

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**LIGIA MAGRINELLI BARBOSA**

**Caracterização citogenética de espécies da família Heptapteridae  
(Teleostei, Siluriformes) das bacias dos rios Cuiabá (MT) e Ivaí (PR)**

**MARINGÁ  
PARANÁ - PARANÁ  
FEVEREIRO - 2012**

**LIGIA MAGRINELLI BARBOSA**

**Caracterização citogenética de espécies da família Heptapteridae  
(Teleostei, Siluriformes) das bacias dos rios Cuiabá (MT) e Ivaí (PR)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel Cristina Martins dos Santos.

**MARINGÁ  
PARANÁ - PARANÁ  
FEVEREIRO – 2012**

Ao meu pai, Charles Martins Barbosa, homem bondoso, que me propiciou uma infância repleta de histórias e de contos de fadas. Obrigada por ser esse paizão pé no chão e sempre pronto para me ajudar e dar carinho.

À minha mãe, Alice Magrinelli, grande mulher, de um coração bondoso, na qual me espelho, especialmente pela capacidade de superar grandes problemas e permanecer amável e serena. Pela devoção dedicada à minha criação e pelo amor intenso que me devota.

Aos meus irmãos, Vitor e Rodrigo, pela paciência com que sempre aceitaram minhas diferenças. Eu os amo muito.

A essa família linda que sempre esteve presente em minha vida, construindo uma base sólida necessária para enfrentar grandes desafios, com todo amor.

Dedico.

## AGRADECIMENTO

Acima de tudo, agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter me dado paz e serenidade para superar os desafios, assim como força para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela estrutura oferecida para elaboração da pesquisa. A todos os professores do Programa, pela contribuição direta em minha formação profissional, tornando possível a subida de mais este degrau entre muitos que a vida me reserva.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro, concedido por meio de bolsa de estudo.

À minha Orientadora, professora doutora Isabel Cristina Martins dos Santos, por abrir as portas do Laboratório, acreditar em mim e em meu trabalho e pelos conhecimentos transmitidos que tornaram possível a conclusão desta Dissertação.

À minha Coorientadora, professora doutora Ana Luiza de Brito Portela Castro, pelo auxílio em um momento difícil, quando tudo parecia perdido, pelo encaminhamento dado, com calma e bondade, para a resolução de todas as dificuldades.

À professora doutora Luciana Andréia Borin e ao professor doutor Alberto Sérgio Fenocchio, que disponibilizaram seu precioso tempo e conhecimento, contribuindo grandemente para este trabalho.

Agradecimento especial à minha grande-amiga irmã Greicy Ellen, que me ajudou durante toda essa caminhada, sempre com palavras amigas e apoio. Agradeço por sua alegria, que muitas batalhas me ajudou a vencer. Espero que nosso caminho continue entrelaçado por toda nossa vida, pois uma amiga como você é um tesouro raro que não quero perder.

Às amigas Tainá Dorado, Julia Macedo e Adna Omote, que sempre me apoiaram e, mesmo longe, estiveram comigo quando precisei.

Ao meu amigo Henrique Bueno Ruiz, pela ajuda nas coletas. Sem você, tudo teria sido muito mais difícil.

Ao Fernando Moraes e ao Tiago Signorini, por tantos momentos felizes, por tantas alegrias divididas.

Aos amigos que dividiram o Laboratório durante as pesquisas.

À Fernanda Errero, pela paciência em todos os ensinamentos e ao meu grande amigo, Lucas Baumgartner, pela ajuda no Photoshop e pelas alegrias proporcionadas em momento de desespero. Vocês estarão sempre em meu coração.

Enfim, grandemente agradeço a todos que contribuíram, durante toda a minha vida, para o meu crescimento humano e intelectual.

## **BIOGRAFIA**

LIGIA MAGRINELLI BARBOSA, filha de Charles Martins Barbosa e de Vera Alice Magrinelli Barbosa, nasceu em 01 de junho de 1986, na cidade de São Paulo, estado de São Paulo.

No ano de 2000, concluiu o Ensino Fundamental, no Colégio Coração de Jesus, na cidade de Cuiabá, estado do Mato Grosso.

Concluiu o Ensino Médio, em 2003, no Colégio Isaac Newton, cidade de Cuiabá, estado do Mato Grosso.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em março de 2005, na Universidade Federal do Mato Grosso, estado do Mato Grosso, obtendo o título de Licenciado em Ciências Biológicas em março de 2009.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, Brasil.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Estudos citogenéticos em Heptapteridae.....	4
2.2. Estudos citogenéticos no gênero <i>Pimelodella</i> .....	5
2.3. Estudos citogenéticos no gênero <i>Imparfinis</i> .....	7
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
3.1. Coletas das amostras .....	9
3.2. Áreas de estudo .....	9
3.3. Análises citogenéticas.....	12
3.3.1. Estimulação de mitoses .....	12
3.3.2. Bandeamentos cromossômicos .....	13
3.3.2.1. Técnica de nitrato de prata (AgNOR) - Howell e Black (1980)	13
3.3.2.2. Bandeamento C - Summer (1972) .....	13
3.3.3. Medidas cromossômicas .....	13
3.3.4. Montagem dos cariótipos.....	14
3.4. Análises de citogenética molecular.....	14
3.4.1. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência–FISH.....	14
3.4.1.1. Obtenção e marcação das sondas.....	14
3.4.2. Processamento das imagens.....	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>16</b>
4.1. Estudos citogenéticos em <i>Pimelodella</i> .....	16
4.2. Estudos citogenéticos em <i>Imparfinis</i> .....	16
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>25</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>27</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (a) Exemplar de *Pimelodella taenioptera*; (b) Exemplar de *Pimelodella* sp.; (c) Exemplar de *Imparfinis schubarti*..... 10
- Figura 2 - Mapa representativo do rio Cuiabá, com os locais de coleta da espécie *Pimelodella* sp. e do rio Aricá Mirim, de onde foram coletados os exemplares de *Pimelodella taenioptera*..... 11
- Figura 3 - Mapa hidrográfico do Paraná, demonstrando o rio Ivaí e a cidade de Umuarama, de onde foram coletados os exemplares de *Imparfinis schubarti*..... 12
- Figura 4 - (a) Cariótipo de *Pimelodella* sp. submetido à coloração com Giemsa; (b) padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em destaque, o par 14, região organizadora de nucléolo (Ag-NOR)..... 18
- Figura 5 - (a) Cariótipo de *Pimelodella taenioptera* submetido à coloração com Giemsa; (b) padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em destaque, o par 14, região organizadora de nucléolo (Ag-NOR). . 19
- Figura 6 - (a) Cariótipo de *Pimelodella* sp. submetido à técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S. (b) Cariótipo de *Pimelodella taenioptera* submetido à técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sondas de DNAr 18S ..... .20
- Figura 7 - (a) Cariótipo de *Imparfinis schubarti* submetido à coloração com Giemsa; (b) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em destaque, o par 1, região organizadora de nucléolo (Ag-NOR) ... .23
- Figura 8 - Cariótipo de *Imparfinis schubarti* submetido à técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sondas de DNAr 18S ..... .24



## RESUMO

BARBOSA, Ligia Magrinelli, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Caracterização citogenética de espécies da família Heptapteridae (Teleostei, Siluriformes) das bacias dos rios Cuiabá (MT) e Ivaí (PR).** Orientadora: Isabel Cristina Martins dos Santos. Coorientadores: Ana Luiza de Brito Portela Castro e Erasmo Renesto.

A família Heptapteridae é endêmica da região neotropical, porém suas relações filogenéticas não estão bem estabelecidas e os estudos citogenéticos são ainda escassos. Neste trabalho, foram realizados estudos cariotípicos em exemplares de *Pimelodella* sp. e *Pimelodella taenioptera* da sub-bacia do rio Cuiabá, no Mato Grosso, e *Imparfinis schubarti* da sub-bacia do rio Ivaí, no Paraná. O número diplóide de *Pimelodella* sp. foi de 46 cromossomos, com um cariótipo composto por  $26m+10sm+10st$  e  $NF = 92$ . Esta espécie apresentou uma constrição secundária no braço curto do par 14 (submetacêntrico), coincidindo com a região organizadora de nucléolo. Um heteromorfismo no tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos também foi observado. A técnica de FISH, utilizando sondas de DNAr 18S, mostrou marcações equivalentes às obtidas por meio de nitrato de prata. O padrão de heterocromatina constitutiva desta espécie consistiu de marcações teloméricas e centroméricas discretas. Foi observado um bloco intersticial heterocromático bem definido no braço longo do par 14 (submetacêntrico). A análise citogenética de *Pimelodella taenioptera* mostrou um número diplóide de  $2n=52$  cromossomos, com um cariótipo composto por  $26m+22sm+4st$  e  $NF=104$ . *Pimelodella taenioptera* possui um sistema de NORs simples, localizado no braço curto, em posição terminal do par submetacêntrico 14, conforme evidenciado pelo FISH, utilizando sondas de DNAr 18S. Esta espécie apresentou um padrão de heterocromatina com marcações teloméricas, pericentroméricas e intersticiais, no entanto, as marcações intersticiais foram mais frequentes. Todos os espécimes analisados de *Imparfinis schubarti* possuem número cromossômico de  $2n=58$  e um cariótipo composto por  $28m+28sm+2st$ , com número fundamental 116. Foi observada uma constrição secundária intersticial no braço longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos e foram observadas Ag-NORs na mesma região. O padrão de banda C de *I. schubarti* é menos evidente, mostrando uma marcação

pericentromérica bem definida no primeiro par metacêntrico, coincidente com a NOR. A hibridização *in situ* com sonda de DNAr 18S confirmou a localização da NOR na constrição secundária do primeiro par metacêntrico. Existem poucos estudos citogenéticos em espécies da família Heptapteridae, principalmente sobre a região Centro-Oeste do Brasil, fato que justifica a importância deste trabalho como contribuição ao conhecimento citogenético de espécies da família Heptapteridae da citada região.

**Palavras-chave:** citogenética, Heptapteridae, bacia, rio Paraná, rio Cuiabá.

## ABSTRACT

BARBOSA, Ligia Magrinelli, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2012. **Cytogenetic characterization of species of the family Heptapteridae (Siluriformes, Pimelodidae) of the Cuiabá (MT) and Ivaí (PR) rivers basins.** Adviser: Isabel Cristina Martins dos Santos. Committee Members: Ana Luiza de Brito Portela Castro and Erasmo Renesto.

