

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5
famílias de Siluriformes do rio São Francisco

Caroline Garcia

São Carlos - SP
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5
famílias de Siluriformes do rio São Francisco

Caroline Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

São Carlos - SP
2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G216ce

Garcia, Caroline.

Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco / Caroline Garcia. -- São Carlos : UFSCar, 2005.
104 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Citogenética. 2. Bagre (peixe). 3. Cromossomos. 4. Citogenética molecular. 5. Rearranjos cromossômicos não-Robetsonianos. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

Orientador

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Dedico esta dissertação àqueles
que com muito amor e paciência
me servem de exemplo e dão
forças para buscar meus sonhos:
Oswaldo, Irene e Verônica.
Minhas vitórias são suas também.

“É triste falhar na vida; porém, mais triste é tentar não vencer”

Roosevelt.

“Podemos praticar atos nobres sem ter de dominar a terra e o mar”

Aristóteles.

“O saber da independência é uma dádiva, não uma solidão”

D.Vasques Filho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 Caracterização da região de estudo.....	04
2.2 Características gerais da ordem Siluriformes.....	07
2.3 Aspectos taxonômicos das famílias em estudo.....	08
2.4 Estudos cariotípicos.....	10
2.5 Heterocromatina constitutiva.....	12
2.6 Aplicação de fluorocromos base-específicos e localização de DNAr em peixes: ênfase no estudo das Regiões Organizadoras Nucleolares.....	26
2.7 Cromossomos supranumerários e sua ocorrência em Heptapteridae e Pimelodidae.....	34
2.8 Estudos citogenéticos realizados na região de Três Marias – MG.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Local de coleta e espécies analisadas.....	41
3.2 Procedimentos metodológicos.....	41
3.2.1 Preparação de cromossomos mitóticos.....	41
3.2.1.1 Técnica de preparação direta.....	41
3.2.1.2 Preparação cromossômica alternativa.....	42
3.2.2 Preparo de lâminas.....	43
3.2.3 Técnica de detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos.....	43
3.2.4 Bandamento C.....	43
3.2.5 Coloração por fluorocromos base-específicos.....	44
3.2.5.1 Coloração por cromomicina A ₃	44
3.2.5.2 Coloração por DAPI.....	44
3.2.6 FISH com sondas de DNAr 18S e 5S.....	45
3.2.7 Obtenção de cariótipos.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 CAPÍTULO 1 – Cytogenetical analyses in three fish species of the genus <i>Pimelodus</i> (Siluriformes, Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus	49

4.2 CAPÍTULO II – Localização cromossômica dos sítios de DNAr 5S e 18S em três espécies de <i>Pimelodus</i> (Siluriformes, Pimelodidae).....	59
4.3 CAPÍTULO III - Caracterização citogenética de cinco espécies de Siluriformes da bacia do rio São Francisco.....	67
5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bacia do rio São Francisco. A seta vermelha indica o local de coleta.

Figura 4.1: Karyotypes of: a) *P. fur*, b) *P. maculatus*, and c) *Pimelodus sp.* with Giemsa staining. The box surrounds the Ag-NOR-bearing pair.

Figura 4.2: Somatic metaphases of *P. fur* (a, d), *P. maculatus* (b, e) and *Pimelodus sp.* (c, f) submitted to: C banding (a, b, c) and staining with CMA₃ (d, e, f). The major arrows indicate the NOR-bearing pair. NOR association (b, f) and NOR size heteromorphism (a) are evidenced. The arrows indicate positive chromosome regions coinciding with heterochromatin sites after treatment with fluorochrome and the arrowheads indicate a pair of metacentric chromosomes with both telomeres heterochromatic.

Figura 4.3: Metáfases somáticas submetidas à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 5S. As setas indicam os sítios em: **a** *P. fur*, **b** *P. maculatus*, **c** *Pimelodus sp.* No detalhe os cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S e o par nucleolar evidenciado pela sonda de DNAr 18S.

Figura 4.4: Cariótipos de **a** *Parauchenipterus leopardinus*, **b** *P. galeatus*, **c** *Pseudopimelodus zungaro*, **d** *Franciscodoras marmoratus*, **e** *Rhamdia quelen*. submetidos a coloração convencional por Giemsa. No detalhe, as regiões organizadoras de nucléolo obtidas através de impregnação por nitrato de prata e hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 18S.

Figura 4.5: Metáfases somáticas de **a** *Parauchenipterus leopardinus*, **b** *P. galeatus*, **c** *Pseudopimelodus zungaro*, **d** *Franciscodoras marmoratus*, **e** *Rhamdia quelen*. submetidos ao bandamento C. As setas indicam os cromossomos supranumerários encontrados em *Rhamdia quelen*.

Figura 4.6: Fragmentos de metáfases somáticas de **a** *Parauchenipterus leopardinus*, **b** *P. galeatus*, **c** *Franciscodoras marmoratus*, **d** *Rhamdia quelen*, **e** *Pseudopimelodus zungaro*.

submetidos à coloração por CMA₃. As setas indicam os sinais positivos obtidos através da aplicação da técnica.

Figura 4.7: Fragmentos de metáfases somáticas de **a, f** *Parauchenipterus leopardinus*, **b, g** *P. galeatus*, **c, h** *Pseudopimelodus zungaro*, **d** *Franciscodoras marmoratus*, **e** *Rhamdia quelen*. submetidos à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 5S (a-e) e coloração por DA/DAPI (f-h). As setas indicam as marcações obtidas através da aplicação das respectivas técnicas.

RESUMO

Os estudos genéticos envolvendo representantes da ordem Siluriformes encontrados na bacia do rio São Francisco são ainda escassos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal, contribuir para o conhecimento citogenético das espécies de peixes pertencentes às famílias: Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae, encontradas no rio São Francisco, na região de Três Marias – MG. Para tal foram aplicadas técnicas convencionais de análise cromossômica, diferentes bandeamentos e hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S. Grande parte dos dados citogenéticos obtidos consiste na primeira caracterização cromossômica de muitas das espécies analisadas, ressaltando a necessidade da ampliação deste tipo de estudo dentro deste grupo. Algumas tendências de evolução cromossômica também puderam ser levantadas para espécies que já possuíam informações citogenéticas prévias, o que permitiu uma maior compreensão dos processos de diferenciação e evolução cariotípica. Os dados aqui apresentados são indicativos da grande diversidade da ictiofauna presente no rio São Francisco e da possível atuação de fatores que influenciam na diversificação e no alto grau de endemismo dos peixes desta bacia.

ABSTRACT

Cytogenetic studies involving representatives of the order Siluriformes found in the São Francisco River basin continue practically inexistent. Therefore, the main objective of the present work was to contribute to the cytogenetical knowledge of the fish species belonging to the following families: Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae, Pimelodidae and Pseudopimelodidae, all found in the São Francisco River in the Três Marias region – MG. In order to accomplish this, conventional chromosome analysis, different bandings and fluorescent *in situ* hybridization with 5S AND 18S rDNA probes were used. A great part of the cytogenetical data obtained consists in the first chromosomal characterization of many of the analyzed species, emphasizing the need for more studies of this sort within this group. A few chromosomal evolution tendencies were also detected for species that already possessed previous cytogenetic information, which permits a larger comprehension of the differentiation processes and karyotypic evolution. The data here presented give clues regarding the great diversity of the ichthyofauna of the São Francisco River and regarding the possible effects of factors that influence in the diversification and in the high degree of endemism of the fish belonging to this basin.

Introdução Geral e Objetivos



1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

A ictiofauna Neotropical dulcícola é uma das mais ricas e diversificadas do mundo. Segundo Vari e Malabarba (1998), cerca de 8.000 espécies são encontradas para as Américas, Central e do Sul, o que corresponde a aproximadamente 25% da diversidade mundial de peixes.

Os estudos citogenéticos neste grupo animal têm crescido bastante, cerca de 2.600 espécies de todo o mundo possuem seu cariótipo identificado (Ozouf-Costa e Foresti, 1992), destas, 921 são espécies neotropicais, somando cerca de 252 gêneros distribuídos em 44 famílias (Oliveira *et al.*, 2000).

Os peixes neotropicais de água doce apresentam grande diversidade cariotípica. Até o presente momento, o menor número diplóide relatado corresponde à $2n = 20$ cromossomos para *Pterolebias longipinnis*, e o maior, à $2n = 134$ cromossomos para *Corydoras aeneus*. (Oliveira *et al.*, 2000).

Dentro desta grande diversidade, observa-se a ocorrência de grupos marcados por uma grande variabilidade no que diz respeito ao número e à morfologia dos cromossomos, como é o caso de alguns gêneros, como *Astyanax* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Moreira-Filho *et al.*, 2001), *Rhamdia* (Swarça *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2003) e *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1992 e 1993). Outros grupos entretanto, apresentam a macroestrutura cromossômica relativamente conservada, como Curimatidae (Venere e Galetti Jr., 1989), Anostomidae (Galetti Jr. *et al.*, 1984) e Prochilodontidae (Pauls e Bertollo, 1990).

Com relação aos peixes neotropicais, em termos cariotípicos, diversas particularidades já foram relatadas, tais como a ocorrência de: (1) cromossomos sexuais (para revisão ver Moreira-Filho *et al.*, 1993); (2) polimorfismos numéricos: cromossomos supranumerários (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Portella-Castro *et al.*, 1999, Fenocchio e Bertollo, 2000; Néó *et al.*, 2001) e triploidias

naturais (Morelli *et al.*, 1983; Venere e Galetti Jr., 1985; Almeida e Toledo *et al.*, 1985; Giuliano Caetano e Bertollo, 1990; Fauaz *et al.*, 1994; Maistro *et al.*, 1994, Centofante *et al.*, 2001, Garcia *et al.*, 2003); além de (3) polimorfismos estruturais (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Dias e Foresti, 1993; Vissoto, 2000; Jorge e Moreira-Filho, 2000; Mantovani *et al.*, 2000).

A citogenética tem se mostrado uma ferramenta importante na caracterização das mais diversas espécies de peixes, esta se torna ainda mais forte quando associada a outras áreas de estudo, como por exemplo, a sistemática, apresentando valioso papel na identificação de espécies crípticas e taxonomicamente problemáticas. Alguns exemplos do valor da integração destas duas abordagens ficam claros nos estudos de Moreira-Filho e Bertollo (1991), envolvendo espécies pertencentes ao gênero *Astyanax*; e em estudos recentes nas espécies *Parodon nasus* e *P. tortuosos* (Silva, 2004).

Dentre os sistemas hidrográficos brasileiros, a bacia do rio São Francisco é a quarta em importância. Ao longo de seu curso, o São Francisco, estende-se por superfícies de altitude variável, sendo caracterizado como um típico rio de planalto, com algumas corredeiras, quedas e cascatas (Paiva, 1982). Nesta bacia, encontram-se mais de 130 espécies de peixes, muitas das quais caracterizadas pelo endemismo, reforçando a idéia de que esta apresenta um grau de isolamento com relação às demais bacias.

Os estudos citogenéticos em representantes da ordem Siluriformes encontrados no rio São Francisco são escassos, por outro lado, em outras bacias, como a do Paraná-Paraguai, estas análises já são mais numerosas. Desta forma, surgiu à necessidade de se iniciar e expandir os estudos envolvendo este grupo de peixes no rio São Francisco, mais precisamente na região de Três Marias - MG.

O presente trabalho objetivou através dos estudos cariotípicos utilizando técnicas convencionais de análise cromossômica, bandeamentos e hibridação *in situ* fluorescente,

caracterizar citogeneticamente espécies de peixes pertencentes às famílias Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae, encontradas no rio São Francisco, na região de Três Marias - MG. Desta forma esperou-se reunir dados, muitos dos quais ainda inéditos, sobre o padrão cromossômico deste grupo e correlacionar estes resultados com outros estudos citogenéticos já existentes para esta e outras bacias, procurando compreender melhor os processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica dentro destas famílias.

Revisão da Literatura



2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caracterização da região de estudo

A Bacia do rio São Francisco é a quarta em importância entre as bacias brasileiras, ocupa cerca de 7,4% do território nacional, abrangendo as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, cortando os Estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal (Fig. 1) (Paiva, 1982).

Ao longo de seu curso, o São Francisco estende-se por superfícies de altitude variável (entre 400 e 1000m), sendo caracterizado como um típico rio de planalto, com algumas corredeiras, quedas e cachatas.

Esta bacia encontra-se dividida em três regiões: o vale superior, que compreende as regiões que vão desde a cabeceira do rio até a corredeira de Pirapora, o vale médio, que abrange desde a corredeira de Pirapora até a cachoeira Paulo Afonso e o vale inferior, que vai da cachoeira citada até a foz.

Segundo Britski *et al.* (1988), a bacia do São Francisco abrange cerca de 133 espécies, muitas delas caracterizadas pelo endemismo, e 57 destas ocorrem na região de Três Marias.

Paiva (1983) sugere que, com relação à distribuição de peixes pelo rio São Francisco, devem ser levadas em consideração algumas características deste: (1) o São Francisco é um rio perene e que cruza o Brasil de oeste para leste; (2) na região do vale superior, as águas são torrenciais, frias e com pouco material em suspensão; (3) no vale médio, as águas possuem pequena velocidade com temperaturas mais elevadas e com um pouco mais de material orgânico em suspensão, e; (4) no vale inferior, nas proximidades do estuário, as lagoas marginais são verdadeiros criadouros de peixes, com água sedimentada, rica em nutrientes.

Grande parte da fauna de peixes do São Francisco concentra-se em seus afluentes permanentes e de água com pouco material em suspensão, sendo que são nas lagoas marginais que muitas espécies desovam, principalmente durante a piracema. A época predominante de

reprodução tem início em outubro, antecedendo os meses mais chuvosos, e com a chegada dos quais tem início a piracema (Paiva, 1983).

Três Marias é um município do Estado de Minas Gerais, localizado na região do vale superior do São Francisco, possuindo uma área total de 2,673 km². A altitude máxima na região é de 975m (Div. Munic. Lassance) e a mínima 504m (Foz do rio Janeiro).

