexo de espécies. Família multigênica. FISH.

USSO, Mariana Campaner. **Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de DNAsn U2 em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. 2015. 72p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Rhamdia quelen belonging to Heptapteridae family, is considered a species complex due to taxonomic and phylogenetic problems. The use of repetitive DNA probes, which make up much of the eukaryote genome, may help to elucidate these issues. In this study, six populations of *R. quelen* were analyzed, all presented $2n = 58$, with variations in karyotype formula: $40m + 10sm + 4st + 4a$ and with an fundamental number (NF) of 112, for the population of the Quexada / PR river, $40m + 12sm + 6st$ (NF = 116) for the Penacho/ PR stream, $+ 32m + 8sm + 18st$ (NF = 116) for the Cambé / PR river and $34m + 16sm + 8st$ (NF = 116) of the Miranda / MS river. The other two populations, the river Taquari and stream Lindóia, both the state of Paraná, analyzed previously by other authors, using conventional staining, nitrate by impregnating silver and fluorochromes. The Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) was found in the terminal region of a chromosome submetacentric in the four populations analyzed in this study. Staining with fluorochrome CMA₃ was positive in a pair of chromosomes, corresponding to AgNORs, and the population of Quexada river presented a heteromorphic size between homologous chromosomes. The chromosomal mapping of ribosomal genes 18S and 5S and U2 DNAsn was carried out in six populations of *R. quelen*, including the Taquari river and Lindóia stream. In all the FISH with 18S rDNA probe confirmed the simple pattern of RONS and the results showed different snDNA U2 distribution patterns among populations, and some sites of this sequence proved to be co-located with 18S ribosomal genes. The use of 5S rDNA probe showed a simple pattern to this site, except for the population of the Miranda river, who also showed different from the other communities on following U2 snDNA, with a simple site. The data presented here confirm generally to conservative *R. quelen* karyotypic evolution, however, characteristics found in Miranda river population showing a microstructure of inter-population variation in species never before highlighted.

Keywords: Fish cytogenetics. Species complex. Multigene family. FISH.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados cariotípicos no gênero *Rhamdia*. 2n=número diplóide; Bs= cromossomo supranumerário; NF=número fundamental; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório; US=usina; Ar= Argentina; BR= Brasil; EUA= Estados Unidos da América; MG=Minas Gerais; MS= Mato Grosso do Sul; PR=Paraná; SC= Santa Catarina; SP=São Paulo; RJ= Rio de Janeiro 22
- Tabela 2** – Dados de DNAr 18S e 5S na família Heptapteridae. 2n=número diplóide; FISH= hibridização in situ ; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório;GO=Goiás;MG=Minas Gerais;PR= Paraná;RJ=Rio de Janeiro;RS= Rio Grande do Sul; SP=São Paulo..... 26
- Tabela 3**– Locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares de *Rhamdia quelen* analisados. MS= Mato Grosso do Sul; PR= Paraná 34

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares de *Rhamdia quelen* analisados. MS= Mato Grosso do Sul; PR= Paraná 40
- Tabela 2** – Dados cariotípicos em *Rhamdia quelen*. 2n=número diplóide; Bs= cromossomo supranumerário; NF=número fundamental; RON= região organizadora de nucléolo, FISH18S= hibridização in situ com sonda de DNAr 18S; FISH 5S= hibridização in situ com sonda de DNAr 5S; CMA3=fluorocromos cromomicina A3; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório; Ar= Argentina; MS=Mato Grosso do Sul; PR=Paraná; RJ=Rio de Janeiro; RS= Rio Grande do Sul; SC=Santa Catarina; SP= São Paulo 55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mapa do Brasil: locais de coleta: (a) bacia do rio Alto Paraguai: rio Miranda (MS); (b) bacia rio Paraná: rio Quexada (PR), ribeirão do Penacho (PR), rio Taquari (PR), ribeirão Lindóia (PR), rio Cambé (PR)..... 35

CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Cariótipos de *Rhamdia quelen*: (a) rio Quexada; (b) ribeirão do Penacho; (c) rio Cambé (d) rio Miranda. Nos boxes laterais, os cromossomos da RON com impregnação pelo nitrato de prata e como fluorocromo CMA3..... 58
- Figura 2-** Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* após Double FISH com sondas de DNAr 18S (verde) e DNAsn U2 (vermelho): (a) rio Quexada; (b) ribeirão do Penacho; (c) rio Miranda; (d) rio Taquari; (e) ribeirão Lindóia. E FISH com DNAr 18S (verde) na população do rio Cambé (f) As setas indicam os sítios de DNAr 18S e as cabeças de seta indicam os sítios de DNAsn U2..... 59
- Figura 3-** Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* após FISH com sonda de DNAr 5S: (a) rio Quexada; (b) ribeirão do Penacho; (c) rio Miranda; (d) rio Taquari; (e) ribeirão Lindóia (f) rio Cambé. As setas indicam os sítios de DNAr 5S..... 60

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	A família Heptapteridae o gênero <i>Rhamdia</i> : aspectos gerais.....	13
1.2	O gênero <i>Rhamdia</i> : aspectos citogenéticos.....	17
1.3	Mapeamento de DNAs repetitivos em Heptapteridae: localização de DNAs ribossomais 18S e 5S	24
1.4	Pequenos DNAs nucleares (DNAsn): um novo marcador citogenético	28
2.	Objetivo geral e específicos	32
3.	Material e Locais de coleta	33
CAPÍTULO 1 - Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de rnasn u2 em diferentes populações de <i>Rhamdia quelen</i> (siluriformes, heptapteridae).....		
	Resumo	37
	Introdução.....	37
	Material e métodos	40
	Resultados.....	41
	Discussão.....	43
	Referências	49
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Heptapteridae e o gênero *Rhamdia*: aspectos gerais

Os peixes pertencentes à ordem Siluriformes apresentam como característica marcante o corpo nu, envolto por pele espessa ou coberto total ou parcialmente por placas ósseas (BRITSKI et al., 1998) e são conhecidos popularmente como mandis, bagres e cascudos (NELSON, 2006). É uma das ordens mais representativas de peixes neotropicais, distribuídos em 36 famílias, 478 gêneros e 3.093 espécies (FERRARIS, 2007).

A família Heptapteridae é uma das famílias mais especiosas da ordem Siluriformes, compreendendo atualmente 208 espécies (ESCHMEYER e FONG, 2014) distribuídas em 26 gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparales*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Phreatobius*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia* (BOCKMANN e GUAZELLI, 2003). No território brasileiro estão distribuídas, aproximadamente, 100 espécies pertencentes a 20 gêneros (BOCKMANN, 2007).

Os heptapterídeos geralmente encontram-se solitários, escondidos na vegetação da margem dos rios e alguns gêneros apresentam ampla distribuição pelos rios da América do Sul contudo, algumas espécies são marcadas por forte endemismo e hábitos troglomórficos. Seu hábito alimentar é variado, mas a maioria é carnívora ou onívora e a fertilização é externa, não apresentando dimorfismo sexual e nem cuidado parental com a prole (BOCKMANN e GUAZELLI, 2003).

As relações filogenéticas da família têm passado por várias modificações nos últimos anos. Segundo dados morfológicos de Pinna (1993), esta família estaria mais

relacionada a bagres asiáticos, Bagridae, do que à Pimelodidae e Pseudopimelodidae, sendo que Bagridae, Heptapteridae e Olyridae pertenceriam à Subordem Heptapteroidei, Pimelodidae pertenceria à Subordem Eusiluroidei e, por fim, Pseudopimelodidae à Loricarioidei.

A filogenia proposta por Bockmann (1998), para a subordem Heptapteroidei, também com base em dados morfológicos, coloca a família Heptapteridae como um grupo monofilético, enquanto que Bagridae só será considerado monofilético se Olyridae se tornar seu sub-grupo. Segundo o autor, Heptapteridae estaria dividida em duas tribos monofiléticas: Phreatobiini (que inclui *Preatobius*, *Gladioglanis* e os outros gêneros com músculo *adductor mandibulae* hipertrofiados) e a Heptapteriinae (que inclui os demais gêneros).

Nos últimos anos, Brito (2003), Diogo (2003) e Sullivan et al. (2006), utilizando-se de dados morfológicos e moleculares, mostram Heptapteridae mais relacionada às famílias Pimelodidae e Pseudopimelodidae, formando junto com o gênero *Conorhynchos* a superfamília Pimelodoidea, subordem Siluroidei.

Além da complexa relação filogenética da família Heptapteridae, existem muitos conflitos taxonômicos em relação aos seus gêneros e espécies. A classificação das espécies torna-se difícil, principalmente nos casos das espécies crípticas, onde os caracteres morfológicos não são suficientes para sua distinção e, geralmente, estão associadas a “complexos de espécie”, onde diferentes espécies biológicas são incluídas em uma mesma nomenclatura taxonômica, como ocorre em *Rhamdia quelen* (PERDICES et al., 2002).

Os gêneros *Imparfinis*, *Pimelodella* e *Rhamdia* são os mais amplamente estudados em Heptapteridae. *Imparfinis* possui 18 espécies válidas (BOCKMANN e GUAZELLI, 2003) e suas relações filogenéticas são uma das menos resolvidas dentro

da família (BOCKMANN, 1994), suas espécies estão distribuídas pelos rios da América Central e em áreas tropicais da América do Sul. São peixes relativamente pequenos, com hábitos noturnos e bentônicos (CASTRO e CASSATI, 1997). *Pimelodella* possui 70 espécies válidas, o gênero mais especioso da família, dentre estas espécies pelo menos 30 ocorrem no Brasil. São peixes de pequeno a médio porte. Habitam ambientes diversificados como cabeceira de riachos, grandes rios, tanto na superfície quanto em ambientes subterrâneos (BOCKMANN e GUAZELLI, 2003).

O gênero *Rhamdia* ocorre em praticamente todas as bacias hidrográficas da América do Sul (SILFVERGRIP, 1996). A sistemática deste gênero é extremamente complexa, sendo que a única revisão sistemática realizada até o momento foi por Silfvergrip (1996), que considerou como válidas apenas 11 das quase 100 espécies descritas. A descrição de mais quatro espécies nos últimos anos eleva o número para 15 espécies válidas (BOCKMANN e GUAZELLI, 2003).

O gênero *Rhamdia* incluiria 19 espécies válidas fundamentado no reconhecimento de *Rhamdia guatemalensis* (GÜNTHER, 1864) como espécie válida por Greenfield e Thomerson (1997), Weber & Wilkens (1998), Bussing (1998), Romero e Paulson (2001), Wilkens (2001) e Weber et al. (2003); *Rhamdia zongolicensis* Wilkens, 1993 como válida por Weber e Wilkens (1998), Romero e Paulson (2001) e Wilkens (2001); *Rhamdia cinerascens* (GÜNTHER, 1980) como válida por Perdices et al. 2002; e a transfrência de *Brachyrhamdia marthae* Sands e Black, 1985 para o gênero *Rhamdia* por Zarske (2003) (ANZA, 2006).

Os dados de Ferraris (2007), entretanto, propõem que o gênero é composto por 17 espécies válidas: *Rhamdia enfunada*, *R. foina*, *R. guasarensis*, *R. humilis*, *R. itacaiunas*, *R. jequitinhonha*, *R. laluchensis*, *R. laticauda*, *R. laukidi*, *R. macuspanensis*,

R. muelleri, *R. nicaraguensis*, *R. parryi*, *R. poeyi*, *R. quelen*, *R. reddelli* e *R. xetequepeque*.

Segundo os bancos de dados Fish Base e Taxonomicon ditos respectivamente como: Froese e Pauly (2015) existem hoje 21 espécies consideradas válidas para o gênero *Rhamdia*, já para Bronds (1989-present) são 28 espécies válidas. Como pode ser observado, muitos ainda são os conflitos dentro do gênero, e segundo Bockmann e Guazelli (2003) a família Heptapteridae de modo geral é pouco estudada taxonomicamente e *Rhamdia* seria um gênero, sem nenhuma dúvida, parafilético.

Dentre as espécies do gênero, *Rhamdia quelen*, é a que apresenta maior distribuição geográfica na família Heptapteridae, sendo conhecida popularmente como jundiá, jandiá, mandi e sapipoca. Seus representantes vivem em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GUEDES, 1980), podendo ser encontrados, inclusive, vivendo em simpatria com outras espécies de *Rhamdia*.

A coloração de *Rhamdia quelen* varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável, podendo ser diferenciada das outras espécies por características como: espinho da nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados; nadadeira caudal com lóbulos desiguais; membrana interradial menor do que 2/3 do comprimento do raio do lobo superior da nadadeira caudal/ lobo inferior da nadadeira caudal; com ou sem poros sensoriais múltiplos na cabeça; véu da narina posterior aberta postero-lateralmente, barbilhões maxilares no mínimo 28,8% do comprimento padrão; arcos branquiais de 5 a 16; vértebras pós Weberianas de 36 a 44; olhos de tamanho médio, com ou sem padrão de manchas; com ou sem uma marca tipo selim escuro na nuca (SILFVERGRIP, 1996).

Ferraris (2007) considera *Rhamdia quelen* sinonímia para outras 50 espécies, sendo: *Silurus quadrimaculatus*, *Silurus erythropterus*, *Pimelodus quelen*, *Pimelodus sebae*, *Pimelodus nandia*, *Heterobranchus sextentaculatus*, *Pimelodus sapo*, *Pimelodus hilarii*, *Pimelodus pentlandii*, *Pimelodus Stegelychii*, *Pimelodus Sellonis*, *Pimelodus Deppei*, *Pimelodus musculus*, *Pimelodus Vilsoni*, *Pimelodus cinerascens*, *Pimelodus guatemalensis*, *Pimelodus wuchereri*, *Pimelodus godmanni*, *Pimelodus micropterus*, *Pimelodus (Rhamdia) Baronis Mülleri*, *Pimelodus wagneri*, *Rhamdia dorsalis*, *Rhamdia bransfordii*, *Pimelodus bathyurus*, *Pimelodus (Rhamdia) Parabybae*, *Pimelodus (Rhamdia) Queleni cuprea*, *Pimelodus (Rhamdia) Cuyabae*, *Rhamdia oaxacae*, *Rhamdia depressa*, *Pimelodus Boucardi*, *Rhamdia heteracantha*, *Rhamdia barbata*, *Rhamdia nasuta*, *Rhamdia branneri*, *Rhamdia branneri voulezi*, *Rhamdia mounseyi*, *Rhamdia riojae*, *Rhamdia ortonii*, *Rhamdia microps*, *Rhamdia pubescens*, *Silurus rivularis*, *Silurus 9-radiatus*, *Caecorhamdia urichi*, *Rhamdia guatemalensis muriei*, *Rhamdia guatemalensis decolor*, *Rhamdia guatemalensis stygaaea*, *Rhamdia saijaensis*, *Rhamdia duquei*, *Rhamdia sebae martyi*, *Rhamdia lehmanni*.