The Heptapteridae family is endemic to the Neotropics, but their phylogenetic relationships are still not well established, and cytogenetic studies are still scarce. In this work, cytogenetic studies were made on specimens of *Pimelodella sp* and *Pimelodella taenioptera* from Cuiabá river basin, MT and *Imparfinis schubarti* from Ivaí river basin, PR. The diploid number of *Pimelodella sp* individuals was 46 chromosomes, with a karyotype composed of 26m+10sm+10st and NF=92. This specie presented a secondary constriction in the 14<sup>th</sup> pair (submetacentric) coinciding with the nucleolar organization region. A heteromorphism in NOR size between homologous chromosomes was also observed. FISH using 18S rDNA probes showed marks equivalent to those obtained by silver nitrate. The constitutive heterochromatin pattern of this specie showed weak telomeric and centromeric markings. However, this specie presented a well-defined interstitial heterochromatin block on the short arms of the 14<sup>th</sup> pair (submetacentric). The cytogenetic analysis of *Pimelodella taenioptera* showed a diploid number of 2n = 52 chromosomes with a karyotype composed of 26m+22sm+4st and NF=104. *Pimelodella taenioptera* had a simple NOR system in the terminal position of the short arm of a submetacentric pair number 14, as evidenced by FISH using 18S rDNA probes. This species presents a heterochromatin pattern with telomeric, pericentromeric and interstitial labeling; however the interstitial labeling were more frequently. All *Imparfinis schubarti* specimens analyzed had a 2n=58 chromosome number and a karyotype of 28m+28sm+2st, with a fundamental number of 116. A conspicuous secondary constriction was seen in the long arm of the first metacentric chromosome pair. The Ag-NORs were observed in the same region. C-banding of *I. schubarti* was less evident, showing a well-defined pericentromeric mark in the first metacentric pair, that is the NOR-bearing. *In situ* hybridization with 18S rDNA probe confirmed the NOR location in the secondary constriction of the first metacentric chromosome. There are few cytogenetic studies in species of the Heptapteridae family, especially when it

comes to the Midwest region of Brazil. This work brings a contribution to the cytogenetic knowledge of species of the Heptapteridae family in the Midwest region of Brazil.

**Key words:** citogenetics, Heptapteridae, Cuiabá and Ivaí rivers basins.

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam o grupo mais diversificado dentre os vertebrados, com cerca de 28.000 espécies e considerado um dos mais interessantes para estudos da genética e de evolução (Nelson, 2006). A última revisão sobre a ictiofauna neotropical de água doce (Reis et al., 2003) inclui 71 famílias e 4475 espécies reconhecidamente válidas. Esse levantamento indica que a diversidade de espécies é maior que se supunha, sugerindo que nessa região possam existir 6.000 espécies de água doce e em todo mundo cerca de 13.000 espécies.

O estudo citogenético dos peixes neotropicais tem se expandido consideravelmente nos últimos anos, principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados (Malabarba et al., 1998). Entretanto, as relações filogenéticas dentro de muitos grupos necessitam ainda de um melhor esclarecimento. Na região neotropical, as duas ordens mais representativas em número de espécies de peixes são Characiformes e os Siluriformes (Lowe-McConnell, 1999).

Os primeiros dados sobre a estrutura cariotípica de peixes neotropicais foram descritos por Jim e Toledo, em 1975, quando apresentaram o cariótipo de duas espécies de *Astyanax*. Em 1988, Oliveira e colaboradores listaram dados citogenéticos disponíveis para 433 espécies de peixes. Em uma revisão mais recente, foram mostrados números diplóides e/ou haplóides para 3.425 espécies, pertencentes a 53 ordens e 269 famílias de peixes, com registro de grande diversidade cariotípica (Arai, 2011). Os números diplóides de cromossomos de peixes apresentam uma variação que ocorre desde  $2n = 20$  em *Nothobranchius rachovii* a  $2n = 372$  para *Acipenser brevirostrum* (Arai, 2011). Estes dados incluem, além de números e fórmulas cromossômicas, informações sobre cromossomos sexuais, presença de cromossomos supranumerários, padrões de heterocromatina constitutiva e número e distribuição de regiões organizadoras de nucléolos.

A ordem Siluriformes compreende aproximadamente 2.600 espécies, distribuídas em 36 famílias (Ferraris, 2007). Os Siluriformes, popularmente conhecidos como bagres, cascudos, mandis ou peixe-gato, são os peixes mais amplamente distribuídos dentro da Superordem Ostariophysi. A maior diversidade de

bagres ocorre em regiões tropicais, especialmente na América do Sul, África sub-Saara e sudeste da Ásia (Malabarba, 1998).

Os Siluriformes são peixes que geralmente habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e a vegetação. Possuem formas e tamanhos extremamente variados, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos (Paxton e Eschmeyer, 1995). Sua distribuição parece ser limitada pela temperatura, uma vez que a maioria habita as regiões tropical e neotropical e a minoria alcança o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 2006).

Dentro da ordem Siluriformes, a família Heptapteridae compreende peixes de couro de pequeno e médio porte. Lundberg et al. (1991) e Pinna (1998) verificaram a ocorrência de três grupos monofiléticos dentro da família Pimelodidae, correspondendo às subfamílias Pimelodinae, Heptapterinae (Rhamdiinae) e Pseudopimelodinae, mas estas foram elevadas à categoria de família por Ferraris (2007). Os heptapterídeos são peixes conhecidos vulgarmente como bagres. São compostas por 26 gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparales*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Phreatobius*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia*, sendo esta família constituída por 189 espécies, das quais 52 ainda não foram descritas (Bockmann e Guazelli, 2003).

Os heptapterídeos são endêmicos da região neotropical, sendo um dos componentes mais representativos da ordem Siluriformes da América Central e do Sul, como, por exemplo, os gêneros *Pimelodella* e *Rhamdia*. Esta família inclui espécies de pequeno porte. Os adultos raramente ultrapassam o tamanho de 20cm e 60% das espécies apresentam um comprimento médio de 10 cm. Ecologicamente, os heptapterídios não diferem da maioria dos Siluriformes. A maioria possui hábitos noturnos, tendem a ser solitários ou vivem em pequenos grupos de até 10 indivíduos. Geralmente, não apresentam dimorfismo sexual, ou podem tê-lo escassamente desenvolvido (Moraes, 2007).

*Pimelodella* é um dos gêneros mais especiosos da família Heptapteridae, com aproximadamente 60 espécies (Burguess, 1989). A principal característica

morfológica deste gênero é a presença de uma linha horizontal escura que se estende do focinho até a base do pedúnculo caudal.

O gênero *Imparfinis* compreende aproximadamente 28 espécies (Lundberg et al., 1991; Bockmann, 1994) e são peixes neotropicais endêmicos, encontrados nas nascentes de muitos rios na América Central e na América do Sul. Os seus representantes são de pequena dimensão e possuem hábitos bentônicos e noturnos (Castro e Cassati, 1997).

As relações filogenéticas na família Heptapteridae ainda não são bem conhecidas (Reis et al., 2003) e estudos citogenéticos recentes em Heptapteridae têm sido realizados para determinar a filogenia da família e fornecer grandes rearranjos na classificação do grupo, bem como reconhecer o nome correto de alguns taxa, uma vez que a taxonomia das espécies é pouco desenvolvida e bastante confusa em seus gêneros (Bockmann e Guazzelli, 2003).

A análise e a caracterização da macro e microestrutura cromossômica dos diferentes gêneros da família Heptapteridae encontrados na sub-bacia do rio Cuiabá e na sub-bacia do rio Ivaí contribuirão para um melhor conhecimento dos mesmos, pois a identificação taxonômica ainda é muito confusa.

O presente estudo tem como objetivo caracterizar citogeneticamente três espécies pertencentes à família Heptapteridae, *Pimelodella* sp., *Pimelodella taenioptera* e *Imparfinis schubarti*, verificando a distribuição da heterocromatina constitutiva e a localização das regiões organizadoras nucleolares, por meio da impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) e pela confirmação mediante FISH, contribuindo, dessa forma, para a elucidação dos processos evolutivos recorrentes no grupo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Estudos citogenéticos em Heptapteridae

Os estudos citogenéticos em peixes têm levado à caracterização do número cromossômico e do cariótipo de muitas espécies e levantado a uma considerável soma de informações relativas à presença e distribuição da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (NORs). Além das técnicas citadas serem fundamentais para a caracterização citogenética básica de qualquer organismo, uma grande parte das informações obtidas com seu emprego tem sido analisadas sob uma abordagem evolutiva. Nos últimos anos, a citogenética de peixes tem se expandido significativamente, principalmente a partir da aplicação de técnicas de bandeamento, que, embora utilizadas como rotina nas pesquisas de citogenética humana e de mamíferos, apresentavam dificuldades de adaptação aos cromossomos de peixes. A introdução dessas técnicas, como os bandeamentos C e G, o uso de fluorocromos e a incorporação de análogos de bases do DNA no ciclo celular ao estudo dos cromossomos dos peixes, tem fornecido importantes resultados na comparação entre espécies próximas (Sola et al., 1981; Almeida-Toledo et al., 1988), na visualização de estados iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais (Phillips e Ihssen, 1985) e na identificação do padrão de replicação dos cromossomos (Delany e Bloom, 1984).

Os primeiros estudos citogenéticos no Brasil envolvendo representantes da família Heptapteridae foram realizados por Toledo e Ferrari (1976), os quais analisaram espécies pertencentes aos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdia*. Entretanto, atualmente, os dados citogenéticos dos representantes desta família são escassos, e apenas uma pequena parte das espécies possui dados referentes à aplicação de técnicas citogenéticas mais recentes, como a coloração por fluorocromos base-específicos e a hibridação *in situ* fluorescente.

A família Heptapteridae é marcada por uma acentuada variabilidade cariotípica, com o número diplóide variando entre 42 (*Imparfinis hollandi*, Margarido e Moreira-Filho, 2008) a 62 cromossomos (*Rhamdia hilarii*, Toledo e Ferrari, 1976). Vários estudos têm sido desenvolvidos dentro da família, porém, dos 26 gêneros, apenas sete foram estudados: *Cetopsorhamdia*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Pariolius*, *Pimelodella*, *Rhamdella* e *Rhamdia*. O cariótipo dessa família é constituído



principalmente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, ocorrendo em menor quantidade cromossomos dos tipos subteloecêntricos e acrocêntricos, mantendo, assim, um elevado número fundamental, como em *Imparfinis schubarti* (Kantek et al., 2009) com NF = 116, *Pimelodella aff. avanhandavae* (Swarça et al., 2003) com NF = 104, entre outros.

Nesta família, a região organizadora de nucléolos (NOR), geralmente, apresenta-se em apenas um par cromossômico. Em relação ao padrão de banda C, apresenta pouca heterocromatina constitutiva, distribuída normalmente em regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas. Há poucos dados em relação à técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com sonda de DNAr 18S, porém, na maioria dos estudos feitos, a região organizadora de nucléolos foi coincidiu com a observada no tratamento com nitrato de prata.

Na família Heptapteridae, também tem sido observada a presença de cromossomos supranumerários ou Bs, encontrados principalmente no gênero *Rhamdia*. Entretanto, uma ocorrência de cromossomos supranumerários foi descrita em *Pimelodella* sp. (Garcia e Almeida-Toledo, 2010) e *P. kronei* (Almeida-Toledo et al., 1992). Descrições de triploidia para três espécies do gênero *Rhamdia* também já foram relatadas por Roman et al. (2002), Garcia et al. (2003) e Tsuda (2005), evidenciando uma variabilidade cariotípica ainda maior neste grupo.