A região apresenta uma temperatura média anual de 24,3 °C, sendo as temperaturas mínima e máxima médias anual iguais a 14 °C e 30,1°C respectivamente. A precipitação média anual é de 1.791mm, sendo os meses de outubro a dezembro os mais chuvosos, e os de junho a agosto os mais secos (www.mg.gov.br)

Em 1957 tiveram início as obras para a construção da barragem de Três Marias, as quais foram concretizadas em 1960. Esta barragem apresenta 2.700 m de extensão e altura máxima de 75m, quando cheia, possui um volume na ordem de 21 bilhões de m³ de água. Esta construção visou alguns objetivos, como: regularização do rio, aumento do volume de água para navegação em Pirapora e Juazeiro, controle das cheias, obras de irrigação e produção de energia (Britski *et al.*, 1988).

Esta grande obra provocou o surgimento de obstáculos à migração reprodutiva dos peixes, além de restringir as cheias à jusante do reservatório, com isto prejudicou-se o funcionamento natural das lagoas marginais, as quais eram tidas como berçários naturais. Este fato despertou o interesse pelo manejo, visando tanto a exploração quanto a preservação (www.codevasf.gov.br/produtos/aquicultura.htm#0).



Fig. 1: Bacia do rio São Francisco. A seta vermelha indica o local de coleta.

2.2 Características gerais da ordem Siluriformes

Os Siluriformes compreendem um grupo de peixes formado por cerca de 34 famílias e mais de 2400 espécies (Nelson, 1994). A maioria de seus representantes habita as águas doces das regiões tropicais, embora exista também uma família cuja ocorrência é predominante na América do Norte, Ictaluridae (Greenwood *et al.*, 1966), e outras duas cujos representantes são marinhos, Ariidae e Plotosidae (Lowe-McConnel, 1975). Na região neotropical ainda ocorrem algumas famílias, como Auchenipteridae e Aspredinidae, que apresentam espécies estuarinas, ou seja, que ocasionalmente podem ocupar o ambiente marinho (Pinna, 1998).

A subordem Siluroidei engloba um grande número de formas popularmente conhecidas como peixes-de-couro, cascudos, acaris, etc., compreendendo 13 famílias na região neotropical, sendo que destas, sete famílias ocorrem no rio São Francisco (Britski *et al.*, 1988) e seis são encontradas na região de Três Marias – MG.

Os Siluriformes podem ser facilmente identificados por possuírem características morfológicas distintivas. São peixes de corpo nu, o qual encontra-se envolto por pele espessa ou coberto por placas ósseas (total ou parcialmente) (Britski *et al.*, 1988). As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal portador de um acúleo forte e pungente. A nadadeira adiposa encontra-se presente, e é, em geral, bem desenvolvida; já a nadadeira caudal assume formato variável. Há geralmente três pares de barbilhões sensitivos (Mees, 1974).

As espécies de peixes pertencentes a esta ordem assumem desde pequeno até grande porte, apresentando hábitos sedentários (os quais contribuem para a grande dificuldade apresentada por estes peixes em superar cachoeiras ou corredeiras que se interpõem às suas raras migrações), sendo encontrados no fundo de rios, escondendo-se por entre as pedras e vegetação (Britski, 1981). Sua atividade é predominantemente crepuscular ou noturna,

quando, utilizando-se de seus sentidos químicos (olfato e gustação), estes saem à procura de alimento, o qual é constituído principalmente por vermes e insetos (Sterba, 1973).

2.3 Aspectos taxonômicos das famílias em estudo

Dentre os Siluriformes, Auchenipteridae é uma das poucas famílias que apresentam representantes estuarinos. Estes peixes encontram-se amplamente distribuídos pela América do Sul, compreendendo mais de 70 espécies, distribuídas em cerca de 20 gêneros: *Ageneiosus*, *Auchenipterichthys*, *Auchenipterus*, *Asterophysus*, *Centromochulus*, *Entomocorus*, *Epapterus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium*, *Tatia*, *Lisomadoras*, *Parauchenipterus*, *Pseudoauchenipterus*, *Pseudotatia*, *Tetranematichthys*, *Tocantinsia*, *Trachcorystes*, *Trachelyichthys*, *Trachelyopterus* e *Trachelyopterychthys* (Pinna, 1998).

Os auchenipterídeos possuem hábitos alimentares diversificados. Algumas formas são especializadas na ingestão de frutas e sementes, enquanto outras se alimentam preferencialmente de insetos e crustáceos. Os representantes desta família são particularmente interessantes, provavelmente por serem talvez os únicos silurídeos com fertilização interna (Pinna, 1998). Algumas espécies apresentam a nadadeira anal transformada em um gonopódio utilizado para cópula. (Britski *et al.*, 1988).

A família Doradidae compreende mais de 80 espécies e cerca de 30 gêneros: *Acanthodoras*, *Agamyxis*, *Amblyodoras*, *Anduzedoras*, *Anodoras*, *Astrodoras*, *Centrochir*, *Centrodoras*, *Doraops*, *Doras*, *Franciscodoras*, *Hassar*, *Hemidoras*, *Hypodoras*, *Kalyptodoras*, *Leptodoras*, *Lithodoras*, *Megalodoras*, *Nematodoras*, *Opsodoras*, *Orinocodoras*, *Oxyodoras*, *Physopyxis*, *Platyodoras*, *Pterodoras*, *Rhinodoras*, *Scorpiodoras*, *Stenodoras*, *Trachydoras* e *Wertheimeria*. (Pinna, 1998). Estes peixes são caracterizados pela presença de uma série de placas ósseas ao longo da linha lateral, cobrindo-a total ou parcialmente. Cada uma destas placas é provida de um processo espiniforme voltado para trás

(Britski *et al.*, 1988), e em alguns casos estas placas ósseas estão restritas à base da nadadeira caudal ou à região logo após a cabeça. Popularmente os representantes deste grupo são conhecidos como bacu, cuiu-cuiu, armado, abotoado, serrudo, etc. (Fenocchio *et al.*, 1993).

Os hábitos alimentares dos doradídeos são bastante variados. Grande parte destes alimentam-se de invertebrados encontrados nos fundos lodosos, embora hajam formas especializadas no consumo de frutas e folhas, caracóis e caranguejos (Pinna, 1998).

Pimelodidae já foi considerada uma das maiores famílias de bagres neotropicais, assim como a mais diversificada (Mees, 1974). Composta por cerca de 60 gêneros e mais de 300 espécies (Britski, 1981), esta família já foi considerada por Fowler (1950) a terceira em importância dentre os peixes de água doce da América do Sul.

Após uma série de revisões taxonômicas realizadas por Pinna (1993), baseadas em características morfológicas e estudos filogenéticos dentro da ordem Siluriformes, e que demonstraram a natureza polifilética dos indivíduos pertencentes à conhecida família Pimelodidae, estes foram reagrupados nas seguintes famílias: Pimelodidae, Heptapteridae (Rhamdiidae) e Pseudopimelodidae (das quais, as duas últimas foram elevadas da categoria de subfamília para família).

A família Heptapteridae, que inclui peixes de pequeno e médio porte, representando uma das maiores radiações de bagres neotropicais (Pinna, 1998), passou a ser composta por 25 gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imperales*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nannorhamdia*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis* e *Rhamdiopsis*.

Já a família Pimelodidae é atualmente formada por cerca de 32 gêneros (Lundberg *et al.*, 1991): *Aguarunichthys*, *Bagropsis*, *Bergiaria*, *Brachyplatystoma*, *Calophysus*,

Cheirocerus, Conorhynchus, Duopalatinus, Exallodontus, Golslinea, Hemisurubim, Hypophythalmus, Iheringichtys, Leiarius, Luciopimelodus, Megalonema, Merodontotus, Perrunichtys, Parapimelodus, Phractocephalus, Pimelodina, Pimelodus, Pirinampus, Piramutana, Platynematchthys, Platysilurus, Platystomaticthys, Pseudoplatystoma, Sorubim, Sorubimichtys, Steindachneridion e Zungaro.

A maioria de suas formas apresenta hábito predatório. Esta é uma das poucas famílias onde há especialização na morfologia das formas juvenis, o que pode levar a uma descrição taxonômica errônea de juvenis e adultos (Pinna, 1998).

Pseudopimelodidae, que possui representantes de tamanhos variáveis, assumindo desde formas diminutas e crípticas até indivíduos de grande porte (Pinna, 1998), é representada por apenas três gêneros: *Lophiosilurus, Microglanis* e *Pseudopimelodus*.

2.4 Estudos cariotípicos

Os peixes constituem o grupo de vertebrados mais antigo e numeroso. Estes animais encontram-se amplamente distribuídos, assumindo diferentes formas e ocupando diferentes nichos.

Tanto do ponto de vista citogenético, como também do ponto de vista evolutivo, os peixes compõem um interessante grupo de estudo. Em termos cariotípicos, diferentes particularidades já foram relatadas neste grupo, o que justifica o aumento nas pesquisas envolvendo estes animais (Affonso, 2000). Diferente de outros vertebrados, os peixes encontram-se confinados à água, apresentando maiores restrições quanto a sua dispersão. No caso dos peixes de água doce, seu confinamento aos sistemas hidrográficos, resulta em um estreito relacionamento entre a história das bacias e a história natural-evolutiva destes animais (Kavalco, 2003).

A ordem Siluriformes, juntamente com a ordem Characiformes, representa um dos grupos que concentra maior número de informações citogenéticas sobre seus representantes.

Apesar de Siluriformes ser composta por um grande número de famílias, na presente revisão foram enfatizadas apenas aquelas mais relacionadas com as espécies do presente estudo, sendo estas: Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae.

Os primeiros estudos citogenéticos no Brasil envolvendo representantes da subordem Siluroidei foram realizados por Toledo e Ferrari (1976a, b), os quais analisaram espécies pertencentes aos gêneros *Pimelodella*, *Rhamdia* e *Pimelodus*.

Atualmente, porém, os dados citogenéticos dos representantes destas famílias ainda são escassos, sendo que apenas uma pequena parte das espécies possui estudos cariotípicos (Tabela 1), e uma porção ainda menor possui dados referentes à aplicação de técnicas citogenéticas mais recentes, como por exemplo, coloração por fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* fluorescente.

Como se observa na Tabela 1, a família Pimelodidae é marcada por uma acentuada variabilidade cariotípica, onde o número diplóide pode variar entre 50 e 60 cromossomos, com predomínio de $2n = 56$ cromossomos para a maioria de seus representantes. O mesmo ocorre para a família Heptapteridae, porém nesta, o número diplóide varia entre 42 e 62 cromossomos, com predomínio de $2n = 58$ cromossomos. Para as famílias Auchenipteridae, Doradidae, Pseudopimelodidae, entretanto, observa-se uma manutenção do número diplóide para as espécies analisadas até o momento, sendo este equivalente à $2n = 58$ para as duas primeiras famílias, e $2n = 54$ cromossomos para Pseudopimelodidae.

Com relação ao número fundamental (NF), este é relativamente alto nas famílias estudadas, variando de 84 a 116, fato relacionado ao predomínio de cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntricos na constituição cariotípica. Os cromossomos destes grupos de peixe são, de modo geral, de pequeno tamanho, o que contribui para a dificuldade na identificação de sua morfologia e localização de bandas.

A ocorrência de sistemas cromossômicos sexuais é rara em peixes. Nas famílias ora estudadas há apenas relatos de sistemas sexuais simples, do tipo XX/XY, em *Pimelodella* sp. (Dias e Foresti, 1993) e *Steindachneridion* sp. (Swarça *et al.*, 2002a,b); e ZZ/ZW em *Opsodoras* sp. (Venere e Galetti Jr., 1998).

2.5 Heterocromatina constitutiva

As regiões heterocromáticas são formadas por DNA altamente repetitivo, e suas possíveis funções ainda permanecem sob discussão. Alguns autores consideram estas regiões como caracterizadas pela inatividade gênica, já outros como Yunis e Yasmineh (1971) propõem importante papel para a heterocromatina na proteção de regiões vitais para o genoma e no auxílio de processos evolutivos de especiação.

Devido à sua composição, a heterocromatina poderia sofrer mais facilmente alterações, as quais determinariam e favoreceriam rearranjos cromossômicos, constituindo uma importante fonte de variação (Wichman *et al.*, 1991). A presença de blocos heterocromáticos poderia também alterar a expressão gênica de seqüências vizinhas através do efeito de posição (Pardue e Henning, 1990).

A maioria dos estudos citogenéticos realizados em peixes fazem uso da aplicação de técnicas citogenéticas básicas, como coloração convencional por Giemsa, detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) por impregnação por nitrato de prata e bandamento C. Contudo, a utilização de bandamentos cromossômicos neste grupo animal tem sido considerada mínima quando comparada com os demais grupos de vertebrados. Este fato deve-se possivelmente a dificuldades na obtenção de resultados (Gold *et al.*, 1990), uma vez que estes animais geralmente apresentam cromossomos de tamanho reduzido, e com grau de compartimentalização diferenciado (Pendás *et al.*, 1993). Apesar destas dificuldades, muitos destes resultados, quando interpretados do ponto de vista evolutivo, representam importante

ferramenta para a elucidação dos processos evolucionários que ocorreram nos diferentes grupos de peixes (Souza *et al.*, 1996).

Atualmente a técnica mais comumente utilizada para a identificação das regiões heterocromáticas é a técnica de bandamento C descrita por Sumner (1972). Através desta as regiões de heterocromatina permanecem mais fortemente coradas após tratamento com ácido, base e solução salina. Segundo Jack *et al.* (1985) esta resistência das regiões heterocromáticas à técnica seria resultado da associação de proteínas com o DNA destas regiões produzindo uma configuração que dificultaria seu desgaste.

Em estudos citogenéticos, a análise da heterocromatina constitutiva tem se mostrado uma importante ferramenta na caracterização e separação de populações (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Margarido e Galetti Jr., 1996; entre outros) bem como na detecção de polimorfismos estruturais (Souza *et al.*, 1996; Mantovani *et al.*, 2000; Vissoto, 2000; Vicari *et al.*, 2003) e cromossomos sexuais (Galetti Jr. e Foresti, 1986; Moreira-Filho *et al.*, 1993).

De modo geral, os Siluriformes, apresentam pouca quantidade de heterocromatina, a qual encontra-se distribuída predominantemente nas regiões centroméricas e teloméricas, havendo também relatos da ocorrência de marcações intersticiais e polimorfismos. Os representantes deste grupo apresentam cromossomos pequenos e as bandas obtidas mostram-se, geralmente, pálidas, dificultando a observação das regiões heterocromáticas.