Devido à grande dificuldade de identificação das espécies, muitos ainda são os conflitos taxonômicos existentes no gênero *Rhamdia*, principalmente em *Rhamdia quelen*, por esse motivo sua sistemática permanece confusa, sendo que o monofiletismo do gênero ainda não pode ser confirmado, e *R. quelen* tem sido considerada um complexo de espécies (PERDICES et al., 2002).

1.2 O gênero *Rhamdia*: aspectos citogenéticos

Dentre as 17 espécies de *Rhamdia* apenas sete possuem dados citogenéticos: *R. branneri*, *R. hilarii*, *R. laticauda*, *R. quelen*, *R. sapo*, *Rhamdia* sp. e *R. voulezi* (Tabela

1). Dentre as espécies analisadas destaca-se o fato de *Rhamdia quelen* possuir um maior número de estudos morfológicos e citogenéticos.

Todas as espécies de *Rhamdia* estudadas, até o momento, possuem 58 cromossomos e variações nas fórmulas cariotípicas tanto entre espécies quanto entre diferentes populações da mesma espécie (Tabela 1).

É característica do gênero a presença de cromossomos supranumerários ou Bs, que são cromossomos adicionais ao complemento cromossômico normal, possuem um comportamento irregular no processo de meiose, seguindo um padrão não mendeliano, com taxas de transmissão mais elevadas do que os cromossomos do complemento A; e sua origem, frequência e evolução ainda não foram totalmente estabelecidas (CAMACHO et al., 2000). Em *Rhamdia*, esses cromossomos variam intra e interindividualmente, podendo ser de tamanho médio, pequeno ou microcromossomos, mas o mais freqüente são os de tamanho médio (STIVARI e MARTINS-SANTOS, 2004; SWARÇA et al., 2003; MORAES et al., 2009). Eles podem ser total ou parcialmente heterocromáticos ou, até mesmo, eucromáticos (ABUCARMA e MARTINS-SANTOS, 2001; MORAES et al., 2007; MORAES et al., 2009).

Existem vários casos de poliplóides reportados nos vertebrados inferiores e, em peixes Neotropicais, a triploidia é a única forma de poliploidia natural evidenciada até o momento (CENTOFANTE et al., 2001). Em *Rhamdia quelen* indivíduos triplóides foram evidenciados em duas populações, a do Ribeirão Lindóia e da Lagoa da Usina Hidrelétrica do Ney Braga (TSUDA et al., 2010; SILVA et al., 2011, respectivamente) e em *Rhamdia* sp. do Ribeirão Grande (GARCIA et al., 2003). A fertilização de um oócito diplóide por um espermatozóide haplóide, combinada com possíveis choques

térmicos, tem sido considerada a origem mais provável para estes indivíduos triplóides (CUELLAR e UYENO, 1972).

No gênero *Rhamdia* a região organizadora de nucléolos (RONs), geralmente ocorre na região terminal do braço curto de um par de cromossomos subtelocêntricos, caracterizando um sistema simples (MORAES et al., 2010; GARCIA et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011).

Borba et al. (2012) analisando diferentes populações de *Rhamdia quelen*, observaram diferentes padrões de distribuição das RONs, sendo que o par portador varia do cromossomo 18 a 27 (sm e st), sendo predominantemente no braço curto contudo, foi também observado em posição intersticial e terminal do braço longo. Segundo os autores, a ocorrência de muitos citótipos de NOR é devido à ocorrência de diferentes eventos sucessivos como deleções e inversões, que não alteram o número diplóide. Provavelmente, a RON estava, no início, em posição terminal de um par cromossômico submetacêntrico e eventos de deleção poderiam ter originado um subtelocêntrico, permanecendo a RON em posição terminal; sucessivos eventos de inversão poderiam ter mudado a posição da RON para a região intersticial do braço longo de um par submetacêntrico.

O sistema múltiplo de RONs é raro no gênero, sendo evidenciado em duas espécies de *Rhamdia*: *R. brannei* (ABUCARMA e MARTINS-SANTOS, 2001) e *Rhamdia* sp (ANDRADE et al., 1998; ABUCARMA e MARTINS-SANTOS, 2001). As RONs, em *Rhamdia*, mostram-se fluorescentes quando coradas com fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃), demonstrando que são ricas em pares de base GC, sendo que nenhuma outra região apresenta afinidade por esse corante (FENOCCHIO et al., 2002; GARCIA et al., 2003; MORAES et al., 2007).

Análises sobre sequências de DNA repetitivo só foram evidenciadas em *Rhamdia quelen* e *Rhamdia* sp. (Tabela 2), sendo estes estudos restritos à localização de sítios de DNAr 18S, que confirmam o padrão de RON simples neste grupo de peixes e de DNAr 5S, cuja distribuição pode ser observada em um par cromossômico submetacêntrico ou subtelocêntrico na região pericentromérica (GARCIA et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011).

Tabela 1 – Dados cariotípicos no gênero *Rhamdia*. 2n=número diplóide; Bs= cromossomo supranumerário; NF=número fundamental; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório; US=usina; Ar= Argentina; BR= Brasil; EUA= Estados Unidos da América; MG=Minas Gerais; MS= Mato Grosso do Sul; PR=Paraná; SC= Santa Catarina; SP=São Paulo; RJ= Rio de Janeiro.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	Bs	NF	Referência
<i>R. branneri</i> .	Us. Salto Segredo –	58	36m+14sm+4st+4a	0-2	112	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>R. hilarii</i>	R. Iguaçú/PR	58	36m+18sm+8a	-	116	
	R. Onça/SP					Toledo e Ferrari (1976)
<i>R. hilarii</i>	Monjolinho/SP	58	-	0-5	>100	Fenocchio e Bertollo (1990)
<i>Rhamdia cf. hilarii</i>	Rv. Jurumirim/SP; Rb. Quinta/SP; Rb. Jacutinga/SP; Rb. Hortelã/SP; R. Araquá/SP; R. Pardo/SP	58	30m+18sm+10st	0-3	106	Vissotto et al., (1999a)
<i>R. hilarii</i>	Rv. Lobo/SP	58	-	0-3	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. hilarii</i>	Rv. “29”/SP	58	-	0-5	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	-	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. São Francisco/MG	58	-	2	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	-	-	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. hilarii</i>	R. Mogi-guaçu/SP	58	58m/SM	0-2	116	Maistro et al., (2002)
<i>R. hilarii</i>	R. Aguapey/Ar	58	26m+16sm+8st+8 ^a	-	108	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	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Sangão – Cascavel/PR	58	32m+8sm+12st+6 ^a	0-1	110	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Angra dos Reis/RJ	58	40m+10sm+8st	-	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	R. São José /RJ	58	36m+14sm+8st	0-1	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Paraíba do Sul/RJ	58	36m+14sm+8st	0-1	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Araras/SP	58	40m+10sm+8st	0-5	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Capivra-Botucatu/SP	58	44m+12sm+2st	0-1	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Colina/SP	58	36m+10sm+12st	0-5	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Guapiara/SP	58	36m+10sm+12st	-	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Iguapé/SP	58	36m+10sm+12st	-	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	R. Passa Cinco – Ipeúna/SP	58	34m+16sm+8st	0-4	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Fortuna – Mariápolis/SP	58	40m+10sm+8st	0-1	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Piquete/SP	58	40m+10sm+8st	0-2	116	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Sto. Antônio do Pinhal/SP	58	30m+14sm+12st+2a	0-2	114	Garcia et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Lg. dos Quadros/RS	58	52m/sm/st+6 ^a	0-2	110	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>R. quelen</i>	R. Guaíba/RS	58	52m/sm/st+6 ^a	0-2	110	Hochberg e Erdtmann (1988)

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	Bs	NF	Referência
<i>R. quelen</i>	R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	4	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/SC	58	-	0-1	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	-	-	~108	Fenocchio et al., (2000)
<i>R. quelen</i>	R. Paraná/Ar	58	26m+16sm+8st+8 ^a	-	108	Fenocchio et al., (2003a)
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4 ^a	0-1	108	Fenocchio et al., (2003b)
<i>R. quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4 ^a	-	116	Swarça et al., (2003b)
<i>R. quelen</i>	R. Taquarussu/PR	58	26m+20sm+6st+6 ^a	1-4	110	Stivari e Martins-Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	Rb. Maringá/PR	58	26m+22sm+6st+4a/ 26m+24sm+8st	-	110	Stivari e Martins-Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	58	30m+14sm+10st+4a	-	112	Tsuda et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	3n=87	45m+21sm+15st+6a	-	168	Tsuda et al., (2010)
<i>R. quelen</i>	Cg. Caetano/MG	58	-	-	-	Silva e Morelli (2005)
<i>R. quelen</i>	Serra da Bodoquena,/MS	58	36m+16sm+6st	0-3	116	Moraes et al., (2007)
<i>R. quelen</i>	Água dos Patos/SP	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Moraes et al., (2009)
<i>R. quelen</i>	Água das Pedras/PR	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Moraes et al., (2009)
<i>R. quelen</i>	Taquari/PR	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Moraes et al., (2009)
<i>R. quelen</i>	FUNPIVI/SC	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Moraes et al., (2009)
<i>R. quelen</i>	Mogi-Guaçu	58	11m+18sm+12st+6a	-	-	Martinez et al., (2011)
<i>R. quelen</i>	Araguaia	58	18m+18sm+14st+8a	1-5	-	Martinez et al., (2011)
<i>R. quelen</i>	Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	58	38m/sm+14st+6 ^a	-	110	Silva et al., (2011)
<i>R. quelen</i>	Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	3n=87	57m/sm+21st+9 ^a	-	-	Silva et al. (2011)
<i>R. quelen</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	32m+18sm+8st	2	116	Borba et al., (2011)
<i>R. quelen</i>	R. Paraná	58	46m/sm +12st	-	116	Coles et al., (2013)
<i>R. quelen</i>	R. Paraguai	58	46m/sm +12st	-	116	Coles et al., (2013)
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires/Ar	58	44 m/sm + 14st/a	0-1	-	Valcarcel et al., (1993)
<i>Rhamdia</i> sp.	EUA	58	-	-	100±4	Le Grande (1981)
<i>Rhamdia</i> sp.	Us. Salto Segredo– R. Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4 ^a	0-2	112	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>Rhamdia</i> sp.	Rb. Grande	58	46m/sm+12st/a	0-4	-	Garcia et al., (2003)
<i>Rhamdia</i> sp.	Rb. Grande/SP	3n=87	69m/sm+18st/a	-	-	Garcia et al., (2003)
<i>R. voulezi</i>	Us. Salto Segredo – R. Iguaçu/PR	58	36m+14sm+4st+4 ^a	0-2	112	Abucarma e Martins-Santos (2001)

• Dados compilados de Moraes-Manécolo (2014) com atualizações.

1.3 Mapeamento de DNAs repetitivos em Heptapteridae: localização de DNAs ribossomais 18S e 5S

O DNA repetitivo compreende segmentos de DNA de diferentes tamanhos, que se repetem de dezenas a milhões de vezes no genoma e compõem uma grande parcela do genoma dos eucariotos (TAFT et al., 2007), podendo ser dividido em moderadamente repetitivo com 10 a 10^5 cópias por genoma e sequências altamente repetitivas com mais de 10^5 por genoma.

Por muitos anos, o DNA repetitivo foi considerado como um “DNA lixo” (DOOLITTLE e SAPIENZA, 1980), entretanto, este tipo de DNA pode estar envolvido em rearranjos cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsável por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (KIDWELL, 2002). O mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos tem se mostrado um marcador citogenético muito importante no grupo dos peixes, podendo auxiliar na compreensão de problemas taxonômicos (BLANCO et al., 2011), filogenéticos (TEIXEIRA et al., 2009), diferenciações populacionais (MARTINEZ et al., 2011), evolução de cromossomos sexuais (VICARI et al., 2008) e de cromossomos B (SILVA et al., 2014).

Uma família multigênica, é um tipo de DNA moderadamente repetitivo, que compreende um grupo de genes todos descendentes de um ancestral comum, que tem sequências similares e estão relacionados funcionalmente (NEI e ROONEY, 2005). São sequências repetidas de DNA, que codificam importantes moléculas como os RNAs ribossomais (RNAr) (MARTINS, 2007), histonas (CHILDS et al. 1981) e pequenos DNAs nucleares (UDNAsn) (VALADKHAN, 2005). Eventos de duplicação durante a evolução podem ser responsáveis pela formação das famílias multigênicas, e que as

diferenças observadas entre esses genes são causadas por acúmulo de mutações ocorridas ao longo do tempo. A presença de pseudogenes é uma característica comum nas famílias multigênicas, estes possuem grande semelhança com os genes funcionais da mesma família, mas perderam sua capacidade de expressão devido a mutações adquiridas (FARAH, 2007).

Os RNAs ribossômicos são os mais abundantes RNAs na célula eucariótica (MARTINS e WASKO, 2004), que podem ser divididos em duas famílias multigênicas, repetidas em tandem: a primeira representada pelo DNAr 45S, que compreende as regiões que transcrevem os genes RNAs 28S, 18S e 5,8S, além de espaçadores intergênicos; e a segunda, DNAr 5S, consiste de uma sequência altamente conservada de 120 pares de base e espaçadores não transcritos (NTS) de tamanho variável (MARTINS, 2007). Os quatro genes de RNAr em eucariotos são transcritos por duas RNAs polimerase distintas: os genes do DNAr 45S pela polimerase I e o gene de DNAr 5S pela polimerase III (MARTINS e WASKO, 2004).

Os dados compilados na tabela 2 evidenciam que, atualmente, apenas quatro dos 26 gêneros da família Heptapteridae (15,4%) e apenas 7,2% das suas 208 espécies, apresentam algum dado sobre as sequências de DNAr 18S ou 5S, evidenciando que este grupo de peixes tem muito para ser explorado do ponto de vista citogenético.

A hibridação *in situ* (FISH) com DNAr 18S realizada nas diferentes espécies de Heptapteridae revela, com exatidão, um padrão simples de cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo, que é o mais predominante no grupo, sendo que das 15 espécies analisadas de diferentes populações, somente *Pimelodella* sp. apresentou um sistema de RONS múltiplas, confirmado pela sonda de DNAr 18S (Tabela 2). Duas espécies de *Rhamdia*: *R. branneri* (ABUCARMA e MARTINS-SANTOS, 2001) e duas populações de *Rhamdia* sp. (ANDRADE et al., 1998; ABUCARMA e MARTINS-

SANTOS, 2001), mostraram NORs múltiplas, por meio da impregnação de nitrato de prata entretanto, não foi realizada uma análise de FISH com a sonda de DNAr 18S para confirmação deste sistema.