## **2.2. Estudos citogenéticos no gênero *Pimelodella***

Os dados citogenéticos disponíveis até agora no gênero *Pimelodella* mostram uma variação do número diplóide: com  $2n = 46$  cromossomos, relatado na maioria das espécies analisadas (Garcia e Almeida-Toledo, 2010);  $2n = 52$  cromossomos (Swarça et al., 2003); e  $2n = 58$  cromossomos (Garcia e Almeida-Toledo, 2010). Vários autores se referem a  $2n = 56 + 2$  cromossomos como o número diplóide ancestral para os Siluriformes (Oliveira e Gosztonyi, 2000), porém o número diplóide  $2n = 46$  é o mais freqüente dentro do gênero *Pimelodella*. Vários autores têm relatado classificações incertas devido à falta de definição de nomes específicos e isso pode levar ao estudo da mesma espécie por várias vezes, mas com diferentes denominações.

Em relação à presença de cromossomos sexuais neste grupo de peixes, um caso foi descrito por Dias e Foresti (1993) para a população de *Pimelodella* sp. O

trabalho destes pesquisadores evidenciou um possível sistema cromossômico sexual do tipo XX/XY. Mais recentemente, Garcia e Almeida-Toledo (2006), analisando uma população de *Pimelodella boschmai* (Araras-SP), encontraram um possível sistema cromossômico sexual múltiplo, do tipo X1X1X2X2/X1Y1X2Y2. Garcia e Almeida-Toledo (2010) também relataram em *P. boschmai* (Mogi-Guaçu-SP) um sistema único de sexo cromossômico do tipo XX/XY, onde o X é um metacêntrico pequeno e Y é metacêntrico médio.

Com relação à heterocromatina constitutiva, Vasconcelos e Martins-Santos (2000) observaram bandas heterocromáticas fracas em posição centromérica e telomérica, além de RONS banda C positivas em *Pimelodella* sp.1 e *Pimelodella* sp.2 do Rio Paraná. Swarça et al. (2003), estudando *P. aff. avanhandavae* do Rio Tibagi (PR), observaram pouca heterocromatina distribuída pelo complemento e a presença de marcações teloméricas fortes em um par de metacêntricos. Bloco de heterocromatina intersticial foi observado também em *Pimelodella gracilis* (Garcia e Almeida-Toledo, 2010).

NOR simples tem sido um caráter relativamente frequente em *Pimelodella* localizados, principalmente, em cromossomos do tipo submetacêntricos. Porém, podem ocorrer variações quanto ao tipo cromossômico.

Novas técnicas também tem sido utilizadas e, entre elas, destaca-se a hibridação *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S. Swarça et al. (2003) e Vidotto et al. (2004) utilizaram sondas de DNAr 18S em estudos com populações de *Pimelodella aff. avanhandavae* e *Pimelodella meeki*, respectivamente. Os resultados obtidos em ambos os trabalhos evidenciaram a coincidência com as marcações obtidas pela técnica de impregnação por nitrato de prata, ou seja, evidenciando marcações NOR simples. Estudos envolvendo o mapeamento de genes ribossomais 5S em peixes têm mostrado resultados variáveis em relação ao número e localização deste marcador (Galleti Jr. e Martins, 2004). O tratamento com o fluorocromo cromomicina A3 (CMA3) tem sido também amplamente utilizado. As análises feitas em *Pimelodella aff. avanhandavae* (Swarça et al., 2003), *Pimelodella meeki* (Vidotto et al., 2004), *Pimelodella boschmai*, *P. gracialis*, *P. lateristriga*, *P. meeki* e *Pimelodella* sp. (Garcia e Almeida-Toledo, 2010) revelaram a região organizadora de nucléolo CMA3+. Esses resultados indicam que estas regiões são ricas em pares de base G-C.

### 2.3. Estudos citogenéticos no gênero *Imparfinis*

As espécies estudadas para o gênero *Imparfinis* demonstraram número diplóide variado: 42 cromossomos em *Imparfinis hollandi* (Margarido e Moreira-Filho, 2008), 56 em *Imparfinis* cf. *piperatus* (Vissoto et al., 2001) e 58 em *Imparfinis mirini* (Vissoto et al., 2000), *Imparfinis piperatus* (Vissoto et al., 2001), *Imparfinis* aff. *schubarti* (Fenochio et al., 2003; Stolf et al., 2004) e *Imparfinis schubarti* (Kantek et al., 2009). O valor de  $2n = 42$  é o menor número diplóide encontrado na família Heptapteridae. Estes dados sugerem que extensos rearranjos cromossômicos estejam envolvidos na especiação dentro deste grupo (Swarça et al., 2007). Rearranjos cromossômicos, como fusões, podem ter sido os responsáveis pela redução de 58 para 42 cromossomos observados em *Imparfinis hollandi* (Margarido e Moreira-Filho, 2008).

O número diplóide de  $2n = 58$  é o número mais comum dentro do gênero *Imparfinis*. Este gênero, como em muitos dos Siluriformes, também se caracteriza pela predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e altos valores de FN. Um número fundamental alto é característica dos Siluriformes e, de acordo com Oliveira e Gostonyi (2000), corresponde a uma condição plesiomórfica (traços primitivos) amplamente distribuída neste grupo de peixes.

No gênero *Imparfinis*, análises da distribuição de heterocromatina constitutiva demonstraram a existência de marcações heterocromáticas centroméricas, teloméricas e pericentroméricas. Em *I. piperatus* (Vicente et al., 1994) e em *I. cf. piperatus* (Fenocchio, 1993), ainda foram observadas regiões heterocromáticas que correspondiam as RONS e também blocos C positivos intersticiais. Estudo feito por Vissoto (2000) em *I. mirini* identificou um polimorfismo envolvendo blocos heterocromáticos em cinco populações. Pode-se observar que, dependendo da população, o décimo par cromossômico poderia ser formado por dois cromossomos submetacêntricos (presença de um bloco heterocromático terminal em ambos os cromossomos), um cromossomo metacêntrico e um submetacêntrico (bloco heterocromático em apenas um cromossomo) ou dois cromossomos metacêntricos (ausência do bloco heterocromático).

Um sistema de NOR simples e em posição intersticial no braço longo, envolvendo diferentes tipos de cromossomos, é uma característica comum no gênero *Imparfinis*. Em relação aos demais gêneros da família Heptapteridae,

*Cetopsorhamdia* e *Imparfinis* são os únicos que apresentam NORs em posição intersticial (Fenocchio et al., 2003).

Stolf et al. (2004), estudando indivíduos pertencentes à espécie *Imparfinis* aff. *schubarti*, evidenciaram que a aplicação de cromomicina A3 (CMA3) resultou em marcações fluorescentes correspondentes às RONS. Essa correspondência entre CMA3 e AgNOR é freqüentemente observada em peixes, demonstrando que NORs são ricas em pares de bases G-C. O tratamento com o fluorocromo DAPI (A-T específico), geralmente, leva a um padrão de coloração uniforme nos cromossomos. Stolf et al. (2004), Kantek et al. (2009) e Borba et al. (2012) fizeram a aplicação da sonda de DNAr 18S em espécies do gênero *Imparfinis* e esta confirmou a existência de apenas um único par cromossômico contendo cístrons ribossômicos.

Ainda há poucas informações referentes à localização do gene 5S. Em peixes neotropicais, os dados obtidos são bastante variáveis entre as diferentes espécies, demonstrando que estes genes podem estar presentes em um par cromossômico, ou em mais pares; nos cromossomos nucleolares (Kavalco et al., 2004) ou em outros (Vicente et al., 2001).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coletas das amostras

Foram coletados oito exemplares da espécie *Imparfinis schubarti* da sub-bacia do rio Ivaí, PR; 18 exemplares de *Pimelodella taenioptera* e 12 de *Pimelodella* sp. da sub-bacia do rio Cuiabá, MT, todas pertencentes à família Heptapteridae (Figura 1). Os exemplares coletados na sub-bacia do Rio Cuiabá, MT, foram processados na Universidade Federal do Mato Grosso, no Laboratório de Citogenética de Peixes, conforme parceria estabelecida com docente desta instituição. As espécies coletadas em rios próximos a Umuarama foram mantidos no laboratório da UEM-PR, em aquários aerados, até os procedimentos citogenéticos.

#### 3.2. Áreas de estudo

O rio Cuiabá é tributário do rio Paraguai, na parte superior do seu curso, e por isso é considerado parte da sub-bacia do rio Paraguai. Este se localiza na região Centro-Oeste, englobando parte de Mato Grosso e uma pequena porção do norte de Mato Grosso do Sul. Com 919 km de extensão, o rio Cuiabá nasce no município de Rosário do Oeste e passa a ser chamado de rio Cuiabá somente após o encontro das águas do rio Manso com o rio Cuiabazinho, que é formado pela confluência dos rios Cuiabá da Larga e Cuiabá Bonito. No seu alto curso, recebe os rios Manso e Casca, ambos pela margem esquerda.

O rio Cuiabá e seus tributários apresentam, à montante da cidade de Cuiabá, diversas cachoeiras e, à jusante, no trecho até Santo Antonio de Leverger, a partir desta cidade, seu leito se amplia, formando imensas áreas alagáveis. À jusante da cidade de Santo Antônio de Leverger, quando se abrem as grandes planícies alagáveis do Pantanal do Mato Grosso, recebe pela margem esquerda os rios Aricá - Açu ou Grande - e o Aricá Mirim. Como é um rio de curso meândrico, alterna processos naturais de erosão e de deposição. A erosão ocorre nas curvas convexas, ocasionando a formação de poços resultantes do aprofundamento de seu leito. Normalmente, o peixe pára nesses poços, sendo assim um lugar muito utilizado para a pesca.

A área de estudo localiza-se numa cidade próxima a Cuiabá, denominada Santo Antônio do Leverger. A espécie *Pimelodella* sp. foi coletada na comunidade do Poço, a 6Km de Santo Antônio do Leverger. Essa espécie foi coletada em poços fundos presentes na margem esquerda do rio Cuiabá. Os 18 exemplares de *Pimelodella taenioptera* foram coletados em um afluente do rio Cuiabá, o rio Aricá Mirim (Figura 2).