Troy e Miyazawa (2000) analisaram quatro exemplares machos pertencentes à espécie *Anadoras weddelli* e puderam observar que a distribuição da heterocromatina constitutiva encontra-se restrita a região intersticial de dois pares cromossômicos.

Em *Hassar* sp. e *H. cf. notospilus*, Milhomem *et al.* (2002) encontraram blocos heterocromáticos distribuídos centromericamente em alguns cromossomos do complemento, sendo estes pálidos.

A aplicação do bandejamento C em *Opsodoras* sp., permitiu a identificação de um mecanismo cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW, onde a heterogametia feminina estaria associada a um possível acúmulo de heterocromatina, sendo que nas fêmeas, o cromossomo W, um metacêntrico grande, apresentou ambos os telômeros heterocromáticos (Venere e Galetti Jr., 1998).

Estudos envolvendo exemplares de *Platidoras costatus* demonstraram que a heterocromatina constitutiva encontra-se distribuída em blocos centroméricos conspícuos na maioria dos cromossomos. Um par de metacêntricos grandes apresentou uma marcação intersticial no braço longo e um par de acrocêntricos na região terminal do braço longo (Milhomem *et al.*, 2003).

Rynodoras d'orbigny apresentou bandas heterocromáticas escassas. Mesmo assim, foi possível a identificação de alguns cromossomos marcadores, como no caso do terceiro par de cromossomos subtelocêntricos, onde nos braços maiores há um grande bloco heterocromático que vai desde sua região mediana até seu telômero (Jorge *et al.*, 1992).

Paiva e Júlio Jr. (2001), puderam observar em *Trachydoras paraguayensis* e *Pteridoras granulatus* que as RONS mostram-se totalmente heterocromáticas, enquanto outros blocos menores de heterocromatina distribuem-se em regiões centroméricas e teloméricas.

Em *Glanidium riberoi*, Roman *et al.* (2001) identificaram blocos heterocromáticos centroméricos nos pares cromossômicos 3, 4, 26 e 27, teloméricos no 12º par e na região das Ag-RONS.

Souza *et al.* (2002) realizaram o estudo das regiões heterocromáticas em quatro espécies de auchenipterídeos (*A. thoracatus*, *L. oncinus*, *P. galeatus* e *T. taeniatus*), identificando um padrão geral de bandas C bastante semelhante, onde a maioria dos cromossomos do complemento apresenta blocos teloméricos.

Tabela 1: Estudos citogenéticos realizados nas famílias Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae.

FAMÍLIA, ESPÉCIE	GÊNERO	E	LOCALIDADE	2N	FÓRMULA CARIOTÍPICA	NF*	RON (localização)	TIPO RON / HETER. TAMANHO	REFERÊNCIAS
AUCHENIPTERIDAE									
<i>Auchenipterichthys</i>									
<i>A. thoracatus</i>			Bacia Amazônica - AM	58	18M + 16SM + 12ST + 12A	104	Terminal, braço curto (par 23)	Simples	Souza <i>et al</i> (2002)
<i>Glanidium</i>									
<i>G. ribeiroi</i>			R. Iguaçu - PR	58	22M + 16SM + 10ST + 10A	106	Pericentromérica, braço curto (par 13)	Simples	Roman <i>et al</i> (2001)
			R. Iguaçu - PR	58			Intersticial (par 1)	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2004)
<i>Liosomadoras</i>									
<i>L. oncinus</i>			Bacia Amazônica - AM	58	16M + 22SM + 8ST + 12A	104	Terminal, braço curto (ST-A)	Múltipla	Souza <i>et al</i> (2002)
<i>Parauchenipterus</i>									
<i>P. galeatus</i>			Bacia Amazônica - AM	58	20M + 14SM + 12ST + 12A	104	Terminal, braço curto (par 20)	Simples	Souza <i>et al</i> (2002)
<i>Trachelipterichthys</i>									
<i>T. taeniatus</i>			Bacia Amazônica - AM	58	20M + 18SM + 8ST + 12A	104	Terminal, braço curto (par 24)	Simples	Souza <i>et al</i> (2002)
DORADIDAE									
<i>Anadoras</i>									
<i>A. weddelli</i>			Pantanal -MG	58	24M + 14SM + 10ST + 8A	104			Troy e Miyazawa (2000)
<i>Hassar</i>									
<i>H. cf. notospilus</i>			R. Jari/ Amerim - PA	58		116	Distal, braço curto	Simples	Milhomem <i>et al</i> (2002)
<i>Hassar sp.</i>			R. Jari/ Amerim - PA	58			Proximal, braço longo	Simples	Milhomem <i>et al</i> (2002)
<i>H. wilderi</i>			Bacia do Araguaia/ Barra do Garça - MT	58	50M + 6SM + 2ST	114			Venere <i>et al.</i> (1995)
<i>Opsodoras</i>									
<i>Opsodoras sp.</i>			R. Araguaia - MT	58	21M + 18SM + 12ST + 7A ♀ 20M + 18SM + 12ST + 8A ♂			Simples	Venere e Galetti Jr. (1998)
<i>Platyodoras</i>									
<i>P. costatus</i>			R. Xingu - PA	58		104	Distal, braço curto, SM	Simples	Milhomem <i>et al</i> (2003)
<i>Pseudodoras</i>									
<i>P. niger</i>			R. Tocantins - PA	58	20M + 16SM + 8ST + 14A	102	Terminal, braço curto (par 15)	Simples	Fenocchio <i>et al.</i> (1993)
<i>Pterodoras</i>									
<i>P. granulatus</i>			Alto Rio Paraná	58	16M + 16SM + 12ST + 14A	102	Telômérica, SM	Simples	Paiva e Julio Jr. (2001)
<i>Rhynodoras</i>									
<i>R. d'orbigny</i>			R. Mogi-Guaçu - SP	58	20M + 20SM + 8ST + 10A	106	Terminal, (par 4)	Simples	Jorge <i>et al.</i> (1992)
			R. Mogi-Guaçu - SP	58	20M + 20SM + 4ST + 14A	102	Terminal, braço curto (par 16)	Simples	Fenocchio <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhynodoras sp.</i>			Bacia do Araguaia/ Barra do Garça - MT	58	22M + 16SM + 12ST + 8A	108			Venere <i>et al.</i> (1995)
<i>Trachydoras</i>									
<i>T. paraguayensis</i>			R. Paraná - Posadas/Argentina	56	32M + 20SM + 4ST	112	Intersticial, braço longo, SM	Simples	Fenocchio <i>et al.</i> (1993)
			Alto Rio Paraná	56	32M + 20SM + 4ST	108	Intersticial, SM	Simples	Paiva e Julio Jr. (2001)

HEPTAPTERIDAE

<i>Cetopsorhamdia</i>							
<i>C.cf. iheringi</i>	Rep. Três Marias - MG	58	22M + 16SM + 10ST + 10A	108	Intersticial, M	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2003)
<i>C. iheringi</i>	R. Capivara, R. Pardo – SP	58	28M+ 24SM + 6ST	116	Intersticial (par 15)	Simples/Presente	Vissoto <i>et al.</i> (1999a)
<i>Cetopsorhamdia</i> sp.	C. Canta Galo – SP	58	22M + 16SM + 10ST + 10A	106	Intersticial, ST	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2003)
<i>Heptapterus</i>							
<i>H. longicauda</i>	C. Quinta –SP	52	22M + 12SM + 20ST	104	Terminal, M e ST	Múltipla/ Presente	Vissoto <i>et al.</i> (1999a)
<i>Imparfinis</i>							
<i>I. mirini</i>	R. Tiete e Paranapanema – SP	58	24M + 34SM	116	Intersticial, M	Simples/Presente	Vissoto <i>et al.</i> , 1997, Vissoto (2000)
<i>I. cf. piperatus</i>	R. Juquiá – SP	56	24M + 12SM + 20ST	112	Intersticial, ST	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2003)
<i>I. piperatus</i>	R. São João – SP	56	56M/SM/ST	112	Intersticial, SM	Simples	Vicente <i>et al.</i> , (1994)
<i>Imparfinis</i> sp.	C. Canta Galo – SP	58	22M + 18SM + 10ST + 8A	108	Intersticial, M/SM	Simples	Fenocchio (1993)
<i>I. aff. schubarti</i>	Córrego do Canta Galo – SP Ribeirão Três Bocas – PR	58	22M + 18SM + 10ST + 8A	108	Braço longo (par 1)	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2003)
<i>I. aff. schubarti</i>	R. Tibagi – PR	58	28M + 28SM + 2A	114	Intersticial (par 1)	Simples/ Presente	Stolf <i>et al.</i> , (2004)
<i>Pariolius</i>							
<i>P. hollandi</i>	R. Iguaçú – PR	42	22M + 10SM + 4ST + 6A	78	Terminal (par 13)	Simples/Presente	Roman <i>et al</i> (2002a)
	R. Tibagi – PR	52	22M + 16SM + 4ST + 10A	94	Braço curto, ST	Simples/Presente	García, <i>et al</i> (2004)
<i>Pimelodella</i>							
<i>P. avanhandavae</i>	R. Araquá, R. Capivara – SP	46	20M + 20SM + 6ST	92	Braço curto, SM	Simples/Presente	Vissoto <i>et al.</i> , (1999a)
<i>P. aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi – PR	52	30M + 22SM	104	Braço curto, SM	Simples	Swarça <i>et al.</i> , (2003a)
<i>P. kroni</i>	Iporanga – SP	58	20M + 32SM + 6ST/A	110	Braço curto, SM	Simples	Almeida-Toledo <i>et al.</i> (1992)
<i>Pimelodella</i> sp.	R. Mogi-Guaçu, R. Pardo - SP	46	28M + 10SM + 8A	82			Toledo e Ferrari (1976a)
	R. Mogi-Guaçu – SP	46	40M/SM + 6ST/A ♀ 38M/SM + 6ST/A + 1SM ♂	86	M/SM, variação no nº de segmentos	Simples/Presente	Dias e Foresti (1993)
<i>P. meeki</i>	R. Tibagi – PR	46	30M + 12SM + 4ST	92	Braço curto, SM	Simples/Presente	Vidotto <i>et al.</i> , (2004)
	R. Gabriel da Cunha – PR	46	30M + 12SM + 4ST	92	Braço curto, SM	Simples/Presente	Vidotto <i>et al.</i> , (2004)
	R. Couro de Boi – PR	46	30M + 12SM + 4ST	92	Braço curto, SM	Simples/ presente	Vidotto <i>et al.</i> , (2004)
<i>Pimelodella</i> sp.1	R. Paraná	46	20M + 20SM + 6A	86	Braço curto (par 12)	Simples	Vasconcelos e Martins Santos (2000)
<i>Pimelodella</i> sp.2	R. Paraná	52	22M + 22SM + 8ST	104	Braço curto, SM	Simples/Presente	Vasconcelos e Martins Santos (2000)
<i>P. transitória</i>	Iporanga – SP	58	20M + 32SM + 6ST/A	110	Braço curto, SM	Simples	Almeida-Toledo <i>et al.</i> (1992)
<i>Rhamdella</i>							
<i>R. microcephala</i>	R. Machado – MG	56	18M + 30SM + 8ST/A	104	Intersticial, SM	Simples	Fonseca <i>et al.</i> , (2001)
<i>Rhamdella</i> sp.	Itaeté – BA	56	26M/SM + 30ST/A	82			Souza <i>et al.</i> (1994)
<i>Rhamdia</i>							
<i>R. brannei</i>	R. Iguaçú – PR	58	22M + 18SM + 2ST + 2A	86		Múltiplo	Abucarma e Martins-Santos (1996)
	R. Iguaçú – PR	58	30M + 10SM + 14ST + 4A	112	Braço curto, ST	Simples	Roman <i>et al</i> (2002b)
<i>R. hilarii</i>	R. da Onça – SP	62		116			Toledo e Ferrari (1976a)
	Rep do Monjolinho – SP	58		≥ 100	Terminal, M/SM	Simples/Presente	Fenocchio (1993)
	Lagoa Nova e Jataí – SP	58					Fenocchio (1993)
	C. Hortelã – SP	58	30M + 18SM + 10ST	106	Braço curto, (par 19)	Simples	Vissoto <i>et al</i> (1999b)
	Rep do Lobo – SP	58		≥ 100	Braço curto, ST	Simples/Presente	Fenocchio (2000)
	R. Mogi-Guaçu – SP						