Em relação à utilização da sonda de DNAr 5S, esta sequência mostra-se mais heterogênea entre os gêneros e espécies da família Heptapteridae. O gênero *Imparfinis* demonstra uma predominância de sítios ribossomais 5S múltiplos para as espécies analisadas, exceto uma população de *Imparfinis schubarti* analisada por KanteK et al. (2009). No gênero *Pimelodella* existem espécies tanto com um padrão simples quanto múltiplo deste tipo de DNA repetitivo, caracterizando uma variabilidade interespecífica na localização deste sítio ribossomal (Tabela 2). *Rhamdia* é o gênero que apresenta o maior número de estudos com sonda de DNAr 5S (Tabela 2), sendo o sistema simples característico no grupo, onde a única exceção é a população de *Rhamdia quelen* do rio Fortuna- SP (Tabela 2).

A sintonia entre os genes ribossomais 18S e 5S em peixes não é um evento muito comum e este padrão não é alterado dentro da família Heptapteridae, onde somente o gênero *Imparfinis* apresenta espécies com esta característica: *I. mirini*, *I. minutus* (FERREIRA et al., 2014) e *I. schubarti* (KANTEK et al., 2009). Segundo Ferreira et al. (2014), a sintonia entre estes dois sítios ribossomais é considerada uma apomorfia para a família, e parece ser um caráter plesiomórfico para o gênero *Imparfinis* entretanto, este padrão só pode ser confirmado com o aumento no número de estudos dessa natureza, uma vez que poucas das análises apresentaram double FISH com estas sondas.

O mapeamento cromossômico, por hibridação in situ com fluorescência (FISH), dos DNAs ribossomais DNAr 5S e 18S, vem sendo realizado com grande frequência em estudos citogenéticos de peixes, mostrando ser um importante marcador cromossômico, uma vez que sua localização pode diferir entre espécies, assim como

entre populações da mesma espécie, podendo estar em um único par cromossômico, vários pares, em sintenia entre eles e com outros DNAs repetitivos (TRALDI et al., 2013; PANSONATO-ALVES et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Na família Heptapteridae os estudos com estas sequências de DNAs ribossomais são restritos, principalmente, a três gêneros: *Imparfinis*, *Pimelodella* e *Rhamdia*. Comparado com a grande diversidade deste grupo, se faz necessária a realização de mais análises sobre estes DNAs repetitivos em outros gêneros e espécies de heptapterídeos, bem como a detecção simultânea destas sondas, podendo assim revelar um cenário mais diversificado dentro da família.

Tabela 2 –Dados de DNAr 18S e 5S na família Heptapteridae. 2n=número diplóide; FISH= hibridização in situ ; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório;GO=Goiás;MG=Minas Gerais;PR= Paraná;RJ=Rio de Janeiro;RS= Rio Grande do Sul; SP=São Paulo.

Família /Espécie	Localidade	2n	FISH 18S	FISH 5S	Referência
Heptapteridae					
<i>Imparfinis minutus</i>	Ribeirão Jacuí-SP	58	Simple	Múltiplo	Ferreira et al., (2014)
<i>Imparfinis mirini</i>	Rb. Jacutinga/ PR	58	Simple	-	Gouveia et al., (2013)
<i>Imparfinis mirini</i>	Rio Paraitinga-SP	58	Simple	Múltiplo	Ferreira et al., (2014)
<i>Imparfinis mirini</i>	Rio Araras- SP	58	Simple	Múltiplo	Ferreira et al., (2014)
<i>Imparfinis mirini</i>	Rio Ipero´-SP	58	Simple	Múltiplo	Ferreira et al., (2014)
<i>Imparfinis mirini</i>	Rio Passa Cinco-SP	58	Simple	Múltiplo	Ferreira et al., (2014)
<i>Imparfinis mirini</i>	Rio Pilar do Sul-SP	58	Simple	Múltiplo	Ferreira et al., (2014)
<i>Imparfinis schubarti</i>	Drenagem Piumhi/MG	58	Simple	Simple	Kantek et al., (2009)
<i>Imparfinis schubarti</i>	Rb. Três Bocas/PR	58	Simple	-	Gouveia et al., (2013)
<i>Imparfinis schubarti</i>	Rio Laranjinha/PR	58	Simple	-	Gouveia et al., (2013)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb.Marrequinhas/ PR	58	Simple	-	Stolf et al., (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	Rb Três Bocas/ PR	58	Simple	-	Stolf et al., (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R. Água da Floresta/PR	58	Simple	-	Stolf et al., (2004)
<i>Almparfinis aff. schubarti</i>	R.Vinícius/PR	58	Simple	-	Stolf et al., (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R. Taquari/PR	58	Simple	-	Stolf et al., (2004)
<i>Imparfinis aff. schubarti</i>	R.Jataizinho/PR	58	Simple	-	Stolf et al., (2004)
<i>Imparfinis cf. schubarti</i>	Rib. da Bacia do Alto Paraná	58	Simple	-	Borba et al., (2011)
<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	Simple	-	Borba et al., (2011)
<i>Pimelodella aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	Simple	-	Swarça et al., (2003a)
<i>Pimelodella boschmai</i>	Mogi-Guaçu Araras/SP	46	Simple	Simple	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella gracialis</i>	Paraná Mariápolis/SP	46	Simple	Múltiplo	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Paraíba do Sul Angra/RJ	58	Simple	Simple	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella laurenti</i>	Cordisburgo/MG	46	Simple	-	Dazzani et al., 2012
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Limoeiro/PR	46	Simple	-	Vidotto et al., (2004)
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Couro de Boi/PR	46	Simple	-	Vidotto et al., (2004)
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Gabriel da Cunha/PR	46	Simple	-	Vidotto et al., (2004)
<i>Pimelodella meeki</i>	São Miguel Arcanjo/SP	46	Simple	Simple	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella meeki</i>	Pilar doSul/SP	46	Simple	Simple	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella meeki</i>	Rb. Jacutinga/PR	46	Simple	-	Gouveia et al., (2013)
<i>Pimelodella meeki</i>	Rib. da Bacia do Alto Paraná	46	Simple	-	Borba et al., (2011)
<i>Pimelodella sp.</i>	Pardo Cardoso/SP	46	Multiplo	Múltiplo	Garcia; Almeida- Toledo (2010)
<i>Pimelodella sp.</i>	Botucatu/SP	46	Simple	Múltiplo	Dazzani et al., 2012
<i>Pimelodella sp.</i>	Colina/SP	46	Simple	Simple	Dazzani et al., 2012
<i>Pimelodella sp.</i>	Guapiara/SP	46	Simple	Simple	Dazzani et al., 2012
<i>Pimelodella sp.</i>	Pirassununga/SP	46	Simple	Simple	Dazzani et al., 2012
<i>Pimelodella spelaea</i>	S. Domingos/GO	46	Simple	Múltiplo	Dazzani et al., 2012
<i>Rhamdia quelen</i>	Lg. dos Quadros/RS	58	Simple	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>Rhamdia quelen</i>	R.Guaíba/RS	58	Simple	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>Rhamdia quelen</i>	R. Iguaçu/PR	58	Simple	-	Fenocchio et al., (2003b)
<i>Rhamdia quelen</i>	FUNPIVI/SC	58	Simple	-	Moraes et al., (2009,2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Sangão – Cascavel/PR	58	Simple	Simple	Garcia et al., (2010)

Tabela 2 –Dados de DNAr 18S e 5S na família Heptapteridae. 2n=número diplóide; FISH= hibridização in situ ; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório;GO=Goiás;MG=Minas Gerais;PR= Paraná;RJ=Rio de Janeiro;RS= Rio Grande do Sul; SP=São Paulo.

Família /Espécie	Localidade	2n	FISH 18S	FISH 5S	Referência
<i>Rhamdia quelen</i>	R. Oeste – Cascavel/PR	58	Simples	Simples	Garcia et al.,(2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Angra dos Reis/RJ	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	R. São José /RJ	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	R. Paraíba do Sul/RJ	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Araras/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	R. Capivra- Botucatu/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Colina/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Guapiara/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Iguapé/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	R. Passa Cinco – Ipeúna/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Fortuna – Mariápolis/SP	58	Simples	Múltiplo	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Piquete/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Sto. Antônio do Pinhal/SP	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Rb. Lindóia/PR	3n=87	Simples	Simples	Tsuda et al., (2010)
<i>Rhamdia quelen</i>	Mogi-Guaçu	58	Simples	Simples	Martinez et al., (2011)
<i>Rhamdia quelen</i>	Araguaia	58	Simples	Simples	Martinez et al., (2011)
<i>Rhamdia quelen</i>	Lg.da Usina Elétrica Ney Braga/PR	58	Simples	Simples	Silva et al., (2011)
<i>Rhamdia quelen</i>	Lg.da Usina Elétrica Ney Braga/PR	3n=87	Simples	Simples	Silva et al., (2011)
<i>Rhamdia quelen</i>	Rib.da Bacia do Alto Paraná	58	Simples	Simples	Borba et al., (2012)
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Paraná	58	Simples	Simples	Coles et al., (2013)
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Paraguay	58	Simples	Simples	Coles et al., (2013)
<i>Rhamdia sp.</i>	Rb. Grande	58	Simples	Simples	Garcia et al., (2003)
<i>Rhamdia sp.</i>	Rb. Grande/SP	3n=87	Simples	Simples	Garcia et al., (2003)

1.4 Pequenos DNAs nucleares (DNAsn): um novo marcador citogenético

Os pequenos DNAs nucleares pertencem a uma família multigênica de RNAs não codificantes, que compõem o spliceossomo, grandes complexos de ribonucleoproteínas que realiza o *splicing*, sendo a maior e mais complicada maquinaria celular conhecida (VALADKHAN, 2005). A remoção dos íntrons do pré-RNA (splicing), é uma etapa crucial e onipresente na expressão genética dos eucariotos. Quase todos os transcritos primários sofrem múltiplos eventos de splicing e splicing alternativo. Os RNAs nucleares pequenos (RNAsn) são componentes de um complexo de pequenas ribonucleoproteínas (RNPsn) (MANCHADO et al., 2006), podendo ser subdivididos em 5 tipos: U1, U2, U4, U5 e U6 (VALADKHAN, 2005). A maioria dos RNAsn são transcritos pela polimerase II, exceto o U6 RNAsn que é transcrito pela polimerase III (McNAMARA-SCHROEDER et al., 2001).

A utilização destas sequências na citogenética de peixes teve início recentemente com Úbeda-Manzanaro et al. (2010) que analisaram quatro espécies da família Batrachoididae. Nestas espécies a sequência de RNAsn U2 apresentou-se de forma levemente distinta: em *Amphichthys cryptocentrus* foi dispersa e abundante; em *Batrachoides manglae* também foi dispersa e abundante em todos os cromossomos, mas um sinal mais forte foi visto em um par cromossômico. Em *Porichthys plectrodon* a hibridização desta sequência foi dispersa, mas menos do que em *A. cryptocentrus*. O padrão mais distinto foi observado em *Thalassophryne maculosa* onde um sinal forte de hibridização da sonda de U2 RNAsn foi observado no braço longo de um par cromossômico, sendo que neste mesmo cromossomo está co-localizado o DNAr 18S. Um Double FISH com as sondas de DNAr 5S e U2 DNAsn também foi realizada em *Batrachoides manglae*, e mostrou que estes genes não estão co-localizados.

Merlo et al. (2010) analisaram duas espécies: *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* e o híbrido destas espécies, *Dicentrarchus labrax* (♀) x *Dicentrarchus punctatus* (♂) e utilizaram sondas de DNAr 18S, 5S e RNAsn U2. Nas duas espécies e no híbrido um par portador s cístrons de DNAsn U2 foi observado, sendo que as três sequências utilizadas apresentaram-se em cromossomos distintos.

Uma espécie da família Haemulidae, *Plectorhinchus mediterraneus*, foi analisada por Merlo et al. (2012a), utilizando DNAr 18S e 5S e RNAsn U2 e U5. As duas últimas sondas foram isoladas juntas, portanto estão ligadas e foram observadas em um par cromossômico médio na posição subcentromérica. Nenhuma das outras sondas apresentaram-se co-localizadas

Merlo et al. (2012b) analisaram *Halobatrachus didactylus*, da família Batrachoididae, e realizaram Double FISH com DNAsn U2 e outros três DNAs repetitivos, DNAr 18 e 5s e (GATA)_n, a fim de observar uma possível co-localização. A sonda de DNAsn U2 foi localizada no meio do braço longo de um par cromossômico médio submeta/subtelocêntrico, e nenhuma co-localização desta sequência com as outras foi detectada.

A sonda de DNAsn U1 foi analisada em 12 espécies da família Cichlidae por Cabral de Melo et al. (2012) e todas as espécies estudadas apresentaram pequenos sítios em um par de homólogos, na posição terminal, intersticial ou proximal. As espécies africanas apresentaram esta sequência na região terminal do braço longo de um par subtelo/acrocêntrico. Em *Etroplus maculatus*, uma espécie asiática, esta sequência ocupa a região intersticial do braço longo de um pequeno subtelo/acrocêntrico. Nas espécies da América do sul um padrão mais variado foi observado: em *Retroculus lapidifer*, *Cichlakelberi*, *Biotodoma cupido*, *Aequidens tetramerus*, *Heros efasciatus*, *Geophagus brasiliensis*, *G. proximus* e *Satanoperca jurupari* o cístron está no braço

longo de um par subtelo/acrocêntrico, sendo localizado na região terminal nas cinco primeiras espécies, intersticial em *Geophagus brasiliensis* e proximal nas últimas duas espécies. Em *Astronotus ocellatus* e *Mesonauta festivus* o gene de RNAsn U1 está localizado na região terminal de um par meta/submetacêntrico, em *A. ocellatus* no braço longo e em *M. festivus* no braço curto (CABRAL DE MELO et al.,2012).

Em 2013, Supiwong e colaboradores caracterizaram citogeneticamente *Mystus bocourti*, Bagridae, com nove classes de DNA repetitivos, incluindo DNAr 5S e 18S, RNAsn U2, microsatellites(CA)15 e (GA)15, repetições teloméricas e retrotransposons (Rex 1, 3 e 6). O gene de RNAsn U2 foi localizado no braço curto de um par submetacêntrico, e na double FISH desta sequência com DNAr 5S não foi observada nenhuma co-localização.