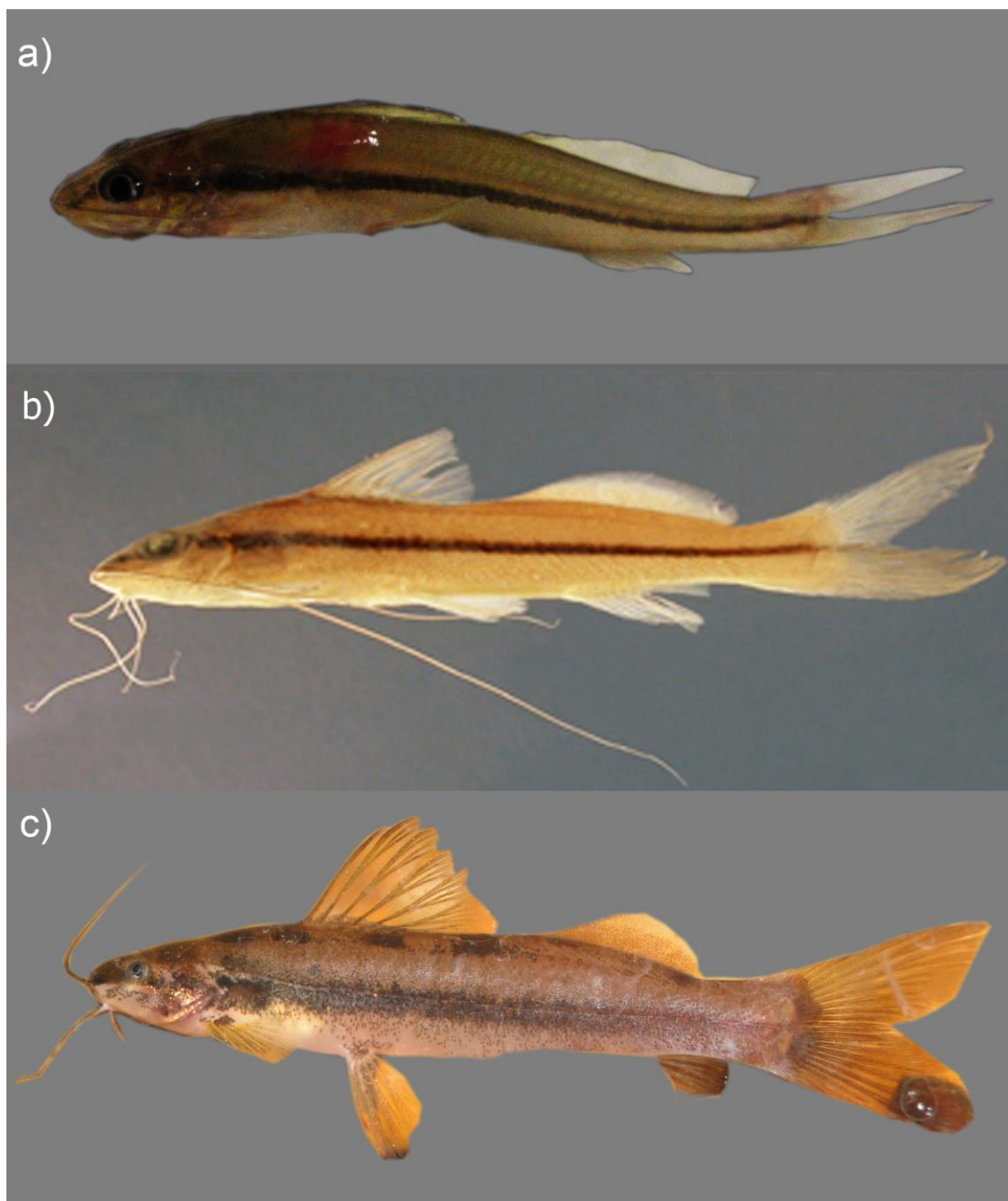


Figura 1 -(a) Exemplar de *Pimelodella taenioptera*; (b) Exemplar de *Pimelodella* sp.; (c) Exemplar de *Imparfinis schubarti*.

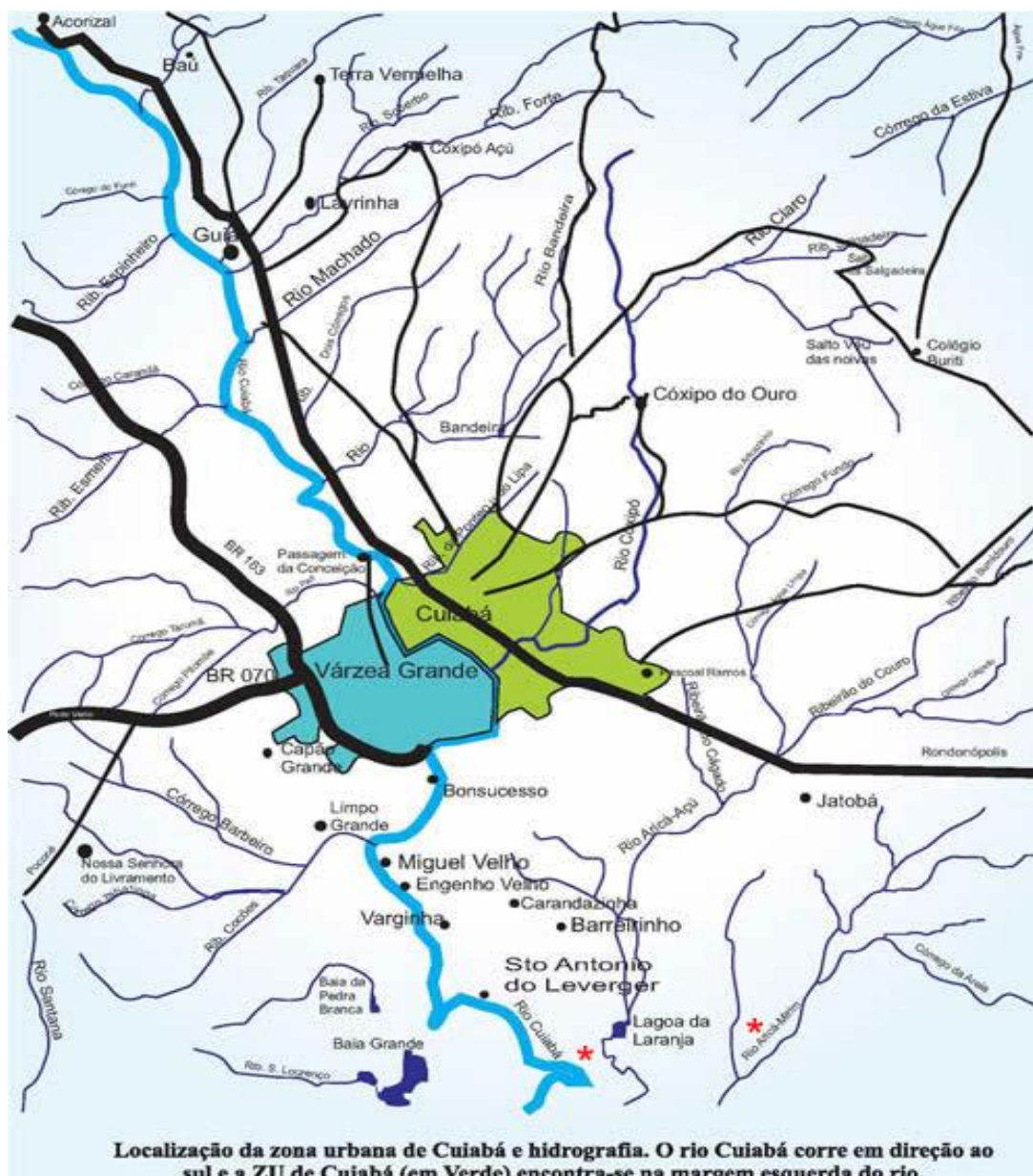


Figura 2 - Mapa representativo do rio Cuiabá, com os locais de coleta da espécie *Pimelodella* sp. e do rio Aricá Mirim, de onde foram coletados os exemplares de *Pimelodella taenioptera*.

O rio Ivaí é tributário do rio Paraná e por isso é considerado como pertencente à sub-bacia do rio Paraná. O rio Ivaí banha o estado do Paraná em toda a sua extensão e nasce no município de Prudentópolis, na região centro-sul do Estado do Paraná, por meio da confluência das águas do rio dos Patos com o rio São João. Após percorrer inúmeros municípios do estado do Paraná, o rio Ivaí deságua em um braço do rio Paraná. A rede de drenagem possui mais de 100 afluentes, sendo um deles o rio Piava, localizado na cidade de Umuarama-PR, local onde foram coletados os 8 exemplares da espécie *Imparfinis schubarti* (Figura 3).

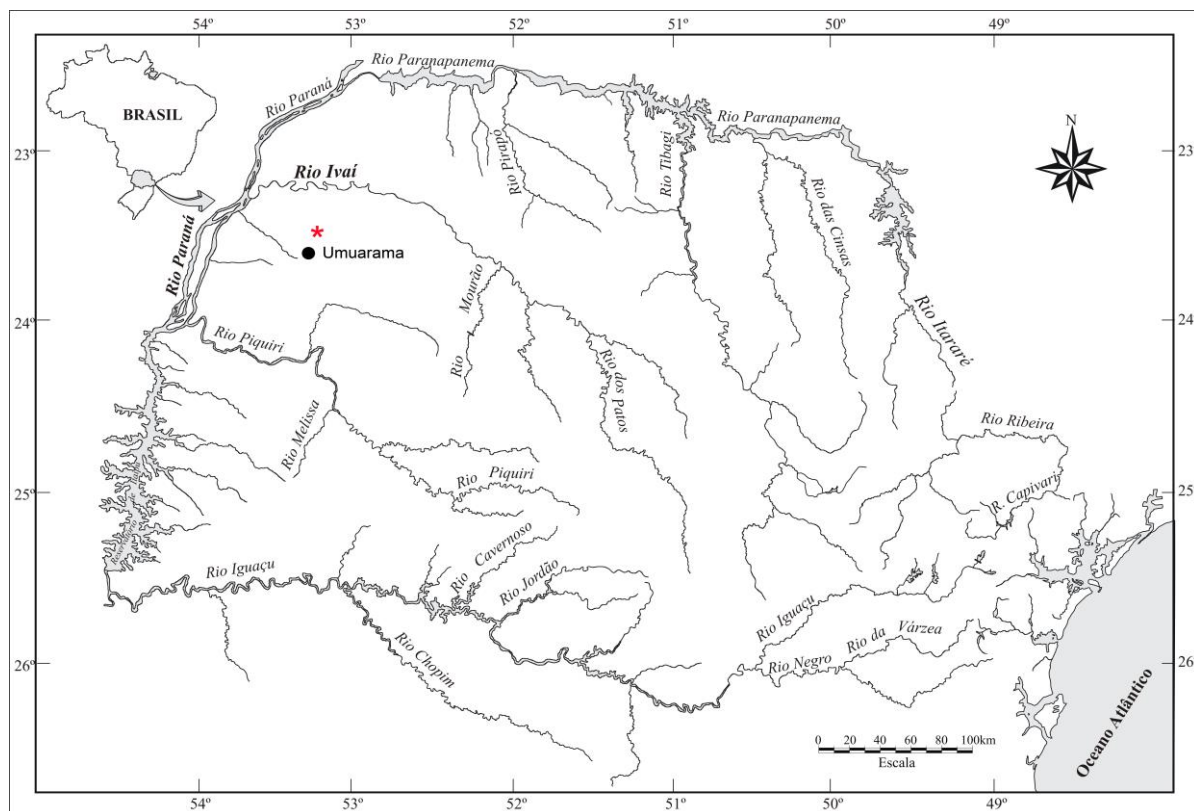


Figura 3 - Mapa hidrográfico do Paraná, demonstrando o rio Ivaí e a cidade de Umuarama, de onde foram coletados os exemplares de *Imparfinis schubarti*

### 3.3. Análises citogenéticas

As análises citogenéticas de cromossomos mitóticos foram realizadas com base em técnicas convencionais e de bandeamentos cromossômicos.