	Rep de Três Marias - MG						
	R. Aguapey - Argentina						
	R. Mogi-Guaçu - SP	58	58M/SM	116	Braço curto, ST	Simples/Presente	Maistro <i>et al</i> (2002)
	R. Aguapey - Argentina	58	26M + 16SM + 8ST + 8A	108	Braço curto, ST	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2003)
<i>R. quelen</i>	L. dos Quadros, R. Guaíba - RS	58	52M + 6A	110	Braço curto, A	Simples/Presente	Hoechberg e Erdtmann (1988)
	R. Mogi-Guaçu - SP						
	R. Iguacu - PR	58		≥ 100	Braço curto, ST	Simples/Presente	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
	R. Paraná - Argentina						
	R. Tigagi - PR	58			Terminal, SM	Simples	Carvalho e Dias (2001)
	R. Aguapei	58	26M + 20SM + 6ST + 6A	110	Braço curto, ST	Simples	Stivari <i>et al.</i> (2002)
	R. Paraná - Argentina	58	26M + 16SM + 8ST + 8A	108	Braço curto, ST	Simples	Fenocchio <i>et al</i> (2003)
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires - Argentina	58	44M/SM + 14ST/A	102			Varcacel <i>et al</i> (1993)
<i>Rhamdia sp.</i>	R. Sapucaí -MG	58				Múltiplo	Andrade <i>et al</i> (1998)
	R. Iguacu - PR	58				Múltiplo	Abucarma e Martins-Santos (1996)
	R. São João - PR	58	26M + 10S + 10ST + 12A	104	Terminal (par 27)	Simples	Roman <i>et al</i> (2001)
	C. Grande - B. do Paraíba do Sul	58	46M/SM + 12ST	116	Terminal (par 27)	Simples/Presente	Garcia <i>et al</i> (2003)
<i>R. voulezi</i>	R. Iguacu	58	30M + 10SM + 14ST + 4A	112	Terminal (par 28)		Roman <i>et al</i> (2001)
PIMELODIDAE							
<u><i>Bergiaria</i></u>							
<i>B. westermanni</i>	R. São Francisco - MG	56	42M/SM + 14ST	116	Terminal , braço longo	Simples	Dias e Foresti (1993)
<u><i>Callophysus</i></u>							
<i>C. macropterus</i>	R. Negro/ R. Solimões - AM	50	22M + 18SM + 10A	90	Terminal , braço curto, A	Simples / Presente	Gil <i>et al.</i> (1998)
<u><i>Conorhynchus</i></u>							
<i>C. conirostris</i>	R. São Francisco/ Três Marias - MG	60	20M + 18SM + 10ST + 12A	108	Terminal, braço longo (par 23)	Simples	Garcia (2003)
<u><i>Iheringichthys</i></u>							
<i>I. labrosus</i>	R. Paraná - PR	56	42M/SM + 14ST/A	98	Terminal , braço longo, ST/A	Simples	Garcia <i>et al.</i> (1990)
	R. Mogi-Guaçu - SP	56	26M + 14SM + 12ST + 4A	108			Dias e Foresti (1990)
	R. Tibagi - PR	56	18M + 16SM + 12ST + 10A	102	Terminal , braço longo	Múltiplo	Silva <i>et al.</i> (1996)
	R. Jurumirim - SP	56	22M + 18SM + 10ST + 6A	106	Terminal , braço longo (par 23)	Simples	Vissoto <i>et al</i> (1999b)
	R. Tibagi - PR	56	32M + 8SM + 6ST + 10A	102			Carvalho et al., (2004)
<u><i>Hemisurubim</i></u>							
<i>H. platyrnchos</i>	R. Paraná - PR	56	22M + 18SM + 6ST + 10A	102			Martins-Santos <i>et al.</i> (1996)
	R. Araguaia / Barra do Garça - MT	56	40M/SM + 16ST/A	96	Braço curto, SM médios	Simples	Faria <i>et al.</i> (2000)
<u><i>Hypophthalmus</i></u>							
<i>H. edentatus</i>	R. Paraná - PR	56	40M/SM + 16ST/A	96			Martins-Santos <i>et al.</i> (1988)
<u><i>Parapimelodus</i></u>							
<i>P. valenciennes</i>	R. Guaíba	56					Costa e Reggi (1986)
<u><i>Pimelodus</i></u>							
<i>P. absconditus</i>	R. Tibagi - PR	56	24M + 16SM + 10ST + 6A	106	Terminal, braço longo, ST	Simples	Souza e Dias (2000)
	R. Paraná - PR	56	24M + 18SM + 8ST + 6A	106	Terminal. Braço longo, ST	Simples	Borin e Martins-Santos (2002)
<i>P. altipinnis</i>	R. Guamá - PA	56	46M/SM + 10ST/A	102	Terminal, braço longo, SM	Simples	Souza <i>et al.</i> (2000a)
<i>P. argentus</i>	R. Paraguai / Corumbá - MS	56	24M + 16SM + 12ST + 4A	108	Braço curto (par 26)	Simples / Presente	Souza <i>et al</i> (2003)
<i>P. blochii</i>	R. Araguaia / Barra do Garça - MT	56	36M/SM + 20ST/A	92	Terminal , braço curto, SM	Simples	Faria <i>et al.</i> (2000)

<i>P. clarias</i>	Argentina	56					Fenocchio <i>et al.</i> (1994)
<i>P. fur</i>	R. Mogi, R. Pardo, R. Onça - SP	56	30M + 14SM + 12A	100			Toledo e Ferrari (1976b)
<i>P. heraldoi</i>	R. Tibagi - PR	56	22M + 22SM + 6ST + 6A	106	Terminal, braço longo, par 25	Simple	Souza <i>et al.</i> , (2004a)
<i>P. maculatus</i>	R. Mogi, R. Pardo, R. Onça - SP	56	30M + 14SM + 12A	100			Toledo e Ferrari (1976b)
	R. São Francisco –MG; R. Mogi-Guaçu - SP	56	40M/SM + 16 ST/A	96	Terminal, braço longo (par 23)	Simple	Dias e Foresti (1993)
	R. Tibagi - PR	56	20M + 20SM + 10ST + 6A	106	Braço longo, ST	Simple	Swarça <i>et al.</i> (2001c)
	R. Paranapanema -SP	56	20M + 20SM + 10ST + 6A	106	Terminal, braço longo, ST	Simple	Vissoto <i>et al.</i> (1999a)
	R. Jarí Almerim - PA	58	30M/SM + 28ST/A	88	Terminal, braço longo, SM e ST	Múltiplo	Souza <i>et al.</i> (2000b)
	R. Paraná – PR	56	20M + 20SM + 10ST + 6A	106	Terminal, braço longo, ST	Simple	Borin e Martins-Santos (2002)
	R. Paraguai / Corumbá - MS	56	22M + 16SM + 10ST + 8A	104	Terminal, braço longo (par 23)	Simple	Souza <i>et al.</i> (2003)
<i>P. mysteriosus</i>	R. Paraguai / Corumbá - MS	56	26M + 20SM + 2ST + 8A	104	Braço curto (par 24)	Simple	Souza <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ornatus</i>	R. Paraná - PR	56	18M + 22SM + 6ST + 10A	102	Braço curto, ST	Simple	Abucarma e Martins-Santos (1996)
	R. Paraná; - PR	56	20M + 18SM + 8ST + 10A	108	Braço curto, ST	Simple	Borin e Martins-Santos (2002)
<i>P. ortomanni</i>	R. Iguacu - PR	56	20M + 12SM + 14ST + 10A	102	Terminal, braço longo, ST	Simple	Margarido e Gavasso (2000)
	R. Paraná; R. Iguacu - PR	56	24M + 20SM + 6ST + 6A	100	Terminal, braço longo, SM	Simple / Presente	Borin e Martins-Santos (2000)
	R. Iguacu - PR	56			Intersticial, braço longo, SM	Simple	Terencio <i>et al.</i> (2001)
<i>Pimelodus</i> sp.	R. Mogi, R. Pardo, R. Onça - SP	56	30M + 14SM + 12A	100			Toledo e Ferrari (1976b)
	R. São Francisco - SP	56	40M/SM + 16ST/A	96	Terminal, braço longo, ST/A	Simple	Dias e Foresti (1993)
	R. Iguacu - PR	56	30M + 16SM + 8ST + 2A	102	Terminal, braço longo, SM	Simple / Presente	Borin e Martins-Santos (2000)
	R. Tibagi - PR	56	24M + 26SM + 4ST + 2A	110	Terminal, braço longo, par 26	Simple/Presente	Souza <i>et al.</i> , (2004a)
<u><i>Pirinampus</i></u>							
<i>P. pirinampu</i>	R. Tibagi- PR	50	26M + 12SM + 2ST + 10A	110	Braço curto, ST	Simple / Presente	Swarça <i>et al.</i> (1999)
	R. Paraná _PR	50	22M + 12SM + 4ST + 12A	88	Braço curto (par 21)	Simple / Presente	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<u><i>Pseudoplatystoma</i></u>							
<i>P. corruscans</i>	Coxins - MG	56	42M/SM + 14ST/A	98	Braço curto, SM	Simple	Souza <i>et al.</i> (1992)
	R. Mogi- Guaçu - SP	56	18M + 18SM + 10ST + 10A	102	Braço curto, SM	Simple	Bigoni <i>et al.</i> (1992)
	R. Paraná - PR	56	18M + 16SM + 10ST + 12A	100			Martins-Santos <i>et al.</i> (1996)
	R. Paraná - PR	56	26M + 10SM + 6ST + 14A	98	Braço curto, SM	Simple	Swarça <i>et al.</i> (2000)
	R. Miranda - MS	56	20M + 16SM + 8ST + 12A	100	Terminal, braço curto, A	Simple	Swarça <i>et al.</i> (2000)
	R. São Francisco/ Três Marias - MG	56	20M + 12SM + 12ST + 12A	100			Fenocchio (1993)
<i>P. fasciatum</i>	R. Solimões – AM	56	18M + 14SM + 8ST + 14A	94	Braço curto, ST	Simple	Fenocchio e Bertollo (1992)
	Bacia R. Paraguai	56	20M + 12SM + 12ST + 12A	100	SM	Simple	Porto-Foresti <i>et al.</i> (2000)
<i>P. tigrinum</i>	R. Solimões – AM	56	18M + 16SM + 8ST + 14A	98	Braço curto, ST	Simple	Fenocchio e Bertollo (1992)
<u><i>Steindachneridion</i></u>							
<i>S. scripta</i>		56	24M + 20SM + 4ST + 8A	100	1º par de A	Simple / Presente	Swarça (inf. pessoal)
<i>Steindachneridion</i> sp.		56	20M + 24SM + 2ST + 10A ♀ 20M + 22SM + 2ST + 10A +M +SM ♂	102	Sub-terminal, braço curto, 1º par de A (três blocos separados por região não marcada)	Simple / Presente	Swarça <i>et al.</i> , (2002a,b)
<u><i>Sorubim</i></u>							
<i>S. lima</i>	R. Solimões – AM	56	18M + 12SM + 14ST + 12A	100	Braço curto(dois blocos separados por região não marcada)	Simple	Fenocchio e Bertollo (1992)
	R. Paraná - PR	56	20M + 14SM + 10ST + 12A	100			Martins-Santos <i>et al.</i> (1996)
<u><i>Zungaru</i></u>							
<i>Z. zungaru</i>	R. Paraná - PR	56	26M + 10SM + 6ST + 14A	108			Martins-Santos <i>et al.</i> (1996)

	Estação de Piscicultura da CESP - SP	56	32M + 6SM + 8ST + 10A	102	Telomérica, braço curto, (par 20)	Simples / Presente	Swarça <i>et al.</i> (2001,b)
PSEUDOPIMELODIDAE							
<u>Lophosilurus</u>							
	<i>L. alexandri</i>	54	34M/SM + 20 ST/A	88			Mestriner e Galetti Jr. (1986)
	R. São Francisco/ Três Marias - MG	54	34M/SM + 20 ST/A	88		Simples	Heras e Moreira Filho (1996)
	R. São Francisco/ Três Marias - MG	54	16M + 18SM + 10ST + 10A	98	Braço curto, SM	Simples / Presente	Garcia (2003)
<u>Microglanis</u>							
	<i>M. cottoides</i>	54	22M + 20SM + 12ST	108	Teloméricas, M grandes	Simples	Vissoto <i>et al</i> (1999a)
	R. Araquá; R. Capivara - SP						
<u>Pseudopimelodus</u>							
	<i>P. mangurus</i>	54	6M + 26SM + 12ST + 10A	98	Braço curto, (par 19)	Simples	Martinez, <i>et al</i> (2004)

Legenda: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, RONS = regiões organizadoras de nucléolo, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico. (Obs: o NF de todas as espécies foi recalculado para uma padronização da tabela, para tal os cromossomos M, SM e ST foram considerados como portadores de dois braços e os cromossomos A como portadores de apenas um braço cromossômico)

Estudos realizados por Vissoto *et al.* (1999a) em *Cetopsorhamdia iheringi*, *Heptapterus longicaudata* e *Pimelodella avanhandavae*, evidenciaram blocos heterocromáticos centroméricos pequenos, intersticiais e teloméricos, sendo que apenas *C. iheringi* apresentou uma maior quantidade de heterocromatina em posição centromérica e telomérica em relação às demais espécies estudadas.

No gênero *Imparfinis*, as análises já realizadas demonstraram a existência de marcações centroméricas, teloméricas e pericentroméricas em *I. piperatus* (Vicente *et al.*, 1994) e *I. schubarti* (Stolf e Dias, 2001), e em *I. cf. piperatus* (Fenocchio, 1993) ainda foram observadas regiões heterocromáticas que correspondiam as RONS, e também blocos C positivos intersticiais. No caso dos estudos envolvendo *I. mirini* realizados por Vissoto (2000), identificou-se a ocorrência de um polimorfismo envolvendo blocos heterocromáticos em cinco populações pertencentes a afluentes do Rio Tietê e Paranapanema. 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). Este caso foi inicialmente considerado pelos autores (Vissoto *et al.*, 1997) como um possível sistema sexual do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo W (submetacêntrico) das fêmeas era tido como portador de um grande bloco heterocromático terminal localizado no braço longo.

Estudos realizados em *Pariolius* sp. demonstraram que esta espécie possui pouca quantidade de heterocromatina, estando esta restrita à região das RONS e à região telomérica do braço menor do par cromossômico 17 (Roman *et al.*, 2002a)

Vasconcelos e Martins-Santos (2000) recentemente observaram bandas heterocromáticas fracas em posição centromérica e telomérica, além de RONS banda C

positiva em *Pimelodella* sp. 1 e *Pimelodella* sp. 2 do Rio Paraná. Em *Pimelodella* sp. 1 foi ainda observado um polimorfismo de tamanho entre blocos heterocromáticos próximos à região pericentromérica do décimo segundo par cromossômico, e para *Pimelodella* sp.2 quatro cromossomos marcadores que correspondem aos pares 3, 9, 16 e 18. 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 em ambas as espécies.

Os primeiros estudos envolvendo a espécie *Rhamdella microcephala*, realizados por Fonseca *et al.* (2001), demonstraram a presença de blocos heterocromáticos evidentes nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos do complemento, sendo mais proeminentes no primeiro par de cromossomos metacêntricos. Além destas marcações, foram observados blocos teloméricos nos pares 14, 25 e 26, além da RON heterocromática.

Um dos gêneros mais estudados da família Heptapteridae é o gênero *Rhamdia*, entretanto, os dados referentes à aplicação da técnica de bandeamento C ainda são escassos. Fenocchio e Bertollo (1990), Fenocchio *et al.* (2000) e Maistro *et al.* (2002), estudando populações de *Rhamdia hilarii*, encontraram uma pequena quantidade de heterocromatina, sendo que as bandas apresentavam-se pálidas; as RONS demonstraram-se heterocromáticas, bem como ambas as regiões teloméricas de alguns cromossomos metacêntricos, que segundo os autores, equivaleriam a cromossomos supranumerários. Vissoto *et al.* (1999b), estudando a mesma espécie, encontrou o mesmo padrão de distribuição de heterocromatina, porém os cromossomos supranumerários demonstraram-se totalmente heterocromáticos.