O trabalho mais recente utilizando este novo marcador citogenético, foi realizado por Utsonomia et al. (2014) em seis espécies de *Gymnotus* e a distribuição de DNAsn U2 foi observada em um único par cromossômico, com exceção de *G. pantanal* que apresentou sinal em 12 cromossomos acrocêntricos nas fêmeas e em 11 nos machos, diferença esta devida a ocorrência de cromossomos sexuais nesta espécie. A detecção simultânea com sonda de DNAr 5S revelou que estas sequências não estão co-localizadas em nenhuma das espécies analisadas, mesmo em *G. inaequilabiatus* que apresentou vários sítios de DNAr 5S.

A maioria dos estudos relatados acima, propõe uma tendência evolutiva de que os sítios de DNAsn se acumulem em um único par cromossômico. Um cenário mais diversificado para a distribuição desta sequência só foi reportado, até o momento, por Ubeda-Manzanaro et al. (2010), que observaram três padrões distintos em espécies de Batrachoididae: a sequência compartimentalizada em um único par; bem distribuída em todos os cromossomos e os dois padrões simultâneos. Um outro padrão de distribuição

foi evidenciado por Utsunomia et al.(2014b) em *Gymnotus pantanal*, onde mais de um par cromossômico apresentou blocos com esta sequência.

Na maioria dos trabalhos com esta sequência foram realizadas hibridizações simultâneas com outros DNAs repetitivos e o único caso em que foi observada uma co-localização, foi em *Thalassophryne maculosa*, com o DNAr 18S (ÚBEDA-MANZANARO et al. 2010). É claro que, a cada análise, novas contribuições sobre a distribuição desta sequência vão se somando e uma real proposta evolutiva para sua localização cromossômica em peixes poderá ser estabelecida.

2. Objetivos: geral e específicos

O presente estudo tem por objetivo geral a análise de diferentes sequências de DNA repetitivo em diferentes populações de *Rhamdia quelen*, visando melhor compreender sua estrutura genética e evolução cariotípica e contribuir para elucidar problemas taxonômicos.

Os objetivos específicos são:

- Estabelecer número diplóide, fórmula cariotípica e localização das Ag-RONs em diferentes populações de *Rhamdia quelen*
- Identificar regiões cromossômicas ricas em pares de bases AT e GC
- Localizar sítios de DNAs ribossômicos 5S e 18S e de DNAsn U2
- Comparar os dados obtidos com a literatura, procurando compreender melhor a organização e evolução cariotípica deste complexo de espécies, assim como seu padrão taxonômico.

3. Material e Locais de coleta

No presente estudo foram analisadas seis populações de *Rhamdia quelen* coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paraná e da bacia do rio Paraguai. (Tabela 3 ; Figura1).

Os rios Paraguai e Paraná formam um dos mais extensos e relevantes eixos continentais de integração política, social e econômica da América do Sul. Englobam regiões de cinco países: Brasil, Bolívia, Argentina, Paraguai e Uruguai. Estes dois rios formam o eixo de 3.442 quilômetros que liga o meio do continente ao oceano Atlântico (AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTES AQUAVIÁRIOS 2013).

A bacia do rio Paraguai, que é um típico rio de planície e tem como característica uma excelente regularidade de seu regime hídrico, pode ser dividido nos seguintes trechos: Paraguai Superior e Alto Paraguai, que percorrem o Brasil e suas fronteiras; Médio Paraguai e Paraguai Inferior, que são trechos fora do país. O Paraguai Superior inicia nas cabeceiras do rio e vai até Cáceres, porém não é um trecho navegável e é o único que não faz parte da hidrovia. O Alto Paraguai é o trecho situado entre Cáceres e a foz do Rio Apa, podendo ser dividido em dois subtrechos: Cáceres a Corumbá e Corumbá à foz do Rio Apa. O Médio Paraguai, por sua vez, representa o trecho compreendido entre a foz do Rio Apa e Assunção. O Paraguai Inferior, finalmente, compreende o trecho entre Assunção e a confluência com o Rio Paraná (AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTES AQUAVIÁRIOS 2013).

A Bacia do Paraná é uma ampla região sedimentar do continente sul-americano que inclui porções territoriais do Brasil meridional, Paraguai oriental, nordeste da Argentina e norte do Uruguai, totalizando uma área que se aproxima dos 1,5 milhão de quilômetros quadrados (MILANI et al., 2007). Composta por 16 bacias hidrográficas menores: Bacia Litorânea, Bacia do Ribeira, Bacia do Cinzas, Bacia do Iguazu, Bacias

do Paraná 1, 2 e 3, Bacia do Tibagi, Bacia do Ivaí, Bacia do Piquiri, Bacia do Pirapó, Bacia do Itararé, Bacias do Paranapanema 1, 2, 3 e 4 (MILANI et al., 2007).

Tabela 3–Locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares de *Rhamdia quelen* analisados. MS= Mato Grosso do Sul; PR= Paraná

Locais de coleta	Bacia	Nº de indivíduos
Rio Miranda-MS 19°31'24.96"S/57°02'25.51"W	Rio Alto Paraguai – Rio Paraguai	3♂,3♀
Rio Quexada –PR 23°56'9.65"S/51°39'26.08"W	Rio Ivaí – Rio Paraná	5♂,4♀,4?
Rib. Penacho - PR 23°22'54.3"S/50°19'75.5"W	Rio das Cinzas- Rio Paraná	1♂,1♀
Rio Taquari -PR 23°10'45.2"S/50°56'30.9"W	Rio Tibagi - Rio Paraná	10♂,3♀
Rib. Lindóia -PR 23°16'24.24"S/51°8'21.55"W	Rio Tibagi - Rio Paraná	4♂,4♀,1?
Rio Cambé-PR 23°17'8.28" S/51°16'67.7"W	Rio Tibagi - Rio Paraná	5♂,4♀
Total de indivíduos: 52		

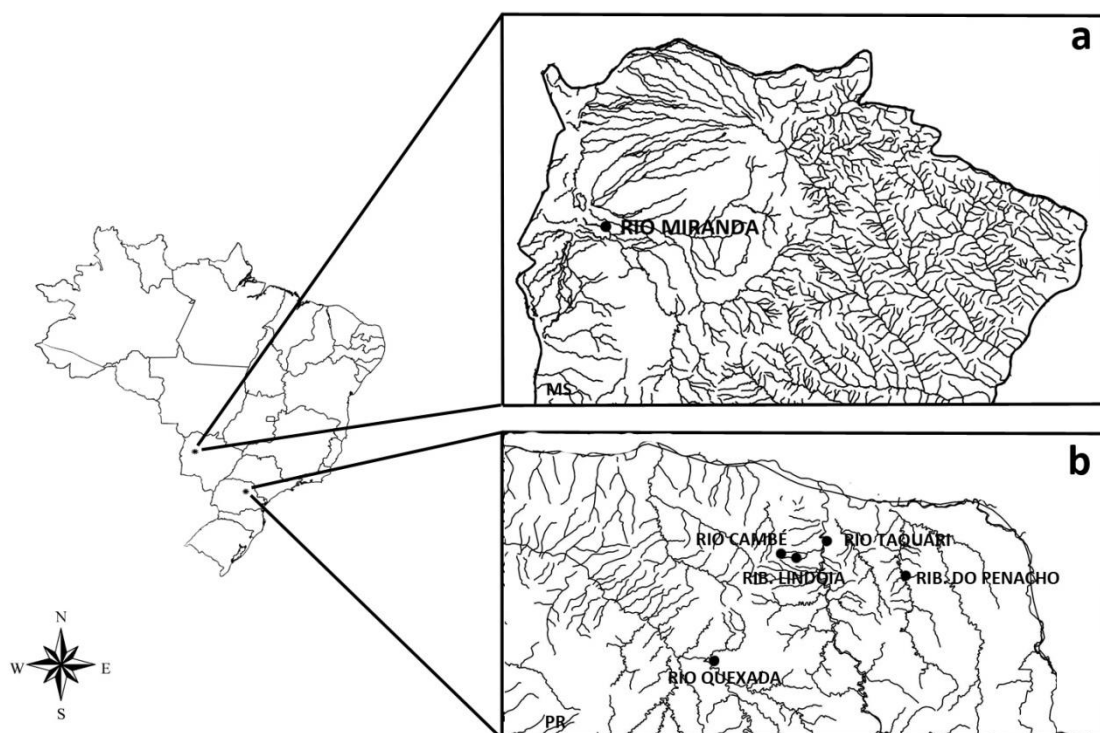


Figura 1- Mapa do Brasil: locais de coleta: (a) bacia do rio Alto Paraguai: rio Miranda (MS); (b) bacia rio Paraná: rio Quexada (PR), ribeirão do Penacho (PR), rio Taquari (PR), ribeirão Lindóia (PR), rio Cambé (PR).

CAPÍTULO I

Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de RNAsn U2 em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)

*Este artigo será submetido à publicação na revista Genetica

Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de RNAsn U2 em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)

Mariana Campaner Usso, Angélica Rossotti dos Santos, Juceli Gonzalez Gouveia, Cristian Araya-Jaime, Fausto Foresti, Lucia Giuliano Caetano, Ana Lúcia Dias

Mariana Campaner Usso, Angélica Rossotti dos Santos, Juceli Gouveia Gonzales, Lucia Giuliano Caetano, Ana Lúcia Dias
Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil.

Cristian Araya-Jaime, Fausto Foresti
Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-970, Botucatu, SP, Brasil

Resumo

Grande parte do genoma eucarioto é composto por DNA repetitivo, incluindo famílias multigênicas como DNA ribossômico, histonas e UDNA_{sn}. Análises dessas sequências podem auxiliar na compreensão de problemas taxonômicos e filogenéticos em diferentes grupos de peixes, embora esses estudos ainda sejam escassos neste grupo. Diante disso, seis populações de *Rhamdia quelen*, considerada um complexo de espécies, foram analisadas, confirmando o número diplóide igual 58, a presença de variação nas fórmulas cariotípicas e AgRON simples rica em bases GC. Além disso, foi realizado um mapeamento cromossômico de genes ribossomais 18S e 5S e de DNAs_n U2. Os resultados mostraram diferentes padrões de distribuição desta última sequência entre as populações, sendo que apenas a do rio Miranda apresentou um padrão simples. A distribuição dos genes de DNAr 18S confirmaram o padrão simples da RON, estando co-localizados com alguns sítios de U2 DNAs_n. Foi evidenciado um padrão simples de distribuição do DNAr 5S, exceto na população do rio Miranda. Os resultados demonstram, de um modo geral, a evolução cromossômica conservativa de *Rhamdia quelen*, mas com uma distribuição diferencial de alguns marcadores nas diferentes populações, como na população do rio Miranda, confirmando essas famílias de DNA repetitivos como importantes ferramentas em estudos filogenéticos e taxonômicos.

Palavras-chaves: Citogenética de peixes, complexo de espécies, família multigênica, FISH.

Introdução

O DNA repetitivo compreende segmentos de DNA de diferentes tamanhos, que se repetem de dezenas a milhões de vezes no genoma e compõem uma grande parcela do genoma dos eucariotos (Taft et al. 2007). Essas sequências incluem famílias multigênicas, satélites, microssatélites e elementos transponíveis (Jurka et al. 2005). O mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos pode auxiliar na compreensão de problemas taxonômicos (Blanco et al. 2011), filogenéticos (Teixeira et al. 2009), diferenciações populacionais (Martinez et al. 2011), evolução de cromossomos sexuais (Vicari et al. 2008) e de cromossomos B (Vicari et al. 2011; Silva et al. 2014).

Os RNAs ribossômicos são os mais abundantes RNAs na célula eucariótica e estão organizados em famílias multigênicas (Martins e Wasko 2004). São organizados em duas famílias distintas denominadas DNAs ribossomais (DNAr) 45S e 5S, sendo que 45S compreende os genes codificantes do RNAr 18S, 5.8S e 26-28S (Long e Dawid 1980). Em peixes, a maioria dos estudos se concentram nesta classe de DNA repetitivo (Kavalco et al. 2005; Rosa et al. 2006; Garcia et al. 2010; Mendes et al. 2011; Bitencourt et al. 2012; Traldi et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2013; Silva et al. 2014) e ainda são poucos os estudos em relação aos elementos transponíveis e histonas no genoma de peixes, mas estes dados vem aumentando nos últimos anos (Hashimoto et al. 2011; Hashimoto et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2013; Silva et al. 2014).

Os U DNAsn são uma família multigenica de RNAs não codificantes que compõem o spliceosomo, ribonucleoproteína responsável pelo processo de splicing dos precursores do RNAm, podendo ser subdivididos em 5 tipos: U1, U2, U4, U5 e U6 (Valadkhan 2005). A maioria dos RNAsn são transcritos pela polimerase II, exceto o U6 que é transcrito pela polimerase III (McNamara-Schroeder et al. 2001). São poucos os estudos em peixes com estes RNAsn (Úbeda-Manzanaro et al. 2010; Merlo et al. 2010, 2012a, 2012b; Cabral-de-Melo et al. 2012; Supiwong et al. 2013; Utsunomia et

al. 2014). De modo que a realização de novos estudos pode auxiliar na compreensão da evolução destes genes no genoma dos peixes.

O gênero *Rhamdia*, ocorre em praticamente todas as bacias hidrográficas da América do Sul (Silfvergrip 1996), compreendendo 17 espécies válidas (Ferraris 2007). *Rhamdia quelen* é a espécie que apresenta maior distribuição geográfica dentro da família Heptapteridae, podendo ser encontrada, inclusive, vivendo em simpatria com outras espécies de *Rhamdia*, sendo considerada sinonímia para outras 50 (Ferraris 2007) e consistindo em um complexo de espécies (Perdices et al. 2002).

Rhamdia quelen é a espécie do gênero com mais estudos morfológicos e citogenéticos, apresentando $2n=58$ e variações nas fórmulas cariotípicas entre as populações, sendo a presença de cromossomos B uma característica da espécie (Moraes et al. 2009; Garcia et al. 2010;). Assim como na maioria dos peixes, a classe de DNA repetitivo mais estudada em *Rhamdia quelen* é DNAr 18S. Esses estudos revelam o sistema de RON simples é conservado na espécie e em relação ao DNAr 5S este parece estar distribuído em um único par cromossômico em posição intersticial, na maioria das populações analisadas (Garcia et al. 2010, Martínez et al. 2011).

Embora o DNAr tenha sido analisado, pouco se sabe sobre outras sequências de DNA repetitivo no grupo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise citogenética comparativa entre diferentes populações de *Rhamdia quelen*, por meio de análise convencional e do mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de DNAsn U2, afim de compreender melhor a estrutura genética, evolução cariotípica e taxonômica deste complexo de espécies.

Material e Métodos

Origem das amostras

No presente estudo foram analisadas seis populações de *Rhamdia quelen* coletadas em diferentes bacias hidrográficas como relacionado na tabela abaixo.