#### 3.3.1. Estimulação de mitoses

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos, foi utilizada a técnica “air drying”, descrita para peixes por Bertollo et al. (1978). Inicialmente, foi injetada intraperitonealmente uma solução aquosa de colchicina (0,0025%), na proporção de 1 ml/100g do peso do animal. A seguir, o peixe foi mantido em aquário bem aerado, por 30 a 60 minutos, sendo, na sequência, sacrificado, removendo-se os órgãos desejados. Após uma rápida lavagem, os fragmentos dos órgãos foram colocados em solução hipotônica de KCl (0,075), em uma cuba de vidro, transferindo-os na sequência para outra cuba de vidro, contendo 8 a 10 ml de solução hipotônica (KCl a 0,075M).



### **3.3.2. Bandeamentos cromossômicos**

#### **3.3.2.1. Técnica de nitrato de prata (AgNOR) - Howell e Black (1980)**

A técnica de coloração com nitrato de prata (Ag-NOR), desenvolvida por Howell e Black (1980), consiste em, após o material ter sido processado, o mesmo é depositado sobre uma lâmina e é feita a hidrólise, por cerca de 3 minutos, em HCl 1 N, em estufa, a 60°. Terminado esse período, lava-se em água corrente e é feita a secagem ao ar. Sobre a lâmina já hidrolizada, uma gota de solução aquosa de gelatina é posta sobre estas gotas, além de uma gota de água e duas de nitrato de prata (Ag-NOR), cobrindo em seguida com lamínula. Na sequência, a lâmina é levada novamente à estufa onde permanece por cerca de 3 a 5 minutos.

#### **3.3.2.2. Bandeamento C - Summer (1972)**

A técnica de bandeamento C, desenvolvida por Summer (1972), consiste em tratar inicialmente a lâmina contendo o material com HCl, em temperatura ambiente, por 15 minutos. Em seguida, lava-se em água corrente e deixa secar. Após a secagem, procede-se à incubação em solução salina de 2xSSC a 60°C, em banho-maria por 15 minutos. Na sequência, o material é lavado e exposto novamente para a secagem, prosseguindo com o tratamento com hidróxido de bário (BaOH), em banho-maria, a 42°C. Usualmente, cora-se com Giemsa 5% ou, segundo Lui (2009), com Iodeto de propídio, na proporção de meio de montagem DABCO + 1µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM + 1µL de solução de iodeto de propídio, (50µg/mL); ou 1 µL DAPI (2µg/mL) por lâmina. Finalmente, é feita a análise da lâmina em microscópio de fluorescência. Ambos os tipos de coloração foram utilizados no presente estudo.

### **3.3.3. Medidas cromossômicas**

Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan et al. (1964), e foram classificados em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

### **3.3.4. Montagem dos cariótipos**

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), os cromossomos foram arranjados, segundo o tipo (m, sm, st e a) e em ordem decrescente de tamanho.

## **3.4. Análises de citogenética molecular**

### **3.4.1. Hibridação *in situ* por fluorescência–FISH**

#### **3.4.1.1. Obtenção e marcação das sondas**

Para a detecção dos sítios de DNAr, foram utilizadas técnicas descritas por Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado e Jouve (1994), para os indivíduos de *H. regani* e *H. cf. regani*, e a metodologia de Pinkel et. al (1986), para *Hypostomus* sp. 1. As sondas de DNAr 18S foram obtidas a partir de fragmentos clonados e amplificados de *Oreochromis niloticus*, gentilmente cedido pelo Dr. Cesar Martins da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

Técnicas descritas por Heslop-Harrison et al. (1991), com modificações de Cuadrado e Jouve (1994), utilizando a sonda de DNAr 18S e obtida a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus*, foram utilizadas para a detecção dos sítios de DNAr.

A marcação da sonda foi realizada de acordo com o método de *nick translation* utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen).

#### **3.4.2. Processamento das imagens**

Os cromossomos metafásicos mitóticos foram analisados em um fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axioshosp com captura de imagem. As imagens capturadas foram processadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop. Para a montagem do cariótipo, os cromossomos metafásicos foram fotografados em fotomicroscópio Axioskop Zeiss, acoplado a um sistema fotográfico. Depois de prontas, as imagens foram recortadas para montagem do cariótipo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudos citogenéticos em *Pimelodella*

Os espécimes de *Pimelodella* sp. analisados no presente estudo apresentaram um número diplóide de  $2n = 46$  cromossomos para machos e fêmeas, não sendo detectada a presença de cromossomos sexuais. Sua fórmula cariotípica compreende  $26m+10sm+10st$  e  $NF = 92$ . Uma constrição secundária foi observada no braço curto de um dos homólogos do par 14 (submetacêntrico) (Figura 4a). Os espécimes de *Pimelodella taenioptera* apresentaram número diplóide de  $2n = 52$  cromossomos em ambos os sexos e fórmula cariotípica constituída de  $26m+22sm+4st$  e  $NF = 104$  (Figura 5a), não apresentando cromossomos sexuais morfologicamente distinguíveis.

Diferentes números diplóides têm sido registrados para o gênero *Pimelodella*:  $2n = 46$  (*P. meeki*, Vidotto et al., 2004; *P. boschimai*, Garcia e Almeida-Toledo, 2010; *P. gracilis*, Garcia e Almeida-Toledo, 2010),  $2n = 52$  (*Pimelodella* sp., Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; *P. aff. avanhandavae*, Swarça et al., 2003) e  $2n = 58$  (*P. kronei*, Almeida-Toledo et al., 1992; *P. transitória*, Almeida-Toledo et al., 1992; *P. lateristriga*, Garcia e Almeida-Toledo, 2010). O valor  $2n = 56+2$  cromossomos é considerado número diplóide ancestral dos Siluriformes (Oliveira e Gosztonyi, 2000) e também para os heptapterídeos. Grande parte das espécies do gênero *Pimelodella* apresenta número diplóide de  $2n = 46$ , entretanto, *P. kronei* e *P. transitória* com  $2n = 58$  representariam a forma ancestral dentro do grupo (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000).

Por meio da coloração diferencial dos cromossomos por nitrato de prata, pode-se observar o posicionamento da região organizadora de nucléolo. Em *Pimelodella taenioptera*, esta região se encontra em posição terminal do braço curto do par 14 (submetacêntrico) (Figura 5a). Em *Pimelodella* sp., esta também se encontra em posição terminal do braço curto do par 14 (submetacêntrico), coincidindo com a região da constrição secundária. Ainda nesta espécie, um heteromorfismo no tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos também foi observado (Figura 4a). Na família Heptapteridae, a presença de NORs simples é a situação mais freqüente; no gênero *Pimelodella*, a NOR geralmente localiza-se em posição terminal do braço curto, podendo ocorrer variação entre as espécies quanto

ao tipo cromossômico. Exemplo disto pode ser observado em diferentes espécies do gênero *Pimelodella*, como evidenciado em *P. aff. avanhandavae* (Swarça et al., 2003), cujas NORs ocorrem na porção terminal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico. Em *P. boshimai* (Garcia e Almeida-Toledo, 2006), os sítios Ag-NORs estão localizados em um par submetacêntrico e, em *P. avanhandavae* (Vissotto et al., 1999), em um par subtlocêntrico. Heteromorfismo de tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos é comum em muitas espécies de peixes, inclusive neste gênero, como em *Pimelodella* sp. (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000), *Pimelodella aff. avanhandavae* (Swarça et al., 2003) e *Pimelodella meeki* (Vidotto et al., 2004). E também no gênero *Imparfinis*, como em *Imparfinis cf. piperatus* e *Imparfinis piperatus* (Vissotto et al., 2001) e *Imparfinis schubarti* (Stolf et al., 2004).

A utilização da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com sonda de DNAr 18S demonstrou uma marcação coincidente com aquela observada na coloração dos cromossomos com nitrato de prata tanto em *Pimelodella* sp., como em *Pimelodella taenioptera* (Figura 6a e 6b). Em *Pimelodella* sp., a coloração com nitrato de prata indicou heteromorfismo na região organizadora de nucléolo, o que foi heteromorfismo foi confirmado pela técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com sonda de DNAr 18S (Figura 6a). Esta variação no tamanho da NOR deve ser consequência do número variável dos genes de DNAr. As modificações estruturais de NORs são frequentemente atribuídas a mecanismos como *crossing-over* desigual, transposições, deleções e/ou duplicações, envolvendo os segmentos de cromossomos homólogos (Castro et al., 1998). Este resultado também foi relatado para *Pimelodella meeki* (Vidotto et al., 2004) e em *P. aff. avanhandavae* (Swarça et al., 2003).

Com o uso da técnica de bandeamento C, evidenciou-se em *Pimelodella* sp. uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, basicamente restrita ao par 14, localizando-se na região intersticial do braço longo, não coincidindo com a Ag-NOR (Figura 4b). Em *Pimelodella taenioptera*, pode-se observar uma maior quantidade de regiões heterocromáticas, localizadas em posições pericentroméricas, intersticiais e teloméricas. As bandas intersticiais ocorreram em maior número de cromossomos, envolvendo os pares 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22 e 23 (Figura 5b). Destaca-se, ainda, um grande bloco no braço longo do par 6, sendo este mais fortemente

corado em um dos homólogos, podendo ser visualizado quando os cromossomos foram corados com iodeto de propídeo na coloração de FISH 18S (Fig. 6b)..