Estudos realizados em *Rhamdia quelen* demonstram também uma pequena quantidade de heterocromatina distribuída pelos cromossomos do complemento (Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio *et al.*, 2000; Fenocchio *et al.*, 2002; Stivari *et al.*, 2002), sendo que os cromossomos supranumerários podem apresentar-se totalmente heterocromáticos (Hochberg e

Erdtmann, 1988) ou com ambos os telômeros marcados pelo bandamento C (Fenocchio *et al*, 2000; Stivari *et al.*, 2002).

Roman *et al.* (2001), evidenciaram em *Rhamdia* sp. marcações C positivas em regiões centroméricas nos pares cromossômicos 2, 10 e 24, e pericentroméricas no braço longo do par 14. Em *Rhamdia voluezi*, os autores encontraram marcações teloméricas em ambos os braços dos cromossomos dos pares 1 e 10, teloméricas no 2º par e pericentroméricas no 17º. Em ambas as espécies as RONS mostraram-se C positivas.

Vissoto *et al.* (1999a) analisaram quatro machos e nove fêmeas pertencentes à espécie *Microglanis cottoides*, sendo este o primeiro estudo citogenético referente a este gênero. Os autores identificaram regiões heterocromáticas localizadas em posições centroméricas, intersticiais e teloméricas, sendo as marcações pequenas.

Estudos realizados em *Bergiaria westermanni* evidenciam cromossomos supranumerários totalmente heterocromáticos, havendo uma variação inter e intraindividual destes (Dias e Foresti, 1993).

Em *Conorhynchus conirostris* (Garcia, 2003) e *Hemisorubim platyrhynchus* (Martins-Santos *et al*, 1996) foram observados blocos heterocromáticos distribuídos centromérica e telomericamente.

Iheringichtys labrosus apresentou cromossomos supranumerários e alguns braços dos demais cromossomos do complemento cromossômico padrão totalmente heterocromáticos, além de marcações centroméricas e teloméricas (Dias e Foresti, 1990). Estas últimas também foram encontradas por Garcia *et al.* (1990), embora alguns pares não apresentassem as mesmas tão evidentes. Vissoto *et al* (1999b), realizando estudos nesta mesma espécie, também encontraram cromossomos supranumerários totalmente eucromáticos, além de blocos de heterocromatina intersticiais e teloméricos. Em análises mais recentes envolvendo a espécie, Carvalho e Dias (2004) encontraram blocos heterocromáticos localizados

principalmente nas regiões teloméricas, além de um par cromossômico marcado fortemente em ambos os telômeros e cromossomos supranumerários totalmente heterocromáticos.

O estudo das regiões compostas por heterocromatina constitutiva em *Pimelodus absconditus* evidenciou marcações em diversos cromossomos do complemento, em posições centroméricas e teloméricas (Souza e Dias, 2000), já em *Pimelodus altipinnis*, os blocos heterocromáticos localizam-se distal e intersticialmente segundo Souza *et al.* (2000a).

Borin e Martins-Santos (2002), estudando exemplares de *Pimelodus absconditus*, *P. maculatus* e *P. ornatus*, encontraram blocos heterocromáticos localizados, em sua maioria, em posição centromérica e telomérica. Em *P. maculatus* ainda foram observadas marcações intersticiais no 11° e 21° pares e em *P. ornatus* estas se localizavam no 22° par. Para as três espécies as RONS mostraram-se heterocromáticas.

As mesmas autoras realizaram ainda estudos em exemplares de *Pimelodus* sp e *P. ortomani*, observando blocos heterocromáticos que se localizavam, em sua maioria, em posição telomérica e centromérica, além de uma marcação intersticial na região proximal ao centrômero, nos braços curtos, do primeiro par de cromossomos submetacêntricos. Ambas as espécies apresentaram uma variação de 0-4 cromossomos supranumerários pequenos, os quais podem ser classificados como acrocêntricos ou metacêntricos. Em exemplares de *P. ortomani*, os supranumerários mostraram-se heterocromáticos, independentemente de sua morfologia; já em *Pimelodus* sp., estes se mostraram totalmente heterocromáticos quando eram metacêntricos e parcialmente heterocromáticos quando acrocêntricos (Borin e Martins-Santos, 2000).

Swarça *et al.* (2001c) e Souza *et al.* (2004), através de estudos cromossômicos em diferentes populações de *Pimelodus maculatus*, encontraram bandas de heterocromatina em regiões centroméricas e teloméricas, sendo algumas destas intersticiais. O mesmo ocorreu com Vissoto *et al.* (1999a), que visualizaram os mesmos tipos de marcações, sendo, porém, as

marcações teloméricas e centroméricas constituídas por blocos maiores e mais evidentes que as marcações intersticiais.

Em *Pimelodus ortomanni*, Margarido e Gavasso (2000) demonstram que os blocos heterocromáticos estão restritos a quatro pares cromossômicos, ocupando posições teloméricas e centroméricas, as RONS também se mostraram heterocromáticas.

Em *Pimelodus* sp., através do bandeamento C, observaram-se marcações teloméricas e/ou centroméricas em diversos cromossomos, sendo que marcações biteloméricas também foram encontradas (Souza *et al.*, 2004)

Souza *et al.* (2003) estudaram três espécies pertencentes ao gênero *Pimelodus*, sendo estas: *P. argenteus*, *P. misteriosus* e *P. maculatus*. As autoras observaram um padrão de distribuição de heterocromatina bastante semelhante para estas espécies, embora quantitativamente diferente. Em *P. maculatus* ainda pode ser observado um par cromossômico portador de um grande bloco intersticial, não presente nas demais espécies analisadas.

A aplicação da técnica de bandeamento C em *Pinirampus pinirampu* evidenciou diversos blocos heterocromáticos em regiões centroméricas e teloméricas (Swarça *et al.*, 1999). Estudos posteriores, envolvendo a espécie e realizados por Vasconcelos e Martins-Santos (2000), demonstram predominância de marcações pericentroméricas e teloméricas pelo complemento e quatro pares de cromossomos marcadores. O par de cromossomos 21 apresentou RONS heterocromáticas. Em um dos homólogos deste par cromossômico observa-se um bloco positivo em posição centromérica e outro em posição intersticial (no braço longo do cromossomo). No outro componente do par, a banda intersticial encontrava-se ausente. Os autores sugerem que este polimorfismo poderia estar relacionado com uma provável inversão, seguida por deleção.

Em *Pseudoplatystoma coruscans*, encontrou-se uma variação intraespecífica nos padrões de bandeamento. A região da RON é heterocromática, assim como suas regiões adjacentes. As marcações encontram-se presentes também em outros pares cromossômicos, sendo basicamente teloméricas (Bigoni *et al.*, 1992). Em *Pseudoplatystoma fasciatum*, Porto Foresti *et al.* (2000) encontraram marcações conspícuas nas regiões terminais de alguns cromossomos e também pequenos blocos pericentroméricos.

Estudos realizados em *Sorubim lima*, por Martins-Santos *et al.* (1996), demonstram que a heterocromatina nesta espécie distribui-se nas regiões teloméricas e centroméricas por alguns cromossomos do complemento.

Em *Stendachneridion scripta* observou-se pouca quantidade de heterocromatina constitutiva, sendo que a RON mostra-se heterocromática (Swarça, inf. pessoal). Padrão semelhante de distribuição da heterocromatina também foi encontrado em *Stendachneridion* sp. (Swarça *et al.*, 2002c). Esta espécie ainda apresentou um mecanismo cromossômico sexual do tipo XX/XY e neste caso, a técnica de bandeamento C não permitiu a identificação do cromossomo X, e o cromossomo Y não apresentou nenhum bloco heterocromático, indicando que um processo de heterocromatinização não estaria envolvido na origem do sistema sexual (Swarça *et al.*, 2002a).

Estudos recentes realizados por Swarça *et al.* (2001b) em exemplares de *Zungaro zungaro*, demonstraram que a distribuição da heterocromatina constitutiva limita-se a regiões teloméricas e centroméricas, onde são fracamente observadas. As RONS também se mostraram heterocromáticas.

Vissoto *et al.* (1999a) analisaram quatro machos e nove fêmeas pertencentes à espécie *Microglanis cottoides*, sendo este o primeiro estudo citogenético referente a este gênero. Os autores identificaram regiões heterocromáticas localizadas em posições centroméricas, intersticiais e teloméricas, sendo as marcações pequenas.

Garcia (2003) observou em *L. alexandri* blocos banda C positivos distribuídos em regiões centroméricas e teloméricas da maioria dos cromossomos do complemento, e ainda um par de cromossomos submetacêntricos com os braços longos totalmente heterocromáticos.

2.6 Aplicação de fluorocromos e localização de DNAr em peixes: ênfase no estudo das regiões organizadoras nucleolares

O nucléolo, nada mais é, do que uma estrutura celular temporária onde se formam as subunidades ribossômicas. Chama-se de região organizadora de nucléolo o seguimento cromossômico responsável pela formação desta estrutura e que porta os genes DNAr (DNA ribossômico) 45S.

Nos eucariotos, encontram-se quatro tipos de RNAr (RNA ribossômico), os quais diferem tanto em sua composição, quanto em seu coeficiente de sedimentação. Todos estes RNAr são codificados por múltiplas cópias de genes.

Os DNAr 18S, 5.8S e 28S, fazem parte de uma mesma unidade de transcrição (DNAr 45S). Estas unidades encontram-se organizadas em tandem (em ordem dentro de uma seqüência gênica repetitiva), separadas por seqüências internas de genes, os espaçadores transcritos internos, e encontram-se localizadas nas regiões das RONS. Já o DNAr 5S é transcrito independentemente, localizando-se separadamente daqueles responsáveis pelos outros três tipos de RNAr. Este gene, também apresenta múltiplas cópias arranjadas em tandem e separadas por espaçadores transcritos, localizando-se, na grande maioria dos eucariotes, em regiões cromossômicas diferentes da região das RONS (Martins e Wasko, 2004)

É sugerido que tais diferenças funcionais entre os genes responsáveis pelos RNAr, resultariam na necessidade de uma diferente localização destes, de forma que as seqüências conservadas poderiam ser então mantidas evitando interferências na função gênica, uma vez

que a ocorrência de translocações entre os genes de RNAr 5S e os dos demais DNAr seria dificultada (Martins e Galetti Jr., 1999).

Atualmente, para a identificação das RONS em vertebrados inferiores, utilizam-se diferentes metodologias, tais como a impregnação por nitrato de prata, coloração por fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* com sondas específicas.

A impregnação por nitrato de prata descrita por Howell e Black (1980), consiste em um procedimento simples, rápido e barato. Através deste tratamento os cromossomos adquirem uma coloração amarelada e as RONS cor mais escura. Os sais de prata envolvidos no processo não possuem afinidade pela RON em si, mas por proteínas acídicas específicas que participaram da formação das subunidades ribossômicas no ciclo celular anterior (Howell, 1977), desta forma, esta técnica só permite a identificação de RONS que apresentaram atividade na interfase precedente.

O estudo destas regiões em peixes têm ajudado na caracterização cariotípica de diversas espécies, em alguns grupos é marcante a ocorrência de RONS simples, como é o caso de Curimatidae, Anostomidae, Paradontidae, Prochilodontidae; para outros, o que prevalece é a ocorrência de RONS múltiplas, tais como Callichthyidae, Characidae, Erythrinidae, entre outros.

A utilização das RONS na caracterização citogenética de algumas espécies tem apresentado grande valia. Como exemplo podemos citar o estudo de Galetti Jr. *et al.*, (1984a), através do qual oito espécies de peixes pertencentes à família Anostomidae foram caracterizadas com base na localização destas regiões em diferentes pares cromossômicos. Situação semelhante foi observada por Venere e Galetti Jr. (1989) para diferentes espécies de Curimatidae.

Casos de RONS polimórficas, no que diz respeito à localização (Feldberg *et al.*, 1992) e tamanho (Foresti *et al.*, 1981; Galetti Jr. *et al.*, 1984a; Moreira Filho *et al.*, 1984; Garcia,

2003), tem sido freqüentemente relatadas; A ocorrência de polimorfismos inter-individuais também foi observada em *Apareiodon affinis* (Jesus *et al.*, 1999) e *Serrasalmus* (Cestari e Galetti Jr., 1992). Casos de RONS localizadas em cromossomos sexuais já foram descritos em: *Salvelinus alpinus* (Reed e Phillips, 1997), *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000) e *Triportheus* (Artoni e Bertollo, 2002).

Os dados referentes ao estudo das RONS, demonstram entre os representantes das famílias analisadas no presente trabalho, o predomínio de RONS simples, localizadas em diferentes posições e em diferentes cromossomos (Tabela 1). Entretanto, nestas famílias são observadas espécies com RONS múltiplas, como: *Heptapterus longicauda* (Vissoto *et al.*, 1999a) e *Liosomadoras oncinus* (Souza *et al.*, 2002). As marcações são, em sua maioria, do mesmo tamanho entre os homólogos. Há porém, casos em que estas são heteromórficas, e esta diferença de tamanho pode ser, algumas vezes, também observada após a aplicação de outras técnicas citogenéticas.

Fluorocromos são corantes fluorescentes ligantes de DNA, geralmente utilizados juntamente com um contracorante. Estes corantes podem ser divididos em duas classes: os AT específicos, que se ligam preferencialmente a seqüências ricas em bases AT, sendo o DAPI, Hoescht 33258 e a quinacrina os mais comumente utilizados; e os GC específicos, como a cromomicina A₃ (CMA₃) e a mitramicina (MM) (Verma e Babu, 1995).

Em alguns peixes, fluorocromos GC-específicos apresentam uma notável relação com as RONS. A coincidência de localização entre as marcações obtidas pela aplicação de fluorocromos GC-específicos e as resultantes da impregnação por nitrato de prata, seria possível, segundo Pendáz *et al.*, (1993), devido ao fato da provável ocorrência de altos conteúdos de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre seqüências de DNA repetitivos adjacentes. Desta forma, esta técnica permitiria a identificação das RONS independentemente de sua atividade durante o ciclo celular anterior. Vale ressaltar, entretanto,

que em alguns trabalhos as Ag-RONs não se mostraram positivamente coradas por CMA₃ ou MM (Morelli, 1998; Fontana *et al.*, 1998). Além disso, regiões livres de rDNA também podem ser evidenciadas pelo nitrato de prata, provavelmente pela presença de proteínas ricas em resíduos acídicos (Sumner, 1990; Sanchez *et al.*, 1995; Dobigny *et al.*, 2002).