Tabela 1–Locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares de *Rhamdia quelen* analisados. MS= Mato Grosso do Sul; PR= Paraná

Locais de coleta	Bacia	Nº de indivíduos
Rio Miranda-MS 19°31'24.96"S/57°02'25.51"W	Rio Alto Paraguai – Rio Paraguai	3♂,3♀
Rio Quexada –PR 23°56'9.65"S/51°39'26.08"W	Rio Ivaí – Rio Paraná	5♂,4♀,4?
Rib. Penacho - PR 23°22'54.3"S/50°19'75.5"W	Rio das Cinzas- Rio Paraná	1♂,1♀
Rio Taquari -PR 23°10'45.2"S/50°56'30.9"W	Rio Tibagi - Rio Paraná	10♂,3♀
Rib. Lindóia -PR 23°16'24.24"S/51°8'21.55"W	Rio Tibagi - Rio Paraná	4♂,4♀,1?
Rio Cambé-PR 23°17'8.28"S/51°16'67.7"W	Rio Tibagi - Rio Paraná	5♂,4♀
Total de indivíduos: 52		

Análise Citogenética Convencional e Bandamentos Cromossômicos

A mitose foi estimulada por injeção de suspensão de levedura nos animais, como descrito por Lee e Elder (1980). Os cromossomos mitóticos foram obtidos por preparação direta, removendo o rim posterior, de acordo com a metodologia proposta por Bertollo et al. (1978) e, para análise, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6.8. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964) e para determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) foram considerados portadores de dois braços e os acrocêntricos (a) um braço. As regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação de nitrato de prata

segundo Howell e Black (1980). Para a determinação dos sítios ricos em pares de base GC e AT foram utilizados os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA3) e 4,5-diaminophenylindole (DAPI), segundo Schweizer (1976).

Obtenção e marcação das sondas e hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

A sonda de DNAr 5s de *Imparfinis schubarti* (Gouveia, comunicação pessoal) foi marcada por PCR utilizando nucleotídeo digoxigenina-11-dUTP 1mM(Roche Applied Science) e para a reação de 25µl foram utilizados: 2,5 µl de 10X PCR Buffer; 2 µl de DNA de *Imparfinis schubarti* 20ng/µl; dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 2mM cada; primers a 10µM; MgCl₂ (50 mM); Taq polimerase a 5U/µl e água para completar a reação.

As sondas de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti 2004) e de U2 RNAsn de *Eigenmannia virescens* utilizadas na double FISH foram marcadas por PCR com biotina-16-dUTP e o sinal foi detectado com avidina-FITC (Roche Applied Science) e com digoxigenina-11-dUTP, eo sinal detectado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science), respectivamente. A FISH foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986). As imagens foram capturadas com câmera digital Moticam Pro 282B acoplada ao fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 4500 B ou câmera Olympus (DP70) acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX61.

Resultados

Dos exemplares de *Rhamdia quelen* aqui estudados, duas populações já tinham sido previamente descritas, por meio de coloração convencional, impregnação por nitrato de prata e fluorocromos: as populações do rio Taquari e do ribeirão Lindóia, por Moraes et al. (2010) e Tsuda et al. (2010), respectivamente. Todas as populações

apresentaram um número diplóide igual 58, com variação na fórmula cariotípica para as quatro populações analisadas no presente estudo: $40m+10sm+4st+4a$ e NF igual 112 para o rio Quexada (Fig. 2a), $40m+12sm+6st$ com NF igual 116 para o Ribeirão do Penacho (Fig. 2b), $32m+8sm+18st$ com NF igual para o rio Cambé (Figura 2c) e $34m+16sm+8st$ com NF igual 116 para o rio Miranda (Fig. 2d).

A impregnação por nitrato de prata revelou Ag-RONs na região terminal do braço curto de somente um cromossomo submetacêntrico, nas quatro populações de *Rhamdia quelen* (Fig. 2 a,b,c, d- box). O tratamento com fluorocromo CMA₃ revelou marcação positiva em um par submetacêntrico, provavelmente correspondente a AgRONs (Fig. 2 a,b,c,d box), sendo que na população do rio Quexada foi encontrado um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos (Fig. 2a box). Com o DAPI nenhuma marcação foi observada.

A FISH com sonda de DNAr 18S também identificou apenas um par cromossômico com os cístrons ribossomais na região terminal nas seis populações de *R. quelen* (Fig. 3a,b,c,d,e,f). A presença de um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos também foi observada na população do rio Quexada (Fig. 3a).

A sequência de DNAsn U2 foi observada em cinco cromossomos nas populações do rio Quexada e do ribeirão Lindóia (Fig. 3a, e, respectivamente), em seis cromossomos nas populações do ribeirão do Penacho e rio Taquari (Fig. 3b, d, respectivamente) e em um único par na população do rio Miranda (Fig 3c). Na população do rio Cambé não foi utilizada a sonda desta sequência.

A detecção simultânea de 18S com DNAsn U2 evidenciou três padrões distintos nas populações de *Rhamdia quelen*: (i) sintonia dos genes em um par cromossômico nas populações do rio Quexada, ribeirão do Penacho e rio Taquari (Fig. 3a, b, d,

respectivamente), (ii) sintenia em um único cromossomo, população do ribeirão Lindóia, (Fig. 3e) e (iii) posição não sintênica, população do rio Miranda (Fig. 3c).

A sequência de DNAr 5S está localizada na região intersticial em um par cromossômico nas populações do rio Quexada, ribeirão do Penacho, rio Taquari, ribeirão Lindóia e rio Cambé (Fig. 4a, b, d, e, f). A população do rio Miranda foi a única a evidenciar mais de um par cromossômico portador deste sítio de DNAr (Fig. 4c).

Discussão

Dentro da família Heptapteridae *Rhamdia quelen* é a espécie mais estudada apresentando um $2n=58$, bem conservado no gênero, apesar da família possuir uma notável variação indo de $2n=42$ em *Imparfinis hollandi* (Margarido e Moreira Filho 2008) a $2n=58$ em *Rhamdia* (Moraes et al. 2009, Garcia et al. 2010; Silva et al. 2011). As diferentes populações de *R. quelen* estudadas, todas com 58 cromossomos, apresentam diferentes fórmulas cariotípicas, mas com predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, com altos NF (Tabela 2), assim como as populações aqui analisadas.

A presença de cromossomos B é uma característica marcante deste grupo de peixes, sendo que polimorfismos numéricos já foram relatados por diversos autores para a espécie (Stivari e Martins-Santos 2004; Garcia et al. 2010; Martinez et al. 2011), entretanto, não foi observada a presença de cromossomos acessórios nas populações analisadas, exceto na população do rio Taquari, anteriormente reportada por Moraes et al. (2010).

Perdices et al. (2002) sugerem o gênero *Rhamdia* passou por um processo de divergência recente e que sua fórmula cariotípica ainda estaria em processo de diferenciação. É válido ressaltar que a natureza pequena e a compactação dos

cromossomos deste grupo de peixes podem interferir na sua classificação, acarretando na presença das diferentes fórmulas cariotípicas.

Entretanto, a hipótese mais provável para a manutenção do número diplóide e a divergência nas fórmulas cariotípicas em *Rhamdia quelen*, seria devido a ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais do tipo inversão pericêntrica ou translocação, como já proposto por outros autores (Garcia et al. 2010, Martinez et al. 2011). Apesar de muitos estudos, um padrão de estrutura cariotípica, de acordo com a localidade ou sistema hidrográfico ainda não foi bem estabelecido para a espécie (Garcia et al. 2010).

O padrão de RON simples é predominante em *R. quelen* e sua presença em cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos é o mais frequente, sendo confirmado pela FISH com a sonda de DNAr 18S em algumas populações, inclusive as do presente estudo (Tabela 2). Ag-RONs simples são um importante marcador citogenético para a espécie e para o gênero, apesar de Ag-RONs múltiplas já terem sido descritas para outras espécies de *Rhamdia* (Andrade et al. 1998; Abucarmae Martins-Santos 2001).

Durante algum tempo, antes da utilização de sondas de DNAr 18S que fornecem uma localização precisa dos cístrons de DNA ribossômico, os fluorocromos, como a cromomicina A₃, foram utilizados para auxiliar na localização da RON uma vez que, segundo Salvadori et al. (1995), essa região está associada com famílias de DNA ricas em pares de base GC. Esse é um padrão observado em todas as populações analisadas de *Rhamdia quelen* (Tabela 2).

Um polimorfismo estrutural do sítio ribossômico pode ser a causa do heteromorfismo de tamanho da RON da população do rio Quexada, sendo as possíveis causas para este polimorfismo eventos espontâneos de duplicação, deleção e crossing-over desigual (Gold et al. 1990).

Os estudos com a sequência de DNAsn U2 em peixes ainda são muito restritos entretanto, Úbeda-Manzanaro et al. (2010) analisando espécies da família Batrachoididae, observaram padrões diferentes de distribuição desta sequência de DNA repetitivo, como: bloco em um único par cromossômico, dispersa por todos os cromossomos ou então apresentando os dois padrões simultaneamente. Contudo, a maioria dos estudos propõe uma tendência evolutiva de que sítios de DNAsn U2 se acumulem em um único par cromossômico como foi observado em Batrachoidae (Batrachoidiformes), Moronidae (Perciformes), Bagridae (Siluriformes), Haemulidae (Perciformes) e Gymnotidae (Gymnotiformes) (Merlo et al. 2010, 2012a,b; Úbeda-Manzanaro et al. 2010; Supiwong et al. 2013; Utsunomia et al. 2014).

Contrariando os estudos realizados, o presente trabalho mostrou a presença de 5 a 6 cromossomos portadores da sequência de DNAsn U2 em todas as populações de *Rhamdia quelen*, exceto para a população do rio Miranda que apresentou apenas um par portador. O único caso reportado, até o momento, de que essa sequência de DNAsn U2 se encontra em mais de um par cromossômico foi em *Gymnotus pantanal*, com seis pares (Utsunomia et al. 2014).

A presença de mais sítios desta sequência poderia estar relacionada aos transposons (ETs) e retrotransposons (ERTs), assim como ocorre com o DNAr em algumas espécies de peixes, como relatado em *Sorubim lima* (Sczepanski et al. 2013) e *Astyanax scabripinnis* (Barbosa et al. 2015). Segundo Le Rouzic e Capy (2005), a associação entre ETs e ERTs e o DNA codificante pode favorecer a ocorrência de recombinação deste DNA, implicando em mutações que podem influenciar tanto na organização genômica quanto na expressão destas sequências. Contudo, são necessárias mais análises para estabelecer se esta associação está realmente ocorrendo com o DNAsn U2 nas populações de *Rhamdia quelen*.

A ausência do sítio de DNAsn U2 em um dos cromossomos homólogos nas populações do rio Quexada e do ribeirão Lindóia pode ser em decorrência de um heteromorfismo de tamanho deste sítio, que impossibilita sua detecção pela técnica. Como este sítio está localizado na região terminal dos cromossomos, pode estar ocorrendo a transferência de material genético, de um homólogo para o outro, devido a proximidade no núcleo interfásico, de acordo com a orientação dos cromossomos segundo o modelo de Rabl (Schweizer e Loidl 1987).

Dos estudos realizados, até o momento, com os pequenos DNAs nucleares nenhum relatou sintenia deste com qualquer outra sequência de DNA repetitivo como DNAr 18S, DNAr 5S e de (GATA)_n (Úbeda-Manzanaro et al. 2010; Merlo et al. 2010; Supiwong et al. 2013; Utsunomia et al. 2014). Somente foi observada a co-localização de 18S e DNAsn U2 em *Thalassophryne maculosa* por Úbeda-Manzanaro et al. (2010), sendo assim, os dados encontrados em *Rhamdia quelen* são os primeiros que evidenciam a sintenia deste DNAsn com um DNA repetitivo.

É claro que, a cada análise, novas contribuições sobre esta sequência vão se somando e um maior conhecimento sobre sua distribuição nos cromossomos de peixes, poderá ser estabelecido. Entretanto, é interessante notar que os dados aqui apresentados já desviam do observado em outros grupos de peixes e até mesmo na ordem Siluriformes. A variabilidade observada entre as cinco populações de *R. quelen* demonstra que esta sequência pode ser mais um importante marcador citogenético em peixes, sendo que a população do Rio Miranda é a que mais se difere das demais.

O DNAr 5S é formado por uma região altamente conservada de DNA (Wasko et al. 2001) e devido sua dinâmica de evolução como cópia única, tornou-se uma excelente ferramenta na compreensão da evolução de famílias multigênicas, atuando como um marcador genético entre espécies e populações (Martins 2000). Entre os Siluriformes,

existe uma alta variabilidade no número de cístrons ribossômicos 5S (Kavalco et al. 2004) e *Rhamdia quelen* é uma das poucas espécies que mantêm-se conservada, com apenas um par cromossômico portador deste cístron (Tabela 2). A exceção foi novamente a população do rio Miranda com dois pares portadores desta região, podendo ser resultado de uma translocação como proposto por Garcia et al. (2010) para *Rhamdia quelen* do rio Fortuna, que também apresentou sítios múltiplos de DNAr 5S.

A presença do DNAr 5S em um único par na região intersticial ou pericentromérica parece ser característico de *Rhamdia quelen*, como já observado em diferentes populações (Garcia et al. 2010; Martinez et al. 2011) e no presente estudo. De acordo com Martins e Galleti Jr. (1999), a localização desta sequência na região intersticial pode ser responsável pela proteção contra eventos de transposição e *crossing*, que são mais frequentes em regiões terminais. Contudo, outros fenômenos podem estar agindo para a manutenção desta sequência nessa localização, uma vez que em *Rhamdia quelen* a sequência de DNAr 18S é conservada em posição terminal de um único par cromossômico.

O mapeamento cromossômico dessa região em peixes vem se tornando mais frequente e a variabilidade em número e localização de cístrons 5S tem sido observada, podendo estar em um único par cromossômico (Hashimoto et al. 2011; Utsomia et al. 2014), vários cromossomos (Garcia et al. 2010; Pansonato-Alves et al. 2013), em sintenia com o DNAr 18S (Traldi et al. 2013) e em sintenia com histona (Hashimoto et al. 2011). O aumento no número de estudos com o gene ribossomal 5S demonstra que este não é tão conservado quanto se supunha (Hashimoto et al. 2011). *Rhamdia quelen*, entretanto, apresenta-se conservada para essa característica, uma vez que, das 24 populações analisadas para esta sequência somente duas apresentaram mais de um par

portador de sítios de DNAr 5S, mas sabe-se que, com mais populações sendo analisadas, este cenário pode se tornar mais diversificado.