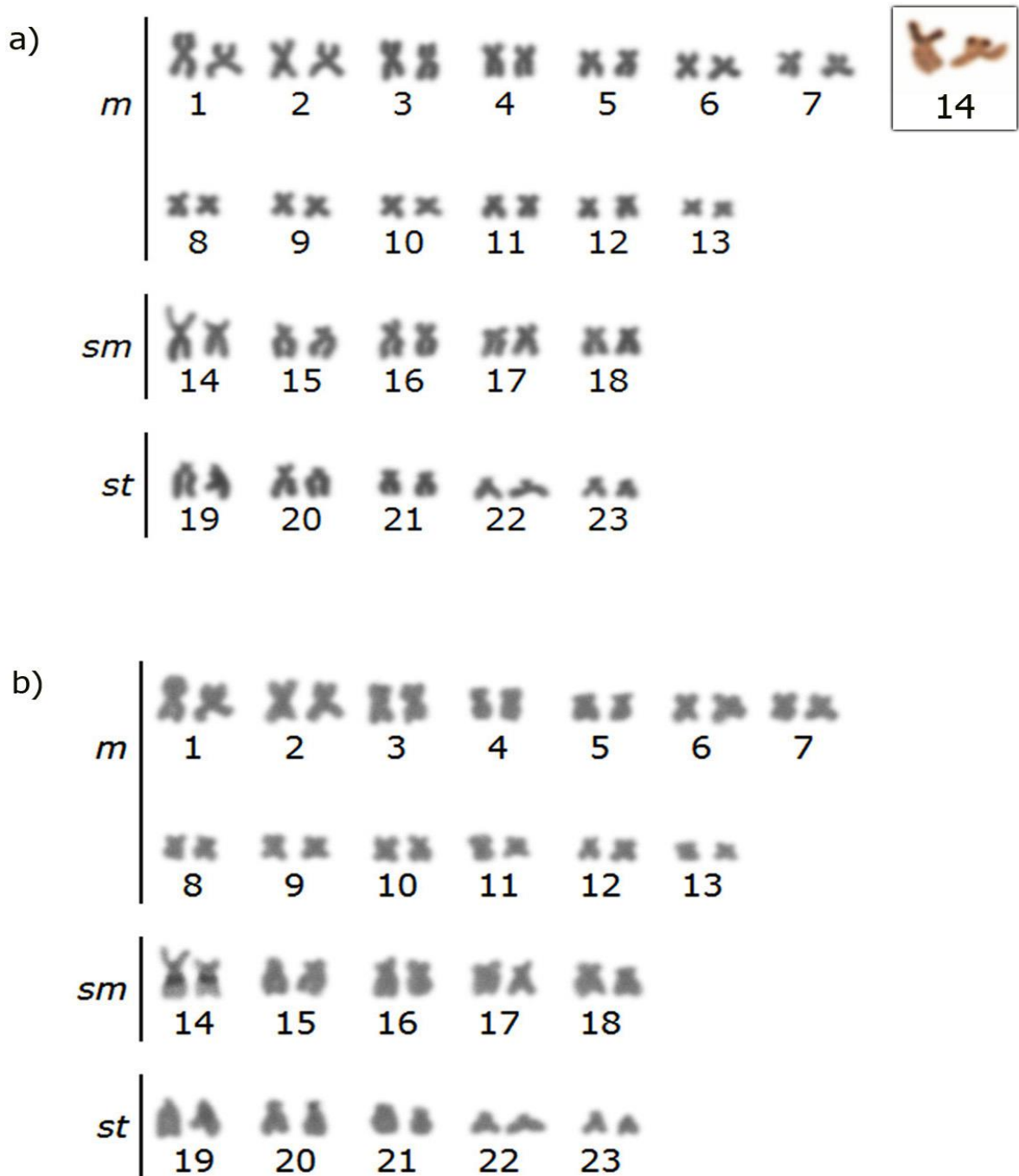


Figura 4 - (a) Cariótipo de *Pimelodella* sp. submetido à coloração com Giemsa; (b) padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em destaque, o par 14, região organizadora de nucléolo (Ag-NOR).

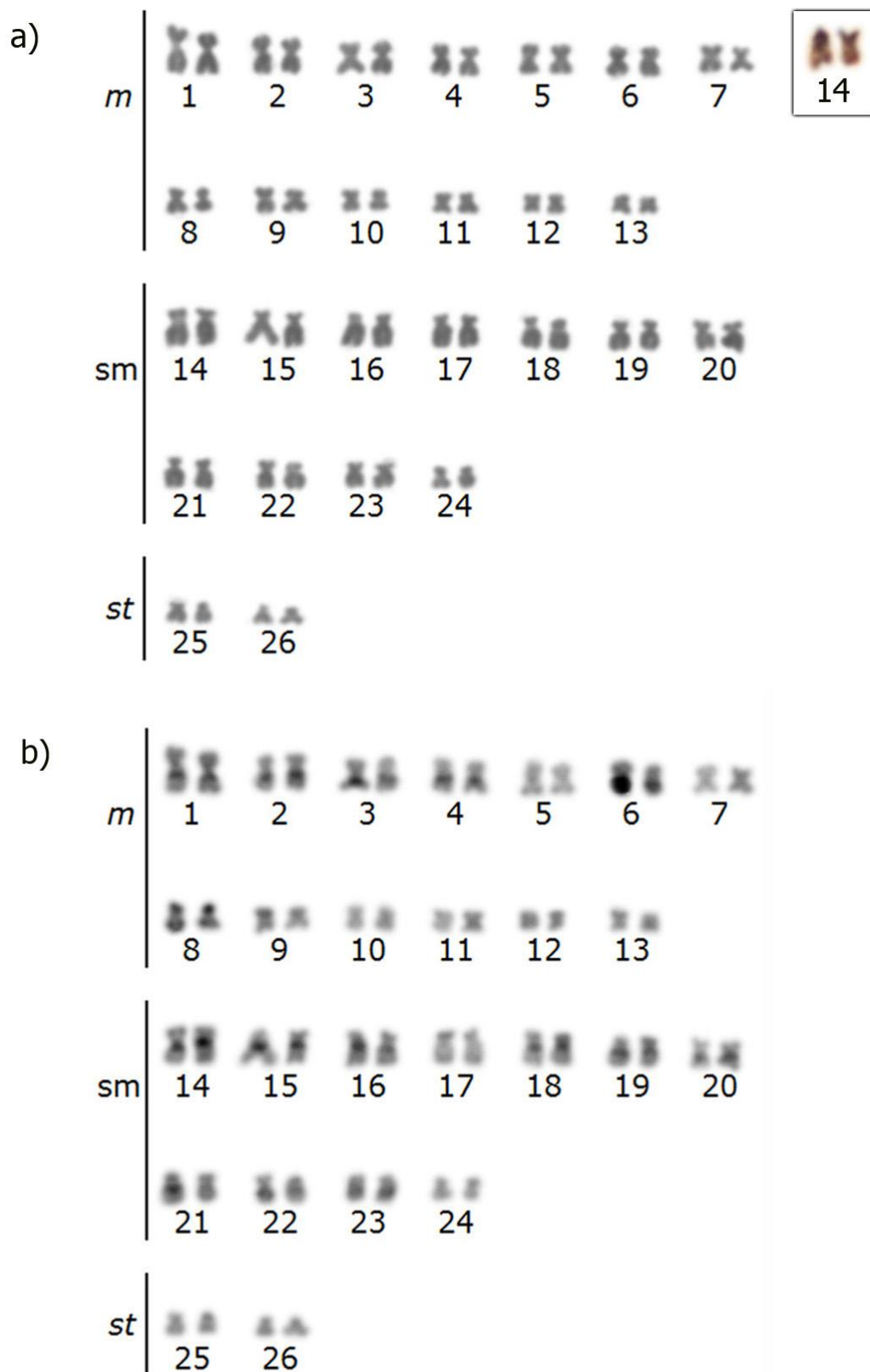


Figura 5 -(a) Cariótipo de *Pimelodella taenioptera* submetido à coloração com Giemsa; (b) padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em destaque, o par 14, região organizadora de nucléolo (Ag-NOR).

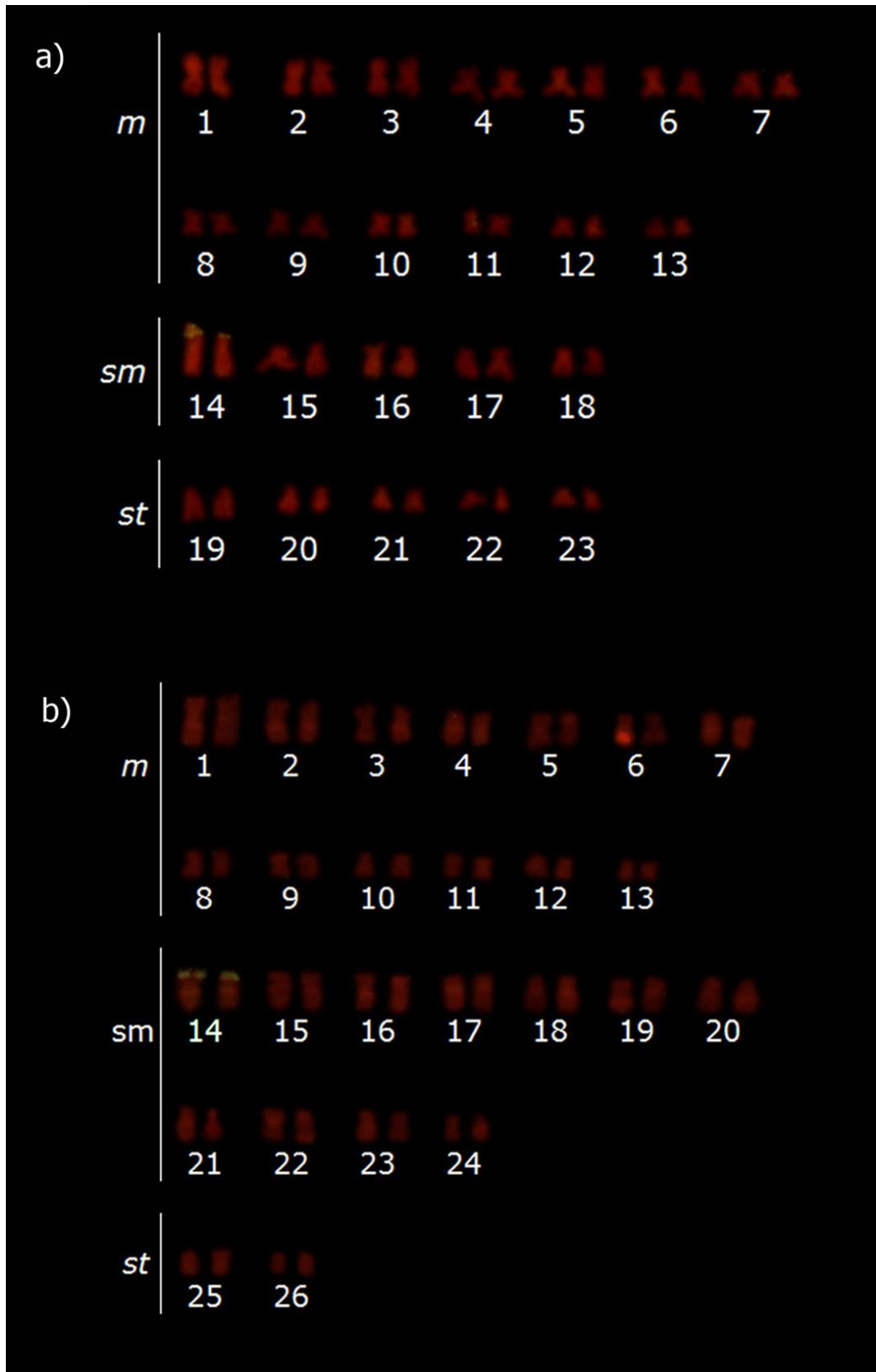


Figura 6 - (a) Cariótipo de *Pimelodella* sp. submetido à técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S. (b) Cariótipo de *Pimelodella taenioptera* submetido à técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sondas de DNAr 18S.

Geralmente, os heptapterídeos apresentam pequenas quantidades de heterocromatina, distribuídas principalmente em regiões terminais e pericentroméricas (Moraes et al., 2007). Blocos de heterocromatina em posição intersticial são menos freqüentes e são típicos de alguns gêneros, como, por exemplo, *Imparfinis* (Margarido e Moreira-Filho, 2008). Blocos de heterocromatina intersticial também foram observados em *Pimelodella gracilis* (Garcia e Almeida-Toledo, 2010), fato semelhante ao detectado no presente estudo. Uma característica interessante em relação à heterocromatina nesta família é o fato de que, em algumas espécies, como *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Swarça et al., 2003), *Pimelodella* sp.1 e *Pimelodella* sp.2 (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000), a região organizadora de nucléolo revela-se coincidente com a marcação da banda C, mas isso não ocorre nas duas espécies de *Pimelodella* estudadas.