Fluorocromos AT-específicos produzem poucas ou nenhuma banda positiva em peixes. Geralmente a coloração por estes corantes resulta em bandas negativas coincidentes com aquelas CMA₃ positivas ou em uma coloração homogênea do complemento. Há, porém, casos onde a aplicação destes fluorocromos resultou em sinais positivos adjacentes a porções GC ricas (Mayr *et al.*, 1988; Artoni *et al.*, 1999).

Os fluorocromos não são utilizados apenas na identificação das RONs, estes muitas vezes também podem ser empregados na caracterização de regiões heterocromáticas, um bom exemplo consiste no estudo de uma população de *Astyanax scabripinnis* realizado por Souza *et al.* (1996), os quais através do uso conjunto de MM, CMA₃ e DAPI, identificaram diferentes tipos de heterocromatina constitutiva e com estes resultados puderam levantar uma proposta sobre a possível origem dos blocos heterocromáticos distais presentes em alguns cromossomos.

Dados referentes à aplicação de fluorocromos são ainda incipientes nas famílias Doradidae, Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae, sendo inexistentes para representantes da família Auchenipteridae.

Milhomem *et al.* (2003) puderam observar em *Platidoras costatus* a existência de sinais fluorescentes CMA₃⁺ na região distal dos braços curtos de um par de cromossomos submetacêntricos, os quais, possivelmente, correspondem aos cromossomos também marcados pela prata. Já a aplicação de DAPI resultou em marcações coincidentes com o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.

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 as RONS e outras marcações em posições teloméricas e intersticiais, já a coloração com DAPI apresentou-se homogênea para todos os cromossomos.

A aplicação de fluorocromos GC-específicos em *Pariolius hollandi* (Roman *et al.*, 2002a), *Rhamdia branneri* (Roman *et al.*, 2002b) e *R. quelen* (Fenocchio *et al.*, 2002, Maistro *et al.*, 2002) demonstrou que a região das RONS fluorescem intensamente quando coradas, sendo que nenhuma outra marcação adicional foi encontrada. Situação semelhante foi observada por Garcia *et al.*, (2003) em *Rhamdia* sp.

Garcia (2003) observou em *C. conirostris* que o tratamento com cromomicina A₃ evidenciou marcações terminais nos braços longos de um par de cromossomos subteloentéricos, as quais são coincidentes com as marcações obtidas pelo tratamento com impregnação por nitrato de prata. Nenhuma outra marcação adicional foi encontrada no restante do conjunto cromossômico. Em *L. alexandri* também se observou esta coincidência entre as marcações obtidas por este fluorocromo e pelo nitrato de prata. Um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos também foi detectado.

Em *Pimelodus altipinnis*, a aplicação de CMA₃ revelou que a região das RONS respondia positivamente à coloração, sendo, portanto, rica em bases G-C. A aplicação de DAPI, entretanto, mostrou coloração uniforme para todos os cromossomos do complemento (Souza *et al.*, 2000a). Em *Pimelodus heraldoi*, a aplicação de CMA₃ demonstrou que além do par nucleolar, outras marcações positivas podiam ser observadas em outros cromossomos, as quais provavelmente correspondiam a regiões de heterocromatina (Souza *et al.*, 2004).

Estudos realizados com a aplicação de CMA₃ por Borin e Martins-Santos (2000) em espécimes de *Pimelodus ornatus* e *P. ortomanni* evidenciaram marcações coincidentes com as Ag-RONS e marcações mais fracas nos demais cromossomos. As autoras sugerem que estas

marcações poderiam estar relacionadas com a presença de sítios ribossômicos inativos, o que futuramente pretende-se confirmar com a aplicação de outra técnica citogenética, hibridação *in situ* fluorescente. As mesmas autoras encontraram, em outro estudo envolvendo *Pimelodus absconditus*, *P. maculatus* e *P. ornatus*, a mesma coincidência entre as regiões marcadas pela prata e CMA₃ positivas (Borin e Martins-Santos, 2002)

Em *Pimelodus ortomanni*, Margarido e Gavasso (2000) aplicaram coloração por mitramicina, que evidenciou a presença de apenas um par portando marcações, sendo estas coincidentes com as Ag-RONs. O mesmo foi verificado em *Pseudoplatystoma coruscans* (Swarça *et al.*, 2000).

Em estudos mais recentes envolvendo a espécie *Pimelodus* sp. do rio Iguaçu, Souza *et al.* (2004) observaram, além da correspondência de posição com as RONS, um pequeno heteromorfismo de tamanho entre as regiões CMA₃⁺.

Swarça *et al.* (1999), aplicando a técnica por coloração com CMA₃ em *Pinirampus pirinampu*, observaram marcações centroméricas, teloméricas e na região das RONS. As duas primeiras parecem corresponder à heterocromatina constitutiva, sendo que a marcação correspondente as RONS demonstraram-se heteromórficas.

Estudos realizados em *Steindachneridion* sp. e *Rhamdia quelen*, combinados às técnicas de bandeamento C e a coloração por fluorocromos AT e GC específicos, resultaram em um padrão de marcações diferentes daquele obtido apenas com o uso dos fluorocromos. Metáfases submetidas inicialmente ao bandeamento C e posteriormente coradas com CMA₃ e DAPI, apresentaram marcações em diversos cromossomos que antes não podiam ser observadas. Estas “novas” marcações corresponderiam a regiões ricas em bases GC ou AT, que provavelmente encontrar-se-iam intercaladas ao longo dos cromossomos e que apresentariam uma menor afinidade pelos fluorocromos. Após o tratamento com hidróxido de

bário (o qual relaxaria a estrutura da cromatina) estas regiões sofreram um aumento de sua afinidade o que resultaria no padrão de marcações observado (Swarça *et al.*, 2003b).

Em *Zungaro zungaro*, o tratamento como fluorocromo CMA₃ marcou apenas o par cromossômico correspondente ao par nucleolar, sendo evidenciado um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos (Swarça *et al.*, 2001b).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente consiste na incorporação de uma sonda ao DNA da espécie em estudo, a qual possui uma seqüência específica de nucleotídeos e que posteriormente é evidenciada pela aplicação de um corante fluorescente. Diversas sondas podem ser utilizadas, e as de uso mais comum em peixes são as sondas de DNAr 18S, 5S e teloméricas.

A hibridação *in situ* utilizando como sonda seqüências formadoras das RONS (18S, 28S e 45S) consiste em um método mais sensível de detecção destas regiões, principalmente quando comparada com outras técnicas como a impregnação por nitrato de prata e coloração por fluorocromos (Pendás *et al.*, 1993).

Em peixes, ainda existem poucas informações referentes à localização do gene 5S. Os dados até agora obtidos foram bastante variáveis entre as diferentes espécies estudadas, demonstrando que estes genes podem estar presentes em um par cromossômico (Martins e Galetti Jr., 1999, 2000; Kavalco *et al.*, 2004), ou em mais pares (Affonso, 2000; Vicente *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Kavalco *et al.*, 2004); presentes nos cromossomos nucleolares (Pendás, *et al.*, 1994; Hatanaka, 2001; Kavalco *et al.*, 2004) ou em outros cromossomos (Martins e Galetti Jr., 1999,2000; Affonso, 2000; Vicente *et al.*, 2001) e ainda em cromossomos sexuais, como é o caso da truta arco-íris (Morán *et al.*, 1996).

Dados referentes à hibridação *in situ* fluorescente ainda são escassos dentro dos grupos estudados no presente trabalho, estando restritos a poucas espécies das famílias Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae.

A aplicação da sonda de DNAr 18S em *C. conirostris* resultou em um grande sinal fluorescente, bem visível, localizado na porção terminal do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, não sendo observados sinais adicionais. Esta marcação é correspondente àquela obtida pelo tratamento com nitrato de prata e cromomicina A₃. Os sinais fluorescentes obtidos através da aplicação da sonda de DNAr 5S localizam-se em posição centromérica de um par de cromossomos do tipo acrocêntrico grande. Já em *L. alexandri*, observou-se, através do uso da sonda de DNAr 18S, um par de sinais fluorescentes localizados nos braços curtos de um par de cromossomos submetacêntricos, e um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos pode ser detectado. A aplicação da sonda de DNAr 5S resultou em um par de marcações localizadas nos braços curtos de um par de cromossomos subtelo-cêntricos (Garcia, 2003).

Para as espécies *Imparfinis* aff. *schubarti* (Stolf e Dias, 2004), *Pimelodus* sp. e *P. absconditus* (Souza *et al.*, 2004) a aplicação da sonda de DNAr 18S confirmou a existência de apenas um único par cromossômico contendo cístrons ribossômicos, sendo que em *P. absconditus* o heteromorfismo de tamanho entre as marcações visualizadas através da impregnação por nitrato de prata, também foi confirmado através da hibridação. Esta diferença foi atribuída a variações na quantidade de genes de DNAr, ocorrência de crossing desigual ou outros rearranjos que possam envolver estas regiões entre os homólogos (Souza *et al.*, 2004).

Estudos em uma população de *Rhamdia* sp. realizados por Garcia *et al.* (2003) identificaram, através do uso da sonda de DNAr 18S, um sinal fluorescente bem visível, localizado nos braços curtos de um par de cromossomos do tipo subtelo-cêntrico. Os sinais fluorescentes obtidos através da aplicação da sonda de DNAr 5S localizaram-se em posição pericentromérica de um par de cromossomos do tipo meta/submetacêntricos. O indivíduo

triplóide encontrado nesta população apresentou três destas marcações em cromossomos correspondentes.

Em *Pimelodus altipinnis*, Souza *et al.* (2000a) aplicaram uma sonda telomérica humana e através das marcações obtidas evidenciaram o caráter conservativo destas regiões.

Swarça *et al.* (2001a), visando confirmar os dados anteriores obtidos com Ag-RONs e a aplicação da coloração com CMA₃ em *Pirinampus pirinampu*, utilizaram-se da sonda de DNAr 18S e visualizaram marcações coincidentes apenas com as Ag-RONs, sendo que estas mostraram-se heteromórficas em tamanho. Os autores sugerem que este polimorfismo teria sido provavelmente originado a partir de um crossing-over desigual, deleções ou adições de partes cromossômicas.

Em *Pseusoplatystoma corruscans*, Swarça *et al.* (2000) aplicaram sondas de DNAr 18S e 5S em hibridação fluorescente *in situ*. Após o tratamento com a primeira sonda, observaram-se marcações correspondentes apenas às Ag-RONs, sendo detectado um heteromorfismo de tamanho entre estas marcações na população da bacia do rio Paraná, estando este ausente na população da bacia do rio Paraguai. Com relação às marcações obtidas com a sonda 5S, estas se localizam subterminalmente no braço curto do primeiro par de cromossomos subtelocêntricos para as duas populações. Ainda observaram-se marcações pericêntricas fracas no primeiro par de cromossomos metacêntricos na população da bacia do rio Paraguai.

A aplicação de sonda de DNAr 18S em *Steindachneridion* sp. demonstrou a existência de um par de sinais fluorescentes localizados em cromossomos acrocêntricos. Estas são coincidentes com as marcações obtidas através da impregnação por nitrato de prata e coloração por CMA₃. Um heteromorfismo de tamanho entre as marcações pode ser observado através da aplicação destas três técnicas. O uso da sonda de DNAr 5S resultou em

marcações subterminais nos braços curtos de um par cromossomos subtelocêntricos (Swarça *et al.*, 2002b)

Estudos envolvendo a espécie *Zungaro zungaro* evidenciaram após tratamento com sonda de DNAr 18S, a existência de marcações correspondentes àquelas detectadas com cromomicina e nitrato de prata, sendo que também foi observado um heteromorfismo de tamanho entre estas regiões (Swarça *et al.*, 2001b).

2.7 Cromossomos supranumerários e sua ocorrência em Heptapteridae e Pimelodidae

Cromossomos supranumerários são cromossomos extras e que não possuem homologia com os cromossomos do complemento padrão, são geralmente heterocromáticos e comportam-se de maneira irregular durante os processos de meiose e mitose.

Em uma melhor definição, cromossomos B são cromossomos adicionais e dispensáveis, presentes em alguns indivíduos e em algumas populações, que, provavelmente, originaram-se dos cromossomos A (complemento cromossômico padrão) mas que seguem sua própria evolução, não constituindo elementos essenciais ao desenvolvimento (Camacho, 1993).

White (1973), Mountzing (1974), Jones (1975) e Volobujev (1981), realizaram diversos estudos envolvendo supranumerários, com base nestes foram formuladas algumas características referentes a estes cromossomos:

1. Estes cromossomos ocorrem em frequências variáveis entre diferentes populações, sendo que esta pode-se dar tanto intra quanto interindividualmente;
2. Geralmente demonstram-se menores que os cromossomos do complemento padrão, porém também apresentam grande variabilidade de tamanho;
3. Não são essenciais à vida do organismo;

4. Não se segregam de acordo com as leis Mendelianas, podendo apresentarem-se instáveis durante a divisão celular (mitose ou meiose), sendo que sua manutenção está relacionada a forças de acúmulo e eliminação;
5. São em sua maioria heterocromáticos (total ou parcialmente);
6. Não apresentam homologia como os cromossomos do complemento padrão;
7. Quando em alto número podem ser desfavoráveis, porém há exceções;
8. Podem gerar alterações no metabolismo celular bem como no comportamento dos cromossomos A durante a meiose;
9. Sua origem permanece ainda não esclarecida e bastante discutida.

Os estudos envolvendo cromossomos supranumerários em peixes são bastante recentes (uma vez que dados sobre a ocorrência destes em plantas e outros animais já eram conhecidos), sendo que um dos primeiros foi realizado por Pauls e Bertollo (1983) em *Prochilodus lineatus* (citado como *Prochilodus scrofa*). Os autores observaram uma variação intra e interindividual de 0 a 5 microcromossomos (metacêntricos até onde sua morfologia pode ser identificada), sendo que estes após serem submetidos ao bandeamento C, mostraram-se totalmente heterocromáticos.

Após este trabalho inúmeras descrições da ocorrência de supranumerários vêm sendo realizadas, e atualmente já há dados para algumas famílias de peixes (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere e Galetti Junior, 1985; Fenocchio e Bertollo, 1990; Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Dias e Foresti, 1993, Portella-Castro *et al.*, 1999, Fenocchio e Bertollo, 2000, Maistro *et al.*, 2002, Garcia *et al.*, 2003).