Considera-se que *Rhamdia quelen* seja um complexo de espécies, portanto, análises mais detalhadas, com o emprego de sequências de DNA repetitivo, em diferentes populações da espécie, podem ser importantes ferramentas em estudos filogenéticos e taxonômicos, como no caso da população do rio Miranda no presente estudo, que se mostrou mais heterogênea em relação às sequências de DNAs repetitivos em comparação com as demais populações.

Os dados citogenéticos observados nas seis populações de *Rhamdia quelen* confirmam o número diplóide, as regiões ricas em base GC, o número e localização dos sítios de DNA ribossômicos 18S e 5S característicos da espécie (Tabela 2). Entretanto, a utilização de uma nova sequência de DNA repetitivo, o DNAsn U2, mostrou uma variação interpopulacional podendo ser um importante marcador citogenético. Sendo assim, as análises de DNA repetitivo deste estudo aliado a outras sequências como histonas, elementos transponíveis e outros DNAsn podem contribuir para melhor caracterização deste complexo de espécies e na compreensão da organização e evolução dos DNAs repetitivos no genoma deste grupo de peixes.

Referencias

- Abucarma M, Martins-Santos IC (2001) Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia*, 66: 299-306.
- Andrade SF, Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (1998) Caracterização cromossômica da espécie *Rhamdia* sp. (Pisces, Pimelodidae), proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. In: 44° Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, p. 66.
- Barbosa P, Oliveira LA, Pucci MB, Santos MH, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF (2015) Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinis* (Teleostei: Characidae) species complex. *Genetica* 143: 55-62
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103–120.
- Bitencourt JA, Affonso PRAM, Giuliano-Caetano L, Carneiro PLS, Dias AL (2012) Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the lorocariid fish *Hypostomus* aff. *Unae* from northeastern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 11: 933-943
- Blanco DR, Lui RL, Vicari MR, Bertollo LAC (2011) Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. *Cytogenet. Gen. Res.* 132: 71-78.
- Borba RS, Silva EL, Pacheco ACS, Parise-Maltempi PP, Alves AL (2012) Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes) *Rev Fish Biol Fisheries* 22:509–518
- Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Nakajima RT, Martins C (2012) Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Res* 20: 279-292
- Coles CF, Sánchez S, Jorge LC (2013) Estructura cariotípica de dos poblaciones de *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) de los ríos Paraná y Paraguay (Argentina) *Rev. vet.* 24: 2, 144-147.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JP (2000) B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae) *Folia Biol.* 48:105-109
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Dias AL, Swarça AC (2003a) Cytogenetic studies and correlate considerations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* 68: 363-368

Fenocchio AS, Swarça AC, Cestari MM, Dias AL, (2003b) Karyotypic characterization and NOR analysis by different banding techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the first plateau of the Iguaçú river (Brazil). *Folia biológica* (Kraków) 51: 3-4

Ferraris C Jr (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*: 180-203

Garcia C, Almeida Toledo LF (2010) Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* 63: 32-40, 2010

Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 9(1):365-384

Gold JR, Li C, Shipley NS, Powers PK (1990) Improved methods for working with chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J Fish Biol* 37: 563-575.

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 134: 64-71 DOI: 10.1159/000323512

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Prado FD, Foresti F, Porto-Foresti F (2013) Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenetic genome Research* 139: 102-106. 2013 DOI: 10.1159/000345299

Hochberg VBM, Erdtmann B (1988) Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae)- The occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Revista Brasileira de Genética* 11: 563-576

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015. doi:10.1007/BF01953855

Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J (2005) Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110:462-467

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes) *Heredity* 94: 180-186

- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2005) Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica* 124:85-91.
- Lee MR, Elder FFB (1980) Yeast simulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic Cell Genet.* 26:36-40
- Le Rouzic A, Capy P (2005) The first steps of transposable elements invasion: parasitic strategy vs. genetic drift. *Genetics* 169: 1033-1045
- Levan A, Fregda K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:727–764.
- Margarido VP, Moreira-Filho O (2008) Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae) *Genet Mol Biol* 31:235–238
- Martinez JF, Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Silva LF, Venere PC, Souza IL, Moreira-Filho O (2011) Comparative cytogenetics of three populations from the Rhamdiaquelen species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia* 64(1): 121-128
- Martins C (2000) Organização do DNA ribossômico 5S no genoma de peixes, com ênfase no gênero *Leporinus*. Dr. Teses. Centro de ciências Biológicas e da saúde. Universidade Federal de São Carlos
- Martins C, Galleti Jr PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 7: 363-367
- Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5s ribosomal DNA in the fish genome. Chapter X, in Williams CR (ed): *Focus on Genome Research* (Nova Science Publishers, New York.
- McNamara-Schroeder KJ, Hennessey RF, Harding GA, Jensen RC, Stumph WE (2001) The *Drosophila* U1 and U6 gene proximal sequence elements act as important determinants of the RNA polymerase specificity of small nuclear RNA gene promoters in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276:31786–31792.
- Mendes MM, Rosa R, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) Karyotype diversity of four species of the *Incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA3 and 18S rDNA *Genet. Mol. Res.* Ahead of Print
- Merlo MA, Cross I, Chairi H, Manchado M, Rebordinos L (2010) Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related

species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes Genet Syst* 85:341-349

Merlo MA, Cross I, Palazón JL, Úbeda-Manzanaro M, Sarasquete C, Rebordinos L (2012a) Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toad-fish *Holobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. *BMC EvolBiol* 12: 201

Merlo MA, Pacchiarini T, Portela-Bens S, Cross I, Manchado M, Rebordinos L (2012b) Genetic characterization of *Plectorhinchus mediterraneus* yields important clues about genome organization and evolution of multigene families. *BMC Genet* 13: 33

Moraes VPO, Carneiro JS, Dias AL (2010) Intraespecific chromosome analysis in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) *Cybium* 34: 397-398

Moraes VPO, Cereali SS, Froehlich O, Dias AL (2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 6: 627-633

MoraesVPO, Carneiro JS, Dias AL (2009) B chromosomes in four different populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): A comparative study of frequency and distribution. *Folia biologica* 57:165-169

Pansonato-Alves J, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F (2013) Mapping Five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricaridae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fisheries* 23: 477-489

Perdices A, Bermingham E, Montilla A, Doadrio I (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *MolPhylogenetEvol* 25: 172-189

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2934–2938.

Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP (2006) Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareodon* sp (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex Chromosome system. *Genetica* 128: 159-166.

Salvadori S, Deiana AM, Coluccia E, Florida G, Rossi E, Zuffardi O (1995), Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in atlantic eels. *Chromosome Research*, 3, 54-58.

Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307–324.

Schweizer D, Loidl JA (1987) Model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today* 9:61-74

Szczepanki TS, Vicari MR, de Almeida MC, Nogaroto V, Artoni RF (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). *Cytogenet and Genome Research* 141: 309-316

Silfvergrip AMC (1996) A systematic revision of the neotropical catfish *genus Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae) Stockholm University, Swedish Museum of Natural History, Stockholm.

Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti F, Foresti F (2014) Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PlosOne* 9(4):e94896. Doi10.1371/journal.pone.0094896

Silva M, Matoso DA, Ludwig LAM, Gomes E, Almeida MC, Vicari MR, Artoni RF (2011) Natural triploid in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçú basin, southern Brazil. *Environment Biology Fish* 91:361-366

Stivari MK, Martins-Santos IC (2004) Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 69(1): 25-34.

Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pinthong K, Tanee T, Tanomtong A (2013) Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Molecular Cytogenetics*, 6:51

Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2003) Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119: 87-92

Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*. 29: 288-299.

Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de Melo DC, Mazzuchelli J, Valente JT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC, Martins C (2009) Organization of repeated DNA elements in the genome of cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic Genome Research* 125: 224-234.

Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, Artoni RF, Moreira-Filho O (2013) Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet. Mol. Res.* 12 (1): 463-471

Tsuda JR, Moraes VPO, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2010) Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* 9: 1929-1935

Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L (2010) Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and

U2 snRNA gene by Double-colour FIS in species of the Batrachoididae family. *Genetica* 138: 787-794

Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato –Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2014) Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae) Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and Genome Research* 142:286-292

Valadkhan S: snRNAs as the catalysts of pre mRNA splicing. *Curr Opin Chem Biol* 9: 603- 608 (2005)

Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (2008) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium fish* (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311-317

Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica* 139:1073-1081

Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galleti Jr PM (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902

Tabela 2 – Dados cariotípicos em *Rhamdia quelen*. 2n=número diplóide; Bs= cromossomo supranumerário; NF=número fundamental; RON= região organizadora de nucléolo, FISH18S= hibridização in situ com sonda de DNAr 18S; FISH 5S= hibridização in situ com sonda de DNAr 5S; CMA₃=fluorocromos cromomicina A₃; Lg= lagoa; R= rio; Rb= ribeirão; Rv = reservatório; Ar= Argentina; MS=Mato Grosso do Sul; PR=Paraná; RJ=Rio de Janeiro; RS= Rio Grande do Sul; SC=Santa Catarina; SP= São Paulo.

Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	Bs	NF	RON	FISH 18S	FISH 5S	CMA ₃	Referência
Lg. dos Quadros/RS	58	52m/sm/st+6 ^a	0-2	110		1 par A	-	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
R.Guaíba/RS	58	52m/sm/st+6 ^a	0-2	110		1 par A	-	-	Hochberg e Erdtmann (1988)
R. Mogi-Guaçu/SP	58	-	4	108	1 par ST	-	-	-	Fenocchio et al. (2000)
R.Iguaçu/SC	58	-	0-1	108	1 par ST	-	-	-	Fenocchio et al. (2000)
R.Paraná/Ar	58	-	-	108	1 par ST	-	-	-	Fenocchio et al. (2000)
R. Paraná/Ar	58	26m+16sm+8st+8a	-	108	Par 27	-	-	-	Fenocchio et al. (2003a)
R. Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	0-1	108	1 par ST	1 par ST	-	1 par ST	Fenocchio et al. (2003b)
R.Iguaçu/PR	58	32m+16sm+6st+4a	-	116	1 par			1 par	Swarça et al. (2003)
R.Taquarussu/PR	58	26m+20sm+6st+6a	1-4	110	Par 26	-	-	Par 26	Stivari e Martins-Santos (2004)
Rb. Maringá/PR	58	26m+22sm+6st+4a/ 26m+24sm+8st	-	110	Par 18/ Par 19	-	-	Par 18/ Par 19	Stivari e Martins-Santos (2004)
Serra da Bodoquena,/MS	58	36m+16sm+6st	0-3	116	Par 20	-	-	Par 20	Moraes et al. (2007)
Água dos Patos/SP	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Par 28	-	-	Par 28	Moraes et al. (2009,2010)
Água das Pedras/PR	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Par 28	-	-	Par 28	Moraes et al. (2009, 2010)
Taquari/PR	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Par 23	1 par	1 par	Par 23	Moraes et al. (2009,2010) Presente estudo (2014)
FUNPIVI/SC	58	36m+16sm+6st	0-2	116	Par 28	Par 28	-	Par 28	Moraes et al. (2009,2010)
R. Oeste – Cascavel/PR	58	36m+10sm+12st	-	116	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
Sangão – Cascavel/PR	58	32m+8sm+12st+6a	0-1	110	Par 26	Par 26	1 par M	Par 26	Garcia et al. (2010)
Angra dos Reis/RJ	58	40m+10sm+8st	-	116	Par 24	Par 24	1 par M	Par 24	Garcia et al. (2010)

R. São José /RJ	58	36m+14sm+8st	0-1	116	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
R. Paraíba do Sul/RJ	58	36m+14sm+8st	0-1	116	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
Araras/SP	58	40m+10sm+8st	0-5	116	Par 24	Par 24	1 par M	Par 24	Garcia et al. (2010)
R. Capivra-Botucatu/SP	58	44m+12sm+2st	0-1	116	Par 26	Par 26	1 par M	Par 26	Garcia et al. (2010)
Colina/SP	58	36m+10sm+12st	0-5	116	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
Guapiara/SP	58	36m+10sm+12st	-	116	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
Iguapé/SP	58	36m+10sm+12st	-	116	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
R. Passa Cinco – Ipeúna/SP	58	34m+16sm+8st	0-4	116	Par 26	Par 26	1 par M	Par 26	Garcia et al. (2010)
Fortuna – Mariápolis/SP	58	40m+10sm+8st	0-1	116	Par 24	Par 24	1 par M. e 1par ST	Par 24	Garcia et al. (2010)
Piquete/SP	58	40m+10sm+8st	0-2	116	Par 24	Par 24	1 par M	Par 24	Garcia et al. (2010)
Sto. Antônio do Pinhal/SP	58	30m+14sm+12st+2a	0-2	114	Par 27	Par 27	1 par M	Par 27	Garcia et al. (2010)
Rb. Lindóia/PR	58	30m+14sm+10st+4a	-	112	1 par	1 par	1 par	1 par	Tsuda et al. (2010); Presente estudo(2014)
Rb. Lindóia/PR	3n=87	45m+21sm+15st+6a	-	168	3 cromo.	-	-	3 cromo.	Tsuda et al. (2010)
Mogi-Guaçu	58	11m+18sm+12st+6a	-	-	Par 28	Par 28	Par 14	-	Martinez et al. (2011)
Araguaia	58	18m+18sm+14st+8a	1-5	-	Par 28	Par 28	Par 10	-	Martinez et al. (2011)
Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	58	38m/sm+14st+6a	-	110	Par 28	Par 28	1 par	-	Silva et al. (2011)
Lagoa da Usina Elétrica Ney Braga/PR	3n=87	57m/sm+21st+9a	-	-	3 cromo.	3 cromo.	3 cromo.	-	Silva et al. (2011)
Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	58	32m+18sm+8st	2	116	Par 18	Par 18	-	-	Borba et al. (2012)
Rio Paraná	58	46m/SM+12st	-	116	Par 27				Coles et al. (2013)
Rio Paraguay	58	46m/SM+12st	-	116	Par 27				Coles et al. (2013)
Rio Quexada/PR	58	46m+4sm+4st+4a	-	112	1par	1par	1par	1par	Presente estudo
Rb. Penacho/PR	58	40m+12sm+6st	-	116	1par	1par	1par	1par	Presente estudo

Rio Miranda/MS	58	34m+16sm+8st	-	116	1par	1par	2 pares	1par	Presente estudo
Ribeirão Cambé/PR	58	32m+ 8sm+ 18st	-	116	1 par	1 par	1 par	1 par	Presente estudo