#### **4.2. Estudos citogenéticos em *Imparfinis schubarti***

A espécie *Imparfinis schubarti* apresentou um número diplóide de  $2n = 58$  cromossomos para machos e fêmeas, não sendo detectada a presença de cromossomos sexuais. Sua fórmula cariotípica foi de  $28m+28sm+2st$  e  $NF = 116$  e uma constrição secundária foi observada no braço longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos (Figura 7a).

No gênero *Imparfinis*, o número diplóide geralmente varia de  $2n = 56$  cromossomos como em *Imparfinis* cf. *piperatus* (Vissotto et al., 2001; Fenocchio et al., 2003), e *Imparfinis piperatus* (Vicente et al., 1994), a  $2n = 58$  cromossomos em *Imparfinis mirini* (Vissotto et al., 1997), *Imparfinis piperatus* (Vissotto et al., 2001), *Imparfinis* aff. *schubarti* (Fenocchio et al., 2003; Stolf et al., 2004) e *Imparfinis schubarti* (Kantec et al., 2009). Porém, recentemente, foi observado em *Imparfinis hollandi* um número diplóide de  $2n = 42$ , portanto, divergente de todas as outras espécies do gênero (Margarido e Moreira-Filho, 2008).

O número fundamental de 116, encontrado no presente estudo, mostrou-se o mais comum no gênero, sendo também observado em *Imparfinis piperatus* (Vissotto et al., 2001), em *Imparfinis mirini* (Vissotto et al., 1997), em *Imparfinis* aff. *schubarti* (Stolf et al., 2004) e em *Imparfinis schubarti* (Kantec et al., 2009).

Diferenças na fórmula cariotípica e no NF têm sido evidenciadas em diferentes espécies e populações de *Imparfinis* e, embora isto possa ser devido aos



diferentes critérios de classificação e/ou de diferença no grau de condensação do cromossomo, em alguns casos, deve-se considerar também que rearranjos cromossômicos tenham ocorrido durante o processo evolutivo deste grupo, permitindo a real diferenciação cariotípica (Vissotto et al., 2001).

Apesar da grande variação quanto à fórmula cariotípica na espécie *Imparfinis schubarti*, os espécimes do presente estudo apresentaram fórmula cariotípica igual aos espécimes de *Imparfinis aff. schubarti* estudados por Stolf et al. em 2004.

Em *Imparfinis schubarti*, a região organizadora de nucléolo encontra-se em posição intersticial do braço longo do par 1 (metacêntrico), coincidindo com a região da constrição secundária (Figura 7a). A aplicação da sonda de DNAr 18S confirmou a existência de apenas um único par cromossômico contendo cístrons ribossômicos (Figura 8).

Espécies do gênero *Imparfinis* analisadas por Stolf et al. (2004), Kantek et al. (2009) e Borba et al. (2012), utilizando sonda de DNAr 18S, também revelaram apenas um único par cromossômico contendo estes cístrons ribossômicos. Neste gênero, as regiões organizadoras de nucléolo são observadas em posição intersticial, tendo sido visualizadas no braço longo de diferentes tipos cromossômicos. Estas podem ocorrer em diferentes tipos cromossômicos, sendo localizada em cromossomos acrocêntricos, como em *Imparfinis cf. piperatus* (Vissotto et al., 2001); em subtelocêntricos, como detectados em *Imparfinis cf. piperatus* (Fenocchio et al., 2003); e *Imparfinis hollandi* (Margarido e Moreira-Filho, 2008), bem como em metacêntricos, para *Imparfinis mirini* (Vissotto et al., 2000), *Imparfinis aff. schubarti* (Fenocchio et al., 2003; Stolf et al., 2004), e *Imparfinis schubarti* (Kantec et al., 2009).

Borba et al. (2012) sugeriram que, embora NOR simples em posição intersticial seja frequente em *Imparfinis*, a variação de posição da NOR pode ser explicada por uma série de rearranjos, como inversões, deleções e duplicações. De acordo com esse autores, a posição ancestral seria, provavelmente, na região terminal de um cromossomo subtelocêntrico, como observada em *I. hollandi* (Margarido e Moreira-Filho, 2008) e, após uma inversão, esta região teria se transferido para a posição intersticial de um cromossomo subtelocêntrico, como detectado em *Imparfinis cf. piperatus*, analisado por Fenocchio et al. (2003). Sendo assim, considerando a proposta acima, a presença de NOR intersticial em um par de

metacêntricos, como detectado em *Imparfinis schubarti* no presente estudo e em *Imparfinis* aff. *schubarti* por Stolf et al. (2004), corresponderia a um caráter derivado.

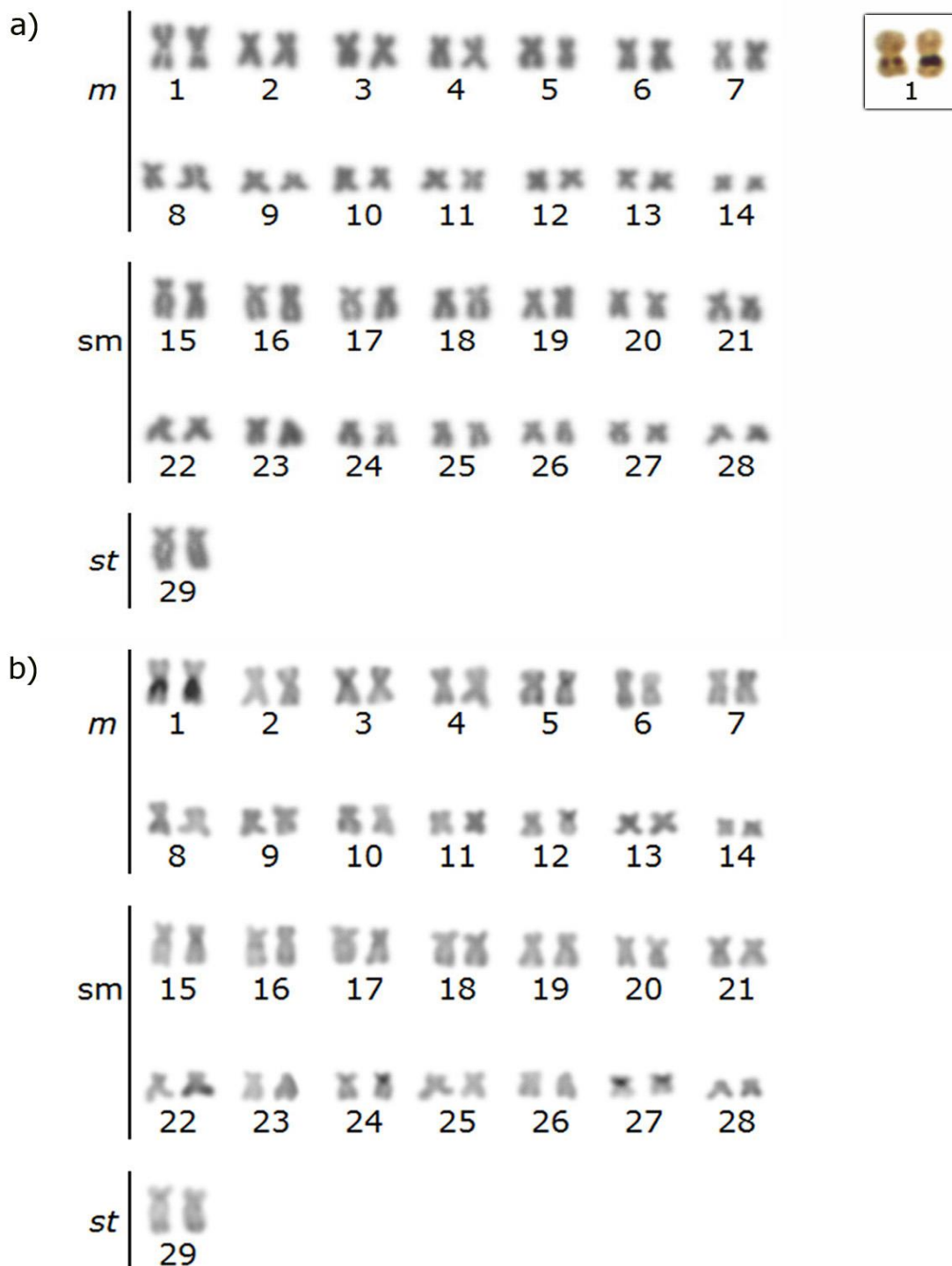


Figura 7 -(a) Cariótipo de *Imparfinis schubarti* submetido à coloração com Giemsa; (b) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em destaque, o par 1, região organizadora de nucléolo (Ag-NOR).

Na espécie estudada *I. Schubarti*, observou-se que os cromossomos têm pouca quantidade de heterocromatina constitutiva, contendo algumas marcações centroméricas e teloméricas. Contudo, visualizou-se um grande bloco heterocromático pericentromérico no braço longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos, coincidente com a região da constrição secundária (NOR), sugerindo, portanto, que esta heterocromatina esteja intercalada entre os sítios ribossomais, conforme observado em muitas outras espécies de peixes (Figura 7c).

No gênero *Imparfinis*, as análises previamente realizadas demonstraram a existência de poucas marcações banda C centroméricas, teloméricas e pericentroméricas, conforme registrados em *I. piperatus* (Vicente et al., 1994), *I. aff. schubarti* (Stolf et al., 2004), *I. schubarti* (Kantek et al., 2009) e em *I. cf. piperatus* (Fenocchio, 1993). Além dessas, ainda foram observadas regiões heterocromáticas que correspondiam às RONS e também aos blocos C positivos intersticiais.