Com relação ao tamanho os cromossomos supranumerários podem apresentar uma grande variação, havendo relatos de microcromossomos (*Prochilodus lineatus*, Pauls e Bertollo, 1983; *Pimelodella kronei*, Almeida-Toledo *et al.*, 1992; *Bergiaria westermanni*, Dias e Foresti, 1993; *Iheringichthys labrosus*, Vissoto *et al.*, 1999b), cromossomos médios

(*Rhamdia hilarii* e *R. quelen*, Fenocchio e Bertollo 1990, Fenocchio *et al.*, 2000) e até cromossomos tidos como grandes (*Astyanax scabripinnis*, Salvador e Moreira-Filho, 1992).

Sua forma também é variável, sendo que já foram encontrados cromossomos Bs de todos os tipos (acrocêntricos, Vissoto *et al.*, 1999b; metacêntricos, Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio e Bertollo, 1990; e submetacêntricos, Cavallaro, 1992), havendo porém, predomínio da forma metacêntrica.

Os cromossomos Bs são geralmente heterocromáticos (Hochberg e Erdtmann, 1988; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Varcacel *et al.*, 1993; Dias e Foresti, 1993, entre outros), sendo menos freqüentes os casos onde estes são parcialmente (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro *et al.*, 2002) ou totalmente eucromáticos (Abucarma e Martins-Santos, 1998). Devido a este fato, uma vez que se assume que a heterocromatina não possui papel de expressão gênica, estes cromossomos, ao longo do processo evolutivo, puderam dar-se ao “luxo de brincar”, modificando assim sua composição gênica, e através de certos processos como deleções, entre outros, sua forma. (Moreira-Filho, inf. pessoal)

Há quatro possíveis mecanismos que explicariam o acúmulo de cromossomos supranumerários e sua variação numérica, tanto intra quanto interespecificamente. Com relação a diferentes populações, estes mecanismos seriam: não-disjunção pós-meiotica, não-disjunção somática, segregação preferencial e replicação endomitótica (Jones, 1975) .

Pouco se sabe sobre a origem dos cromossomos B e sua possível função em animais, porém em algumas plantas, como o alho, sabe-se que os Bs estão relacionados com a germinação, sendo que aqueles indivíduos que possuem estes cromossomos germinam mais rapidamente. Uma possível teoria que poderia explicar esta origem, seria a teoria dos isocromossomos. Originalmente, os cromossomos Bs seriam cromossomos metacêntricos que apresentam dois braços exatamente iguais, tanto no padrão de bandas como no tamanho, e

que possuem seqüências gênicas invertidas. Estes cromossomos ainda poderiam ter sido originados pela fusão cêntrica de dois cromossomos acrocêntricos homólogos, de translocação recíproca entre dois homólogos na altura do centrômero ou da quebra de um centrômero seguida pela fusão das cromátides irmãs, sendo que a forma como estes processos se dão, poderia originar os diferentes tipos de cromossomos Bs.

Foresti (1999) propõem uma hipótese alternativa para a possível origem destes cromossomos. Para o autor, a presença de fragmentos de DNA livres de origem não cromossômica encontrados no núcleo das células seriam a possível base da origem dos supranumerários, caso estes segmentos pudessem ser mantidos durante um determinado tempo e se seqüências estabilizadoras centroméricas e teloméricas fossem incorporadas a estes.

Os casos de presença de cromossomos supranumerários em heptapterídeos e pimelodídeos ainda são pouco freqüentes estando restritos apenas a alguns gêneros (Tabela 2). Nota-se, entretanto, que no gênero *Rhamdia* há uma acentuada ocorrência destes cromossomos.

Tabela 2: Dados da presença de cromossomos supranumerários em representantes das famílias Heptapteridae e Pimelodidae.

Gênero e espécie	Família	Nº de indivíduos estudados	Nº de indivíduos c/ supranumerários	Nº de supranumerários	Tamanho	Referência
<i>Bergiaria westermanni</i>	P	7	7	0-5	pequenos	Dias e Foresti (1993)
<i>Iheringichthys labrosus</i>	P	8	3	0-2	micro	Vissoto <i>et al.</i> (1999b)
	P	11	9	0-3	-	Carvalho e Dias (2002)
<i>Pimelodella kroni</i>	H	5	1	0-1	micro	Almeida-Toledo <i>et al.</i> (1992)
<i>Pimelodus ortomanni</i>	P	4	4	0-4	pequeno	Borin e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodus sp.</i>	P	20	2	0-4	pequeno	Borin e Martins-Santos (2000)
<i>R. branneri</i>	H	-	-	0-4	médio	Abucarma e Martins-Santos (1998)
	H	-	-	0-4		Roman <i>et al.</i> (2002)
<i>R. hilarii</i>	H	51	50	0-5	pequeno	Fenocchio e Bertollo (1990)
		17	3	0-3	pequeno	Vissoto <i>et al.</i> (1999, b)
		29	-	0-3	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
		33	-	0-5	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
		1	-	2	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
		11	-	0-2	médio	Maistro <i>et al.</i> (2002)
<i>R. quelen</i>	H	30	9	0-4	médio	Hochberg e Erdtmann (1985)
		1	-	4	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
		3	-	0-1	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
		7	1	0-4	-	Carvalho e Dias (2001)
		20	-	1-4	médio,	Stivari <i>et al.</i> (2002)
<i>R. sapo</i>	H	12	-	0-1	pequeno	Varacacel <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhandia sp</i>	H	-	-	0-2	micro	Abucarma e Martins-Santos (1998)
	H	13	10	0-4	médio, micro	Garcia <i>et al.</i> , 2003
<i>R. voulezi</i>	H	-	-	0-4	médio	Abucarma e Martins-Santos (1998)

Legenda: H = Heptapteridae, P = Pimelodidae

2.8 Estudos citogenéticos realizados na região de três Marias -MG

Os estudos citogenéticos envolvendo peixes da região de Três Marias tiveram início com Galetti Jr. *et al.*, (1981), os quais analisaram três espécies de peixes pertencentes às famílias Anostomidae e Curimatidae.

Posteriormente, objetivando o primeiro levantamento citogenético em peixes desta localidade, Galetti Jr. *et al.*, (1984b) estudaram 21 espécies pertencentes a 14 gêneros e 7 famílias.

Uma revisão mais recente, presente na Tabela 3, indica que cerca de 40 espécies já foram estudadas do ponto de vista citogenético, sendo identificada a ocorrência de cromossomos supranumerários e sistemas cromossômicos sexuais em alguns gêneros.

Tabela 3: Compilação dos estudos citogenéticos realizados em peixes da região de Três Marias – MG.

ESPÉCIE	FAMÍLIA/SUBFAMÍLIA	2n	FÓRMULA CARIOTÍPICA	NF	MEC. SEXUAL	Bs	REFERÊNCIAS
<i>Apareidon</i> sp1	Parodontidae	54	50M/SM + 4ST	108			Galetti Jr. <i>et al</i> (1984b); Jesus e Moreira Filho (2000)
<i>Apareidon</i> sp 2	Parodontidae	54	50M/SM + 4ST	108			Jesus e Moreira Filho (2000)
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	50	6M + 26SM + 12ST + 6A	94			Paganelli (1990)
<i>Astyanax fasciatus</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	46	6M + 24SM + 8ST + 8A	84		1	Paganelli e Moreira Filho (1986);
		47	7M + 24SM + 8ST + 8A	86		metacêntrico	Justi (1993); Moreira Filho <i>et al.</i> , (2001)
		48	8M + 10SM + 24ST + 6A	90			
		48	10M + 14SM + 14ST + 10A	86		grande	
<i>Astyanax scabripinnis</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	50	6M + 30SM + 8ST + 6A	94			Moreira Filho e Bertollo, (1991)
<i>Astyanax scabripinnis rivularis</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	46	6M + 22SM + 8ST + 10A	82			Moreira Filho e Bertollo, (1991)
<i>Bergiaria westermanni</i>	Pimelodidae	56	42M/SM + 14ST/A	98		0-5	Dias e Foresti (1993)
<i>Brycon lundii</i>	Characidae (Bryconinae)	50	22M + 24SM + 4ST	100			Galetti Jr. <i>et al</i> (1984b); Margarido e Galetti Jr.(1996)
<i>Bryconops affinis</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	48	4M + 6SM + 8ST + 30A	66			Pfister (1997)
<i>Conorhynchus controstris</i>	Pimelodidae	60	20M + 18SM + 10ST + 12A	108			Garcia (2003)
<i>Curimatella lepidura</i>	Curimatidae	54	54M/SM	108			Galetti Jr. <i>et al.</i> (1984b); Venere <i>et al</i> (1989)
<i>Hemigrammus marginatus</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	50	12M + 36SM + 2A	98			Pfister (1997)
<i>Hipostomus</i> sp.	Loricariidae	76	10M + 16SM + 50ST/A	102			Artonni (1996)
<i>Hoplias lacerdae</i>	Erythrinidae	50	50M/SM	100			Galetti Jr. <i>et al</i> (1984b); Morelli (1998)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Erythrinidae	42	28M + 12SM	80			Galetti Jr. <i>et al</i> (1984b); Dergman e Bertollo (1990)
<i>Leporellus vittatus</i>	Anostomidae	54	30M + 24SM	108			Galetti <i>et al</i> (1991b)
<i>Leporinus amblyrhynchus</i>	Anostomidae	54	30M + 24SM	108			Galetti Jr. <i>et al</i> (1984b); Galetti <i>et al</i> (1991a)
<i>Leporinus elongatus</i>	Anostomidae	54	54M/SM 53M/SM + 1ST	108	ZZ/ZW		Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Molina e Galetti (1996)
<i>Leporinus piau</i>	Anostomidae	54	32M + 22SM	108			Galetti Jr. <i>et al</i> (1991a)
<i>Leporinus reinhardt</i>	Anostomidae	54	32M + 22SM 32M + 21M + 1ST	108	ZZ/ZW		Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1981); Galetti Jr. <i>et al.</i> (1984b)
<i>Leporinus taeniatus</i>	Anostomidae	54	32M + 22SM	108			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Galetti Jr. <i>et al</i> (1991a)
<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pseudopimelodidae	54	34M/SM + 20ST/A	98			Mestriner e Galetti Jr. (1986), Heras e Moreira Filho (1996), Garcia (2003)
<i>Moenkhausia costae</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	52	52M/SM	108			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984, b); Portella <i>et al</i> (1988); Pfister (1997)
<i>Orthospinus franciscensis</i>	Characidae (Stethaproninae)	50	10M + 32SM + 8A	92			Pfister <i>et al.</i> , (1997)
<i>Parodon hilarii</i>	Parodontidae	54	31M + 22SM + 1ST 32M + 22SM	108	ZZ/ZW		Galletti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Moreira Filho <i>et al.</i> , (1993); Vicente <i>et al.</i> , (2003)
<i>Pimelodus maculatus</i>	Pimelodidae	56	40M/SM + 16ST/A	96			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Dias e Foresti (1993)
<i>Pimelodus</i> sp.	Pimelodiae	56	40M/SM + 16ST/A	96			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Dias e Foresti (1993)
<i>Prochilodus affinis</i>	Prochilodontidae	54	54M/SM	108			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Pauls e Bertollo (1990)
<i>Prochilodus marggravi</i>	Prochilodontidae	54	54M/SM	108			Pauls e Bertollo (1990)
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	Pimelodidae	56	20M + 12SM + 12ST + 12A	108			Fenocchio (1993)
<i>Pygocentrus piraya</i>	Characidae (Serrasalmininae)	60	48M/SM + 12ST/A	108			Prado e Galetti Jr. (1986)
<i>Rhamdia hilarii</i>	Heptapteridae	58		108		2	Fenocchio <i>et al.</i> , (2000)
<i>Rhamdia quellen</i>	Heptapteridae	58	26M + 16SM + 8ST + 8A	108			Fenocchio <i>et al.</i> , (2003)
<i>Roeboides xenodon</i>	Characidae (Characinae)	52	4M + 26SM + 20ST + 2A	102			Pfister (1997)
<i>Salminus brasiliensis</i>	Characidae (Samininae)	50	32M/SM + 18ST/A	82			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b)
<i>Salminus hilarii</i>	Characidae (Samininae)	50	32M/SM + 18ST/A	82			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Margarido e Galetti Jr (1996)
<i>Schizodon kneri</i>	Anostomidae	54	28M + 26SM	108			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b)
<i>Steindachnerina elegans</i>	Curimatidae	54	54M/SM	108			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Venere e Galetti Jr. (1989)
<i>Tetragonopterus chalcus</i>	Characidae (Tetragonopterinae)	52	26M/SM + 26ST/A	104			Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Portella <i>et al</i> (1988)
<i>Tripopterus guentheri</i>	Characidae (Triportheinae)	52	52M/SM	104	ZZ/ZW		Galetti Jr. <i>et al.</i> , (1984b); Bertollo e Cavallaro (1992); Artoni <i>et al.</i> , (2001); Artoni e Bertollo (2002)

Legenda: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, Bs = cromossomos B, mec sexual = mecanismo sexual, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico.

Materiais e Métodos



3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Local de coleta e espécies analisadas

Os exemplares analisados (Tabela 4) foram coletados no rio São Francisco, Município de Três Marias-MG. Estes foram numerados de acordo com o livro de registros da Instituição e encontram-se depositados em álcool 70%.