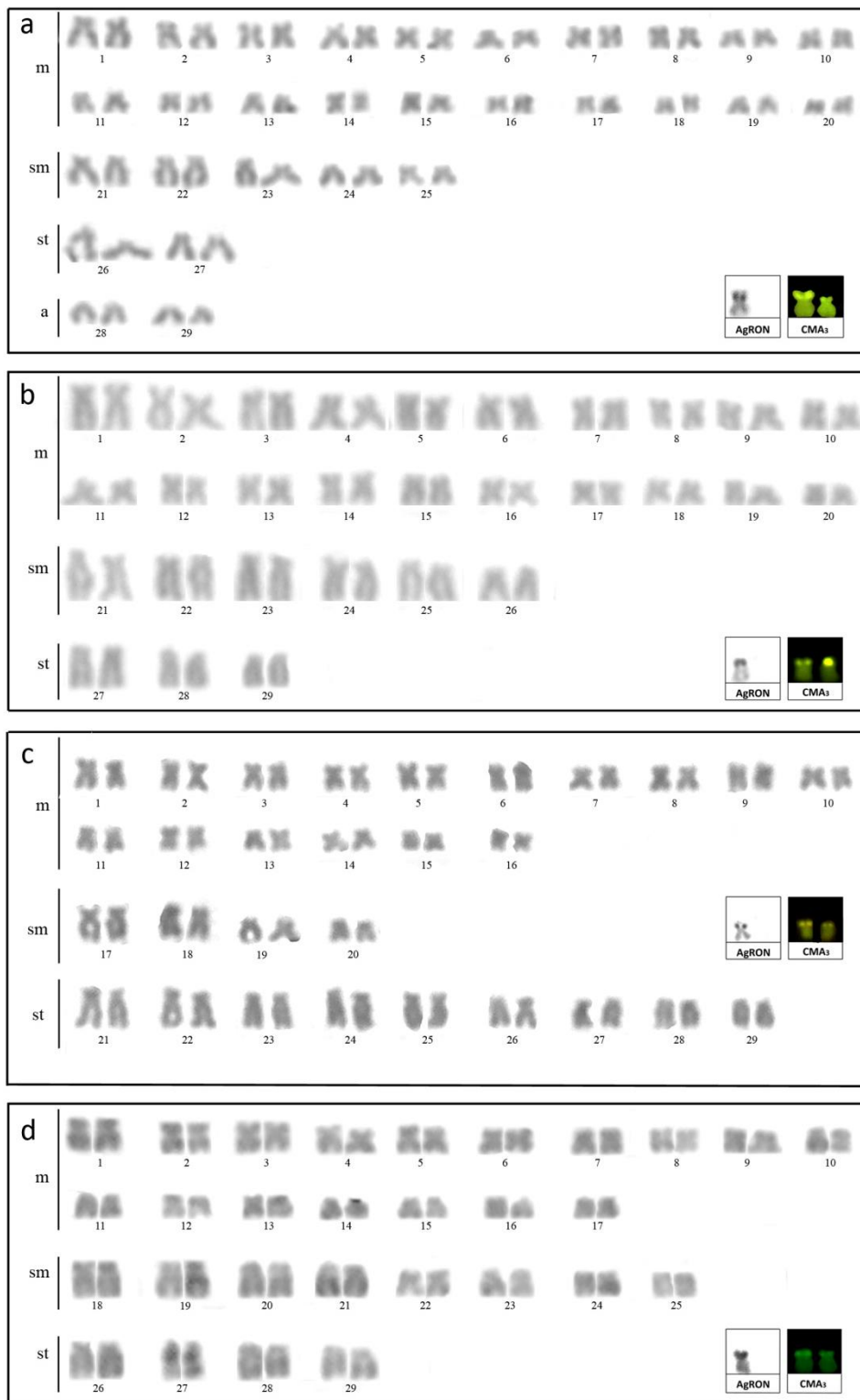


Figura 1- Cariótipos de *Rhamdia quelen*: (a) rio Quexada; (b) ribeirão do Penacho; (c) Rio Cambé; (d) rio Miranda. Nos boxes laterais, oscromossomos da RON com impregnação pelo nitrato de prata e como fluorocromo CMA₃.

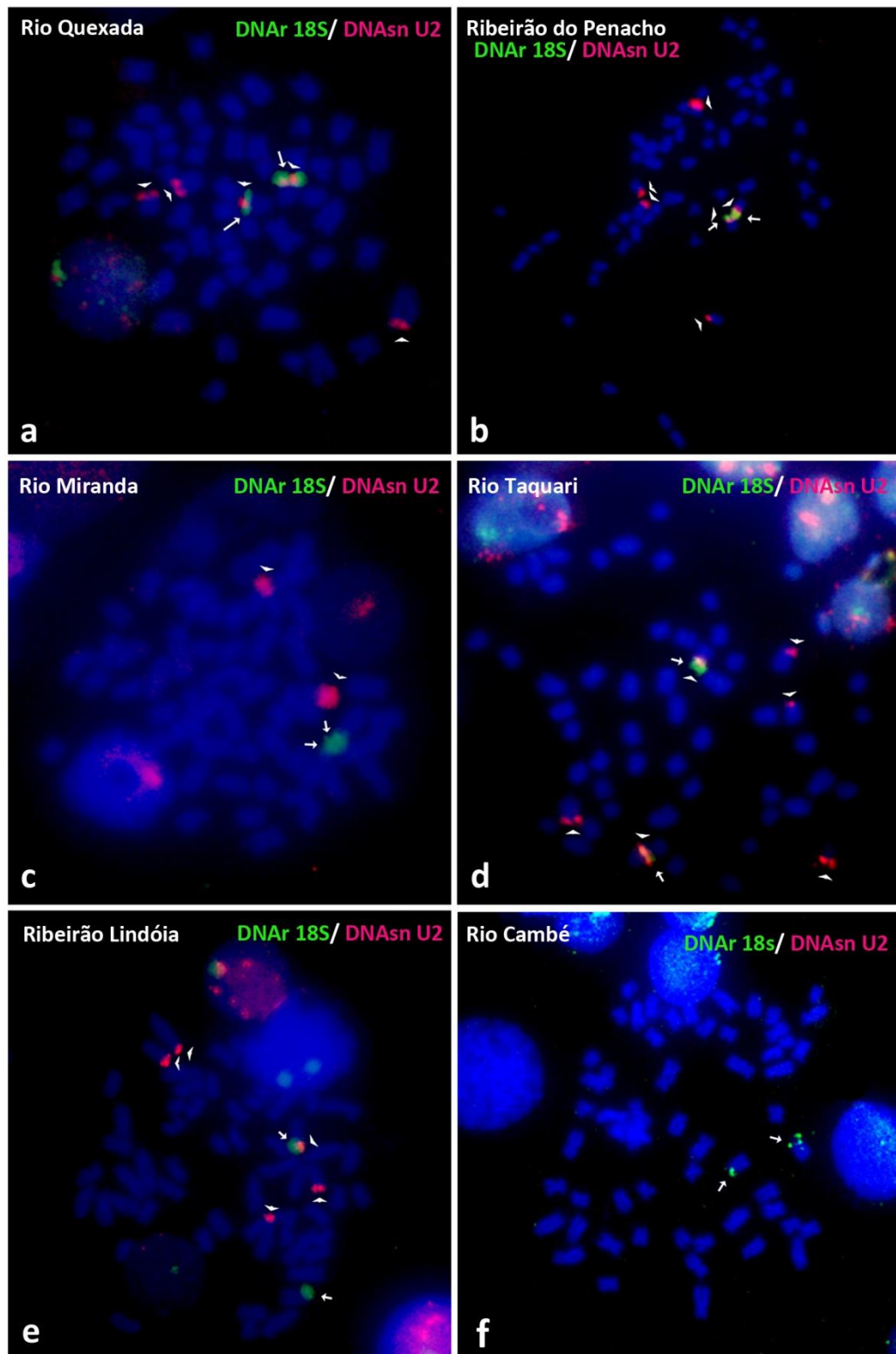


Figura 2-Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* após Double FISH com sondas de DNAr 18S (verde) e DNAsn U2 (vermelho): (a) rio Quexada; (b) ribeirão do Penacho; (c) rio Miranda; (d) rio Taquari; (e) ribeirão Lindóia. E FISH com DNAr 18S (verde) na população do rio Cambé (f).As setas indicam os sítios de DNAr 18S e as cabeças de seta indicam os sítios de DNAsn U2.

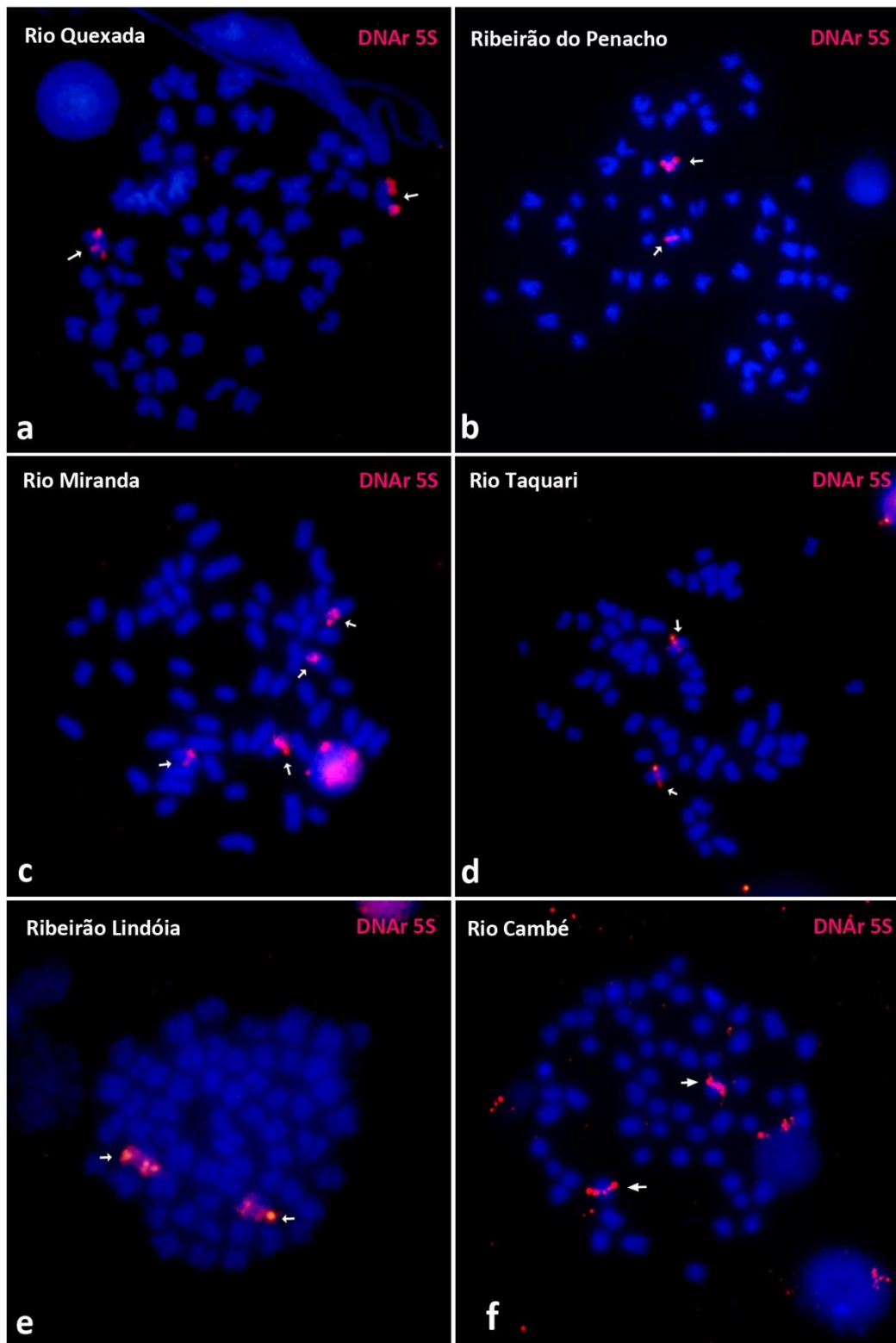


Figura 3- Metáfases somáticas de *Rhamdia quelen* após FISH com sonda de DNAr 5S: (a) rio Quexada; (b) ribeirão do Penacho; (c) rio Miranda; (d) rio Taquari; (e) ribeirão Lindóia; (f) rio Cambé. As setas indicam os sites de DNAr 5S

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises citogenéticas nas diferentes populações de *Rhamdia quelen* do presente estudo corroboram os dados disponíveis na literatura e evidenciam dados inéditos para a família. Diante disto destacam-se as seguintes considerações:

1. Os dados cariotípicos para as populações do rio Quexada, rio Miranda, rio Cambé e ribeirão do Penacho confirmam o $2n$ conservado no gênero *Rhamdia*, com variações na fórmula cariotípica, devido, provavelmente, à ocorrência de rearranjos cromossômicos, como translocações ou inversões.

2. Todas as populações apresentaram um sistema simples de AgRONS, característica marcante deste grupo de peixes, presente no braço curto de um único cromossomo submetacêntrico. A FISH com a sonda de DNAr 18S confirmou um par com este sítio ribossômico, sendo que um polimorfismo estrutural, foi a causa do heteromorfismo de tamanho desta região na população do rio Quexada.

3. Os cromossomos portadores das RONS mostraram natureza GC rica e AT pobre, após coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, respectivamente, característica compartilhada pelas espécies de *Rhamdia*.

4. Dados inéditos foram obtidos para a família Heptapteridae e *Rhamdia quelen* com a utilização da sonda de DNAsn U2, evidenciando que esta espécie pode apresentar variações cromossômicas em sua microestrutura que nunca haviam sido reportadas. A Double FISH de DNAr 18S e DNAsn U2 em cinco das populações analisadas, demonstrou que esta variabilidade pode ser ainda maior dentro deste grupo, devido a presença de sintonia ou não destas sequências.

5. Os resultados obtidos com o mapeamento cromossômico de DNAsn U2 em *Rhamdia quelen* mostram-se de extrema importância, uma vez que mudam o cenário desta sequência na citogenética de peixes, sendo que a maioria das populações aqui

analisadas apresentaram mais de um sítio cromossômico desta sequência, contrariando o padrão encontrado na literatura, até o momento, de que se acumulem em um único par cromossômico.

6. A presença de um único par cromossômico portador do sítio de DNAr 5S foi confirmada em todas populações analisadas, corroborando com os dados existentes na literatura para o gênero e espécie. Em todas as populações a sequência está presente na região intersticial, o que pode ser responsável por sua proteção contra eventos de transposição.

7. Os dados aqui apresentados confirmam, de modo geral, a evolução cariotípica conservativa de *Rhamdia quelen*, no entanto, a população do rio Miranda foi a que apresentou características particulares em relação às outras populações, como sítio simples para o DNAsn U2 e múltiplo para o DNAr 5S, revelando uma variação interpopulacional na microestrutura da espécie nunca antes evidenciada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCARMA, M; MARTINS-SANTOS, I. C. 2001 Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia*, 66: 299-306.

AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTE AQUAVIÁRIOS (Brasil) 2013 Bacia do Paraguai – Plano nacional de integração hidroviária. Desenvolvimento de estudos e análises das hidrovias brasileiras e suas implantações portuárias com implantação de bases de dados georreferenciada e sistema de informações geográficas.

ANDRADE,S.F; MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA,C.;FORESTI, F.1998 Caracterização cromossômica da espécie *Rhamdia* sp. (Pisces,Pimelodidae), proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. In: 44º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia,SP, p. 66.

ANZA, J.A. 2006 Revisão das espécies do gênero *Rhamdia* (Siluriformes; Heptapteridae) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil, um exemplo de diversidade subestimada do gênero. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 5p.

BARBOSA, P.; OLIVEIRA, L.A.; PUCCI, M.B.; SANTOS, M.H.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI R.F. 2015 Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinis* (Teleostei: Characidae) species complex. *Genetica* 143: 55-62

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. 1978 Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103–120.

BITENCOURT,J.A.; AFFONSO, P.R.A.M.; GIULIANO-CAETANO,L.; CARNEIRO, P.L.S.; ,DIAS, A.L. 2012Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricatoriid fish *Hypostomus* aff. *Unae* from northeastern Brazil *Genet. Mol. Res.* 11: 933-943

BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. 2011 Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. *Cytogenet. Gen. Res.* 132: 71-78.

BOCKMANN, F.A. 1994. Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodid catfish from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily Rhamdiinae (Siluriformes: Pimelodidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 107: 760-777.

BOCKMANN, F.A. 1998 Análise filogenética da família Heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 599p.

BOCKMANN, F.A. ;G.M. GUAZZELLI. 2003. Family Heptapteridae (Heptapterids), p. 406-431. *In*: R.E. REIS; S.O. KULLANDER &C.J. FERRARIS JR (Eds). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America.Porto Alegre, Edipucrs, 729p.

BORBA, R.S.; SILVA, E.L.; PACHECO, A.C.S.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; ALVES, A.L. 2011. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 509-518, 2011. doi 10.1007/s11160-011-9245-3

BORBA, R.S.; SILVA, E.L.; PACHECO, A.C.S.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; ALVES, A.L. 2012 Trends in the karyotypic evolution of the Neotropicalcatfish family HeptapteridaeBockmann 1998(Teleostei: Siluriformes) *Rev Fish Biol Fisheries* 22:509–518

BRITO, M.R.2003 Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophys). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

BRITSKI,H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. 1998Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (Com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª Ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação. CODEVASF 115p.

BRONDS, S.J. 1989-present. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. Acesso eletrônico em:

<http://taxonomicon.taxonomy.nl/> Acessado em 18 de março de 2015

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. 2012 Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Res* 20: 279-292

CASTRO, R.N.; L. CASATTI. 1997. The fish fauna from a smallforest stream of the upper Parana river basin, south eastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 7: 337-352.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C. AND MOREIRA-FILHO, O. 2001. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54: 253–260.

CHILDS, G.; MAXSIN, R.; COHN, R.H.; KEDES, L.1981 Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. *Cell* 23:651-663

COLES, C.F.; SÁNCHEZ, S. JORGE, L.C. 2013 Estrutura cariotípica de duas populações de *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) de los ríos Paraná y Paraguay (Argentina) Rev. vet.24: 2, 144-147.

CUELLAR, O.; UYENO, T. 1972. Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics* 11: 508-515.

DAZZANI, B.; GARCIA, C.; PEIXOTO, M.; TRAJANO, E.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2012. Cytogenetic and molecular analyses in troglotic and epigeic species of *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotropical Ichthyology* 10(3): 623-632.

DIOGO, R. 2003 Higher-level phylogeny of Siluriformes- An overview. In Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R, (eds) Catfishes. London, Science publishers, 353-384pp.

DOOLITTLE, W.F.; SAPIENZA, C. 1980 Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 3-601

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. (2014) Species by family/subfamily in the catalog of fishes. Acesso eletrônico em :

<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> Acessado 23 de janeiro de 2014

FARAH, S.B. 2007 Decifrando o genoma humano. In: DNA Segredos e Mistérios.p.155-202.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLO, L.A.C. 1990. Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* populations (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81:193-198.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; CAMACHO, J.P. 2000 B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae) *Folia Biol.* 48:105-109

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; DIAS, A.L.; SWARÇA, A.C. 2003a Cytogenetic studies and correlate considerations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* 68: 363-368

FENOCCHIO, A.S.; SWARÇA, A.C.; CESTARI, M.M.; DIAS, A.L. 2003b Karyotypic characterization and NOR analysis by different banding techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the first plateau of the Iguazu river (Brazil). *Folia biológica (Kraków)* 51: 3-4

FENOCCHIO AS, SWARÇA AC, DIAS AL, CESTARI MM (2002). Caracterização cromossômica (Giemsa, Banda C, NOR, CMA3, FISH) de *Rhamdia quelen* do Alto Rio Iguazu (Estado do Paraná). Anais do IX Simpósio de Citogenética e Genética de peixes. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

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

FERREIRA, M.; KAVALCO, K.F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; GARCIA, C. 2014 Cryptic Diversity Between Two *Imparfinis* Species (Siluriformes, Heptapteridae) by Cytogenetic Analysis and DNA Barcoding. Zebrafish 11: 306-317

FROSE, R.; PAULY, D. 2015. Acesso on line em:
[www.fishbase.org.version\(02/2015\)](http://www.fishbase.org.version(02/2015)) Acessado em 18 de março de 2015.

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

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; CENTOFANTE, L. 2003 B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). Cytologia 68: 403-411

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

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

GOUVEIA, J.G.; MORAES, V.P.O.; SAMPAIO, T.R.; ROSA, R.; DIAS, A.L. 2013 Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae) Rev Fish Biol Fisheries 23:215-227

GUEDES, D.S. 1980. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. 2011 Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). Cytogenetic and Genome Research 134: 64-71 DOI: 10.1159/000323512

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; PRADO, F.D.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. 2013 Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. Cytogenetic genome Research 139: 102-106. 2013 DOI: 10.1159/000345299

HOCHBERG, V.B.M.; ERDTMANN, B. 1988 Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae)- The occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Revista Brasileira de Genética* 11: 563-576

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. 1980 Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015. doi:10.1007/BF01953855

JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O. WALICHIEWICZ, J. 2005 Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110:462-467

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

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2005 Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica* 124:85-91.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2004 Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes) *Heredity* 94: 180-186

KIDWELL, M.G. 2002 Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.

LE GRANDE, W. H. 1981. Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, *Noturus*. *Copeia* 1: 33-52.

LEE, M.R.; ELDER, F.F.B. 1980 Yeast simulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic Cell Genet.* 26:36-40

LE ROUZIC, A.; CAPY, P. 2005 The first steps of transposable elements invasion: parasitic strategy vs. genetic drift. *Genetics* 169: 1033-1045

LEVAN, A.; FREGDA, K.; SANDBERG, AA. 1964 Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

LONG, E.O.; DAWID, I.B. 1980 Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:727–764.

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

FORESTI F (2002) Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, silver nitrate and CMA3 staining and restriction endonuclease banding. *Cytologia* 67: 25-31

MANCHADO M, ZUASTI E, CROSS I, MERLO A, INFANTE C, REBORDINOS L (2006) Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1,U2 and U5 small nuclear RNA genes. *Genome* 49: 79-86

MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O.2008 Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae) *Genet Mol Biol* 31:235–238

MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; TRALDI, J.B.; SILVA, L.F.; VENERE, P.C.; SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. 2011 Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia* 64(1): 121-128

MARTINS, C. 2000 Organização do DNA ribossômico 5S no genoma de peixes, com ênfase no gênero *Leporinus*. Dr. Teses. Centro de ciências Biológicas e da saúde. Universidade Federal de São Carlos

MARTINS, C.2007 Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.

MARTINS C, GALLETI JR PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 7: 363-367

MARTINS, C.; WASKO, A.P.; 2004 Organization and evolution of 5s ribosomal DNA in the fish genome. Chapter X, in Williams CR (ed): *Focus on Genome Research* (Nova Science Publishers, New York.

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

McNAMARA-SCHROEDER, K.J.; HENNESSEY, R.F.; HARDING, G.A.; JENSEN, R.C.; STUMPH, W.E. 2001 The *Drosophila* U1 and U6 gene proximal sequence elements act as important determinants of the RNA polymerase specificity of small nuclear RNA gene promoters in vitro and in vivo. *J BiolChem* 276:31786–31792.

MENDES, M.M.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. 2011 Karyotype diversity of four species of the *Incertae sedis* group (Characidae) from different

hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA3 and 18S rDNA Genet. Mol. Res. Ahead of Print

MERLO, M.A.; CROSS, I.; CHAIRI, H.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. 2010 Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. Genes Genet Syst 85:341-349

MERLO, M.A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J.L.; ÚBEDA-MANZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L.2012a Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toad-fish *Holobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. BMC EvolBiol 12: 201

MERLO, M.A.; PACCHIARINI, T.; PORTELA-BENS, S.;CROSS, I.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L.2012b Genetic characterization of *Plectorhinchus mediterraneus* yields important clues about genome organization and evolution of multigene families. BMC Genet 13: 33

MILANI, E.J.; MELO, J.H.G.; SOUZA, P.A.; FERNANDES, L.A.; FRANÇ, A.B. 2007 Bacia do Paraná B. Geoci. Petrobras, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 265-287,

MORAES-MANÉCOLO, V.P.O 2014 Citogenética convencional e molecular de diferentes espécies dos gêneros *Heptapterus*, *Rhamdella* e *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae), de duas bacias hidrográficas do rio grande do sul. Tese de Doutorado (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

MORAES, V.P.O.; CARNEIRO, J.S.; DIAS, A.L. 2010 Intraespecific chromosome analysis in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) Cybium 34: 397-398

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

MORAES,V.P.O.; CARNEIRO, J.S. DIAS, A.L. 2009 B chromosomes in four different populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): A comparative study of frequency and distribution. Folia biologica 57:165-169

NEI, M.; ROONEY, A.P. 2005 Concerted and Birth-and-Death evolution of multigene families. Annu Rev Genet 39:121–152.

NELSON, S.J. Fishes of the world 4.th. Ed. United States of America. John Wiley Sons. 600p

PANSONATO-ALVES, J.; SERRANO, E.A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2013 Mapping Five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricaridae): analysis of chromosomal variability. Rev Fish Biol Fisheries 23: 477-489 DOI: 10.1007/s11160-013-9303-0

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. 2002 Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *MolPhylogenetEvol* 25: 172-189

de PINNA, M.C.C. 1993. Higher-Level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi). Tese de Doutorado, The City University of New York, New York.

de PINNA, M.C.C. 1998 Phylogenetic relationship of Neotropical Siluriforms:historical overview and synthesis of hypothesis In: Malabarba, LR, Reis R.E., Vari R.P, Lucena Z.M.S., Lucena, C.A.S. (eds) *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes* Edpurcs, Porto Alegre, Brasil, 279-330 pp.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W.1986 Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2934–2938.

ROSA, R., BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. 2006 Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareodon* sp (Characiformes, Paradontidae) with a ZZ/ZW sex Chromosome system. *Genetica* 128: 159-166.

SALVADORI, S.; DEIANA, A.M.; COLUCCIA, E.; FLORIDIA, G.;ROSSI, E.; ZUFFARDI, O.1995 Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in atlantic eels. *Chromosome Research*, 3, 54-58.

SCHWEIZER, D. 1976 Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycinand DAPI. *Chromosoma* 92: 143–148. doi: 10.1007/BF00292840

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J.A. 1987 Model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today* 9:61-74

SCZEPANKI, T.S.; VICARI, M.R.; de ALMEIDA, M.C.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R.F. 2013 Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). *Cytogenet and Genome Research* 141: 309-316

SILFVERGRIP, A.M.C. 1996 A systematic revision of the neotropical catfish *genus Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae) Stockolm University, Swedish Museum of Natural History, Stockolm.

SILVA, D.M.Z.A.;PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.;DANIEL, S.N.; HASHIMOTO, D.T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J.P.M.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. 2014 Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PlosOne*9 (4):e94896. Doi10.1371/journal.pone.0094896

- SILVA, M.; MATOSO, D.A.; LUDWIG, L.A.M.; GOMES, E.; ALMEIDA, M.C.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F. 2011 Natural triploid in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçú basin, southern Brazil. *Environment Biology Fish* 91:361-366
- SILVA, S.V.S.; MORELLI, S. 2005. Análise cariótica em *Rhamdia quelen* do córrego do Caetano da região de Uberlândia, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005. Águas de Lindóia. Anais. Águas de Lindóia SBG. p. 397
- STIVARI, M.K.; MARTINS-SANTOS, I.C. 2004 Karyotype Diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 69(1): 25-34.
- STOLF, R.; SWARÇA, A.C.; GUILIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. 2004. Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. *Caryologia* 57 (4): 348-352.
- SULLIVAN, J. P.; LUNDBERG, J. G.; HARDMAN, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 636-662.
- SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M.B.; CHAVEERACH, A.; KOSYAKOVA, N.; PINTHONG, K.; TANEE, T.; TANOMTONG, A. 2013 Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Molecular Cytogenetics*, 6:51
- SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M.; DIAS, A.L. 2003 Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119: 87-92
- TAFT, R.J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J.S. 2007 The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*. 29: 288-299.
- TEIXEIRA, W.G.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE MELO, D.C.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, J.T.; PINHAL, D.; POLETO, A.B.; VENERE, P.C.; MARTINS, C. 2009 Organization of repeated DNA elements in the genome of cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic Genome Research* 125: 224-234.
- TOLEDO, V.; FERRARI, I. 1976. Modified squash technique for chromosomic studies in fishes. *Cientifica*. 4 (2):152-155.
- TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BARROS, A.V.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. 2013 Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet. Mol. Res.* 12 (1): 463-471
- TSUDA, J.R.; MORAES, V.P.O.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. 2010 Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* 9: 1929-1935

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. 2010 Chromosomal mapping of the major non-ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by Double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica* 138: 787-794

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; PANSONATO –ALVES, J.C.; OLIVEIRA, C. FORESTI, F. 2014) Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae) Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and Genome Research* 142:286-292

VALADKHAN, S. 2005 snRNAs as the catalysts of pre mRNA splicing. *Curr Opin Chem Biol* 9: 603- 608

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

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2008 Diversification of aZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium fish* (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311-317

VICARI.M.R.; PISTUNE, H.F.M.; CASTRO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M.; ARTONI, R.F. 2011 New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica* 139:1073-1081

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

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

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M.; GALLETI, J.R. P.M. 2001 Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902