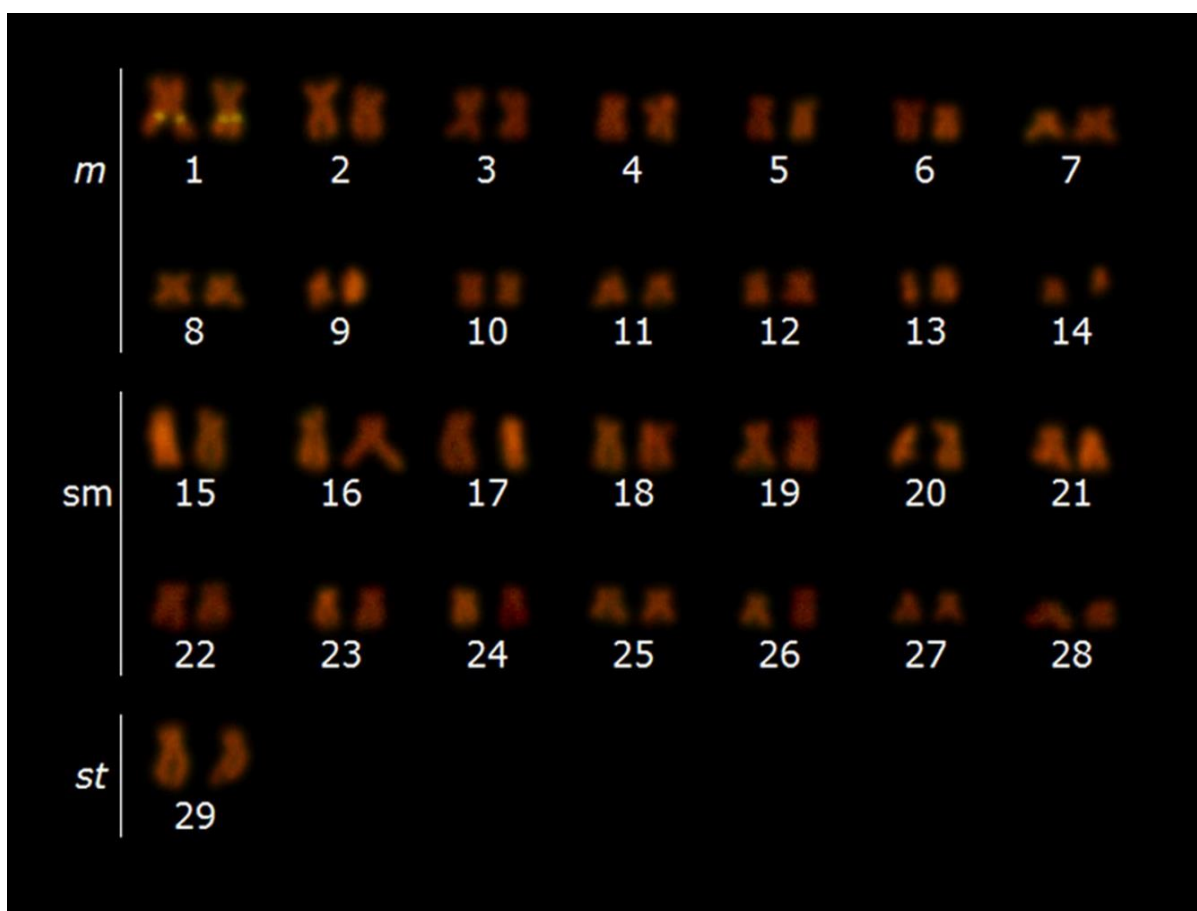


Figura 8 - Cariótipo de *Imparfinis schubarti* submetido à técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sondas de DNAr 18S.

Os dados obtidos neste estudo para a espécie *Imparfinis schubarti* corroboram os resultados de Stolf et al. (2004) para a mesma espécie, mas diferem dos dados obtidos por Kantek et al. (2009) para *Imparfinis schubarti* da bacia do rio Piumhi. Esta diferença é observada na fórmula cariotípica desta população (18m+34sm+6st), como também no padrão de banda C e na posição da NOR. Kantek et al. (2009) encontraram a NOR em posição intersticial do par 10 (subtelocêntrico), enquanto, no presente estudo, a NOR encontra-se em posição intersticial do par 1 (metacêntrico). O cariótipo distinto de *Imparfinis schubarti* do rio Piumhi é apontado pelos autores como uma possível hibridização entre espécies nativas, *I. minute* com *I. schubarti*, devido à transposição desse rio no início dos anos 60, o que ocasionou a introdução de várias espécies da bacia do Alto Paraná para a bacia do rio São Francisco, onde não havia a espécie *Imparfinis schubarti*.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as espécies de Heptapteridae confirmam variabilidade cromossômica neste grupo.

Os espécimes de *Pimelodella* sp. apresentaram número diplóide de  $2n = 46$ , enquanto os de *Pimelodella taenioptera* apresentaram  $2n = 52$ . Ambos não mostraram diferenças cariotípicas entre machos e fêmeas, não sendo detectada a presença de cromossomos sexuais. A estrutura cariotípica das duas espécies evidenciou muitos cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico.

Foram detectadas NORs simples localizadas no braço curto de um par submetacêntrico em ambas as espécies, tanto pela técnica de AgNOR quanto por FISH. Entretanto, apenas em *Pimelodella* sp. foi observado um heteromorfismo no tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos, uma característica comum dentro da família. Em *Pimelodella* sp., foi detectada pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, enquanto em *Pimelodella taenioptera* pode-se observar maior quantidade de regiões heterocromáticas, localizadas em posições pericentroméricas, instersticiais e teloméricas. Em geral, os Heptapterideos apresentam pequenas quantidades de heterocromatina, distribuídas principalmente em regiões terminais e pericentroméricas. Os dados obtidos demonstram que, apesar das duas espécies, *Pimelodella* sp. e *Pimelodella taenioptera*, serem muito parecidas, morfologicamente e citogeneticamente, podem ser consideradas espécies diferentes. Isso pode ser devido ao fato das duas espécies estarem isoladas geograficamente e de terem evoluído independentemente uma da outra.

O número diplóide de 58 cromossomos observado em *Imparfinis schubarti* é coincidente com estudos prévios nesta espécie e o número fundamental de 116 mostra-se como sendo o mais comum no gênero. Um sistema de NORs simples localizadas em posição intersticial foi confirmado pelas técnicas de AgNOR e FISH, característica comum ao gênero, sendo a NOR num par metacêntrico, o que pode representar uma característica mais derivada do gênero. Na espécie estudada, observou-se pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, algumas marcações centroméricas e teloméricas e um grande bloco heterocromático pericentromérico no par 1. Os dados obtidos para *Imparfinis schubarti* são similares aos descritos para outras populações da mesma espécie.

Os dados do presente estudo corroboram os achados de outras pesquisas realizadas neste grupo de peixes, ratificando que os Heptapteridae compartilham algumas características citogenéticas próprias e que, ao mesmo tempo, cada gênero apresenta alguns traços cariotípicos particulares. Este trabalho também representa uma contribuição de grande interesse ao descrever cariotípicamente espécies de peixes da região Centro-Oeste, até o momento pouco estudadas, e fornecendo subsídios para futuros estudos taxonômicos e evolutivos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TRAJANO, E.; TOLEDO FILHO, S.A. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. **Caryologia**, 45:255-262, 1992.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E.; FORESTI, F.; TOLEDO, S.A.; DUTRILLAUX, B. BrdU replication patterns demonstrating chromosome homologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. **Cell Genetics**, 48:117-120, 1988.

ARAI, R. **Fish Karyotypes: a check list**. Japan: Springer, 2011. 347p.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, 2:103-120, 1978.

BOCKMAN, F.A. 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, 1994.

BOCKMANN, F.A.; GUAZZELLI, G.M. Family Heptateridae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (eds.). **Check list of the freshwaters of south and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 406-431.

BORBA, R.S.; SILVA, E.L.; PACHECO, A.C.S.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; ALVES, A.L. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 22:509-518, 2012.

BURGUESS, W.E. **An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes**. New York: THF Publications Neptune City, 1989. 784p.

CASTRO, J.; SÁNCHEZ, L.; MARTINEZ, P. Analysis of the inheritance of NOR size variants in brown trout (*Salmo trutta*). **Journal of Heredity**, 89:264-266, 1998.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná river basin, southeastern Brazil. **Ichthyophthirius Explore Freshwater**, 7:337-352, 1997.

COLE, C.J.; LEAVENS, C.R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetological Review**, 3:102, 1971.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-Triticale. **Chromosome Research**, 2:231-338, 1994.

DELANY, M.E.; BLOOM, S.E. Replication banding patterns in the chromosomes of rainbow trout. **Journal of Heredity**, 75:431-434, 1984.

DIAS, A.L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Revista Brasileira de Genética**, 16:585-600, 1993.

EGOZCOUE, Y. **Técnicas em citogenética**. Barcelona: Espax, 1971. 144p.

FENOCCHIO, A.S. **Cromossomos supranumerários no gênero Rhamdia (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1993. 68p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; DIAS, A.L.; SWARÇA, A.C. Cytogenetic Studies and Correlated Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). **Cytologia**, 68:363-368, 2003.

FERRARIS, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418:1-628, 2007.

GALETTI JR., P.M.; MARTINS, C. Contribuição da Hibridização in situ para o Conhecimento dos Cromossomos de Peixes. In: GUERRA, M. (Eds.). **FISH: Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: SBG, 2004. p. 61-881.

GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Estudos cromossômicos em *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): descrição de um possível sistema sexual múltiplo em *Pimelodella boshimai*. In: I INTERNATIONAL CONGRESS OF FISH GENETICS



AND XI BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS. São Carlos, 2006. **Resumos...** CD-Rom. São Carlos: SBG, 2006. p. 183.

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

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

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHAWARZACHER, K.; ANAMTHAW-JÓNSSON, A.R.; LEITCH, M.S.; LEITCH, I.J. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique-J. Methods cellular and molecular Biology*, 3:109-116, 1991.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36:1014-1015, 1980.

JIM, M.S.; TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragopterinae). **Ciência e Cultura**, 27:1122-1124, 1975.

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

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Research Genetics Genome**, 106:107-110, 2004.

LEE, M.R.; ELDER, F.F.B. Yest stimulation for bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 26:36-40, 1980.

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. 534p.

- LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron**, 40:552–559, 2009.
- LUNDBERG, J.G.; BORNBUSCH, A.H.; MAGO-LECCIA, F. *Gladioglanis conquistator* N. sp. from Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodidae N. subf. (Siluriformes, Pimelodidae). **Copeia**, 1:190-209, 1991.
- MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, C.A.S. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. 603p.
- MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). **Genetics and Molecular Biology**, 31:235-238, 2008.
- MORAES, V.P.O. **Análise citogenética comparativa de diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular).
- MORAES, V.P.O.; CEREALI, S.S.; FROEHLICH, O.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 3:627–633, 2007.
- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2006. 600p.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO FILHO, S.A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, 11:577-624, 1988.
- OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A.E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. **Caryologia**, 53:31-37, 2000.
- PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W.N. **Encyclopedia of fishes**. San Diego: Academic Press, 1995. 240p.

PHILLIPS, R.B.; IHSEN, P.E. Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, 39:14-18, 1985.

PINNA, M.C.C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 279-330.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; JR., C.J.F. **Check list of the freshwater fishes of South America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 729p.

ROMAN, M.P.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do rio Iguazu e um caso de triploidia natural. In: IX SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 2002, Maringá. **Resumos...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2002. p.76.

SOLA, L.; CATAUDELLA, S.; CAPANNA, E. New developments in vertebrate cytotoxicology III. Karyology of bony fishes: a review. **Genetica**, 54:285-328, 1981.

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

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

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; DIAS, A.L. An update cytogenetic review for species of the families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a cytotoxicological classification. **Caryologia**, 60:338-348, 2007.

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

TOLEDO, V.; FERRARI, I. Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. **Científica**, 4:120-123, 1976.

TSUDA, J.R. **Análise citogenética em *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae) do Ribeirão Lindóia: ocorrência de triploidia natural.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2005. 98p. Monografia (Bacharelado em Biologia).

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

VICENTE, M.R.R.; MARGARIDO, V.P.; GALETTI JR., P.M. Estudos cromossômicos em *Imparfinis piperatus* (Pisces, Siluriformes) do riacho São João (Bacia do Leste). In: V SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 1994, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1994. p. 25.

VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Paradon* species (Pisces, Paradontidae). **Caryologia**, 4:365-369, 2001.

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

VISSOTTO, P.C. **Análise citogenética comparativa do sistema de determinação sexual em espécies do gênero *Imparfinis* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae).** Botucatu: UNESP, 2000. 117p. Tese (Unpublished PhD. Thesis).

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

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

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