Tabela 4: Exemplares analisados no presente trabalho

Ordem	Família	Espécie	Nome popular	Número de exemplares
	Auchenipteridae	<i>Paurachenipterus galeatus</i>	Cangati, vovô	5 machos, 7 fêmeas
		<i>Paurachenipterus leopardinus</i>	Cangati, vovô	1 macho
	Doradidae	<i>Franciscodoras marmoratus</i>	Serrudo	9 machos, 9 fêmeas
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre	7 machos, 2 fêmeas
	Pimelodidae	<i>Pimelodus fur</i>	Mandi-branco	3 machos, 10 fêmeas
		<i>Pimelodus maculatus</i>	Mandi-amarelo	6 machos, 10 fêmeas
		<i>Pimelodus sp.</i>	Mandi-branco	10 machos, 15 fêmeas
	Pseudopimelodidae	<i>Pseudopimelodus zungaru</i>	Peixe sapo	3 fêmeas
Total				96 exemplares

3.2 Procedimentos metodológicos

3.2.1 Preparação de cromossomos mitóticos

A preparação cromossômica utilizada como base para o presente trabalho, deu-se a partir das células do rim (anterior e posterior) dos animais, uma vez que os peixes possuem hemácias nucleadas e este tecido, função hematopoiética, apresentando assim, células em constante divisão. A obtenção da suspensão celular deu-se através da aplicação de duas técnicas:

3.2.1.1 Técnica de preparação direta (Bertollo *et al.*, 1978)

1. Injetar colchicina a 0,025% intraperitonealmente, na proporção de 1ml/100g de peso do animal.
2. Deixar o peixe em um aquário bem aerado por cerca de uma hora. Após este período o animal é então sacrificado. Porções, anterior e posterior, do rim são coletadas com auxílio de pinças.
3. Transferir o material para uma cubeta de vidro contendo cerca de 8 ml de uma solução hipotônica de KCl a 0,075M.
4. Dissociar os tecidos com o auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, através de movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células.

5. Incubar a suspensão em uma estufa a 37 °C por cerca de 30 minutos.
6. Transferir o material, com auxílio de uma pipeta de Pauster, para um tubo de centrífuga e acrescentar cerca de 8 a 10 gotas de fixador (metanol: ácido acético; 3:1) recém preparado.
7. Ressuspender o material com auxílio de uma pipeta de Pauster e centrifugá-lo por 10 minutos a 900 rpm.
8. Retirar o sobrenadante, com auxílio de uma pipeta de Pauster, tomando cuidado para não ressuspender o material. Acrescentar cerca de 12 ml de fixador , ressuspender o material e centrifugá-lo novamente.
9. Repetir o passo anterior mais duas vezes.
10. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação, adicionar cerca de 1-2 ml de fixador e ressuspender o material, transferindo-o para frascos do tipo Eppendorf, os quais são armazenados em freezer a cerca de – 4°C.

3.2.1.2 Preparação cromossômica alternativa (Moreira-Filho e Bertollo, 1990)

1. Sacrificar o animal e coletar porções, anterior e posterior, do rim com auxílio de pinças.
2. Transferir o material para uma cubeta de vidro contendo cerca de 8 ml de uma solução Hank's.
3. Dissociar os tecidos com o auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, através de movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células.
4. Adicionar 3 a 4 gotas de colchicina 0,025%, ressuspendendo, cuidadosamente, a suspensão com auxílio de uma pipeta Pasteur.
5. Incubar a suspensão em uma estufa a 37 °C por cerca de 15 minutos.
6. Transferir o material, com auxílio de uma pipeta de Pauster, para um tubo de centrífuga e acrescentar cerca de 8 a 10 gotas de fixador (metanol: ácido acético; 3:1) recém preparado.
7. Ressuspender o material com auxílio de uma pipeta de Pauster e centrifugá-lo por 10 minutos a 900 rpm.
8. Retirar o sobrenadante, com auxílio de uma pipeta de Pauster, tomando cuidado para não ressuspender o material. Acrescentar cerca de 12 ml de fixador , ressuspender o material e centrifugá-lo novamente.
9. Repetir o passo anterior mais duas vezes.

10. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação, adicionar cerca de 1-2 ml de fixador e ressuspender o material, transferindo-o para frascos do tipo Eppendorf, os quais são armazenados em freezer a cerca de -4°C .

3.2.2 Preparo de lâminas

1. Pingar cerca de 2 a 3 gotas de suspensão, com auxílio de uma pipeta de Pauster, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa.
2. Deixar secar diretamente ao ar.
3. Corar com Giemsa, diluído 5% em tampão fosfato pH 6,8 por cerca de 5 minutos, ou tratar a lâmina segundo as técnicas de impregnação por nitrato de prata, bandamento C, coloração por fluorocromos ou hibridação *in situ* fluorescente.

3.2.3 Técnica para detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Howell e Black, 1980)

1. Colocar sobre uma lâmina previamente preparada, 1 gota de água destilada, 2 gotas de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção 1ml/100ml de solução) e 4 gotas de solução de nitrato de prata 50%.
2. Cobrir a lâmina com uma lamínula limpa.
3. Incubar em estufa a 60°C até que a lâmina adquira uma coloração caramelo.
4. Lavar a lâmina em água destilada, possibilitando que a lamínula seja naturalmente retirada pela própria água.
5. Corar com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 por cerca de 20 a 30 segundos.
6. Lavar em água corrente e secar ao ar.

3.2.4 Bandamento C (Sumner, 1972)

1. Hidrolisar uma lâmina, previamente preparada, em HCl 0.2 N a 42°C por 2 minutos e lavar em água destilada.
2. Colocar a lâmina em uma solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 42°C por cerca de 1 minuto.
3. Lavar rapidamente em HCl 0.2N para retirar o excesso da base e lavar em água destilada
4. Incubar em 2XSSC a 60°C por cerca de uma hora
5. Corar por aproximadamente 10 minutos em Giemsa 5% em tampão fosfato (pH = 6,8)
6. Lavar em água corrente e secar ao ar.

3.2.5 Coloração cromossômica com fluorocromos base-específicos

3.2.5.1 Coloração por cromomicina A₃ (Schmid, 1980)

1. Inicialmente, colocar sobre uma lâmina previamente preparada, cerca de 150 µl de solução de Distamicina 0,3 mg/ml, cobrir com lamínula e deixar agir por cerca de 15 minutos em câmara escura.
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em um jato de água corrente por aproximadamente 1 minuto.
3. Adicionar cerca de 150 µl de solução CMA₃ (0,5g/ml), cobrir novamente o material com lamínula e deixar agir em local protegido da luz por uma hora.
4. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em um jato de água corrente por aproximadamente 1 minuto.
5. Montar a lâmina com uma nova lamínula utilizando meio de solução saturada de sacarose previamente filtrada.
6. Guardar a lâmina em local escuro por cerca de 15 a 30 dias para estabilização da fluorescência.
7. Analisar a lâmina em fotomicroscópio de epifluorescência, Olympus Bx50, com filtro 450-490 (zona de excitação do azul). As melhores metáfases foram “capturadas” com auxílio do software coolSNAP-pro (Media Cybernetic).

3.2.5.2 Coloração por DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Schweizer, 1980)

1. Inicialmente, colocar sobre uma lâmina previamente preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, cerca de 150 µl de solução de Distamicina 0,3 mg/ml, cobrir com lamínula e deixar agir por cerca de 15 minutos em câmara escura.
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em um jato de água corrente por aproximadamente 1 minuto.
3. Colocar a lâmina em uma solução de DAPI (0,3g/ml), por cerca de 15 minutos (de preferência no escuro)
4. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em um jato de água corrente por aproximadamente 1 minuto.
5. Montar a lâmina com uma nova lamínula utilizando meio de solução saturada de sacarose previamente filtrada.
6. Guardar a lâmina em local escuro por cerca de 15 a 30 dias para estabilização da fluorescência.

7. Analisar a lâmina em fotomicroscópio de epifluorescência, Olympus Bx50, com filtro 360-390 (zona de excitação violeta). As melhores metáfases foram “capturadas” com auxílio do software coolSNAP-pro (Media Cybernetic)

3.2.6 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S

A aplicação da técnica deu-se segundo protocolo Pinkel *et al* (1964), com sondas de DNAr 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e DNAr 5S (Martins e Galetti Jr., 1999).

1- Marcação da sonda (Kit Nick Translation Bionik Labeling System – Invitrogen)

- Pipetar os seguintes componentes em um tubo Ependorff de 1,5 ml no gelo:

5 μ l de dNTP Mix 10x

x μ l de DNA (equivalente a 1 μ g)

5 μ l de Enzima mix 10x (DNase + DNA polimerase I)

Água destilada para completar 45 μ l

- Misturar manualmente e centrifugar brevemente (cerca de 5 seg). Incubar a 16°C durante 2 horas.
- Adicionar 1/10 do volume de stop buffer para finalizar a reação.
- Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total) mais etanol 100% (2 volumes) a –20°C por um tempo mínimo de 3 horas (melhor overnight).
- Centrifugar durante 10 minutos, descartar o sobrenadante e lavar o pellet com etanol 70%. Centrifugar novamente por 5 minutos. Descartar o sobrenadante e deixar secar.
- Diluir em água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).

2- Tratamento com RNase

- Lavar as lâminas previamente preparadas em tampão PBS 1x durante 5 minutos. em temperatura ambiente (shaker).
- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 minutos cada.
- Incubar as lâminas em 90 μ l de RNase 10mg/ml em 2xSSC (0,4% RNase/2xSSC) a 37° C por 1 hora em câmara úmida.
- Lavar as lâminas durante 5 min em 2xSSC. Repetir a operação mais duas vezes.
- Lavar as lâminas durante 5 minutos em PBS 1x.

3- Tratamento com Pepsina

- Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37° C.
- Lavagem em PBS 1x durante 5 minutos (shaker) a temperatura ambiente.
- Fixar as lâminas em formaldeído 1% em PBS 1x com 50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker).
- Desidratar as lâminas em série alcoólica (70,85, 100 %) por 5 minutos cada.

4- Pré-hibridação

- Desnaturar o DNA cromossômico com Formamida 70% em 2xSSC a 70° C por 5 minutos.
- Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada. Obs. O álcool 70% deverá estar a -20 C.

5- Hibridação

- Preparar a câmara úmida com Formamida 60% em 2xSSC pH 7,0 (IMPORTANTE)
- Solução de Hibridação:

200 µ l de Formamida 50%

80 µ l de Sulfato de Dextrano 50% (conc. final de 10%)

40 µ l de 20xSSC

8 µ l de DNA de placenta 10mg/ml (1µl/ lâmina)

Sonda + água para completar o volume total de 50µl por lâmina.

- Desnaturar a solução de hibridação a 70°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo.
- Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridação e deixar overnight a 37° C.

6- Lavagens

- Lavar 2 vezes em formamida 50%/2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10min cada (Shaker)
- Lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 min cada (Shaker)
- Lavar durante 5 minutos em Tween 20/20xSSC (0,05%/20xSSC), em temperatura ambiente (Shaker).

7- Detecção

- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC
- Colocar 90 µl de NFDm sobre a lâmina e incubar durante 15 minutos em câmara úmida (com água)
- Lavar duas vezes com Tween 20/20xSSC, 5 minutos cada. Após a primeira lavagem remover a lamínula.
- Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/800 µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
- Lavar 3 vezes em Tween 20/20xSSC, 5 minutos cada, à temperatura ambiente (Shaker)
- Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/800 µl de NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
- Lavar 3 vezes em Tween 20/20xSSC, 5 minutos. cada à temperatura ambiente (Shaker)
- FITC
- Lavagens
- Anti-avidina
- Lavagens
- FITC
- Lavagens
- Lavar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada.

8- Montagem da Lâmina

- Montar a lâmina com 25 µl de solução de iodeto de propídio (50 µg/ ml) e antifade. Guardar no escuro.

9- Análise das lâminas

- Analisar a lâmina em fotomicroscópio de epifluorescência, Olympus Bx50, com filtro 360-490. As melhores metáfases foram “capturadas” com auxílio do software coolSNAP-pro (Media Cybernetic).

3.2.7 Obtenção de cariótipos

Com auxílio de um microscópio óptico, foram analisadas diversas lâminas preparadas com as técnicas descritas nos itens anteriores. As melhores metáfases foram então fotografadas em microscópio Apophot Nikon, em campo claro, utilizando objetiva de imersão e filme Imagelink. Após revelação e ampliação segue-se o seguinte procedimento:

1. Recortar e parear visualmente os cromossomos
2. Ordená-los em ordem decrescente de tamanho, separando-os em: metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos segundo Levan *et al.* (1964).

Resultados e Discussão



*Capítulo I: Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus*

Submetida a revista Neotropical Ichthyology



CYTOGENETICAL ANALYSES IN THREE FISH SPECIES OF THE GENUS *Pimelodus*
(SILURIFORMES, PIMELODIDAE) FROM RIO SÃO FRANCISCO: CONSIDERATIONS
ABOUT THE KARYOTYPICAL EVOLUTION IN THE GENUS

Caroline Garcia and Orlando Moreira Filho

Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, Laboratório de
Citogenética. Rod. Washington Luis, km 235, PO Box 676, ZIP code 13665-905, São Carlos
– SP, Brazil. E-mail: omfilho@power.ufscar.br

Abstract

Karyotypes and other chromosomal markers in three species of the catfish genus *Pimelodus*, namely *P. fur*, *P. maculatus* and *Pimelodus sp.*, from municipality of Três Marias. Minas Gerais – Brazil were investigated using differential staining techniques (C-banding, Ag- and CMA₃ staining). The diploid chromosome number was $2n = 56$ in *P. maculatus* and *Pimelodus sp.*, while in *P. fur* $2n = 54$. The karyotype of *P. fur* consisted in $32M + 8SM + 6ST + 8A$ with fundamental number (NF) of 100, that of *P. maculatus* $32M + 12SM + 12A$ with NF = 112, and that of *Pimelodus sp.* had $32M + 12Sm + 6ST + 6A$ with NF = 106. The nucleolar organizer regions (NORs) in all three species were invariably detected in telomeres of longer arm of the 20th chromosome pair. These sites were also positive after CMA₃ and C-banding. No heteromorphic sex chromosomes were detected and C-Banding pattern was species specific. Inferences about the karyotypic evolution in *Pimelodus* and putative chromosomal rearrangements are discussed.

Resumo

Cariótipos e outros marcadores cromossômicos de três espécies do gênero *Pimelodus* denominadas, *P. fur*, *P. maculatus* e *Pimelodus sp.*, do município de Três Marias. Minas Gerais – Brasil, foram analisados utilizando técnicas de coloração diferenciais (Bandamento C, coloração por Ag- e CMA₃). O número diplóide observado foi $2n = 56$ em *P. maculatus* e *Pimelodus sp.*, enquanto em *P. fur* $2n = 54$. O cariótipo de *P. fur* consistiu em $32M + 8SM + 6ST + 8A$ com número fundamental (FN) igual a 100, o de *P. maculatus* $32M + 12SM + 12A$ com NF = 112, e o de *Pimelodus sp.* possuía $32M + 12Sm + 6ST + 6A$ com NF = 106. As regiões organizadoras nucleolares (RONS) foram detectadas invariavelmente, para as três espécies, na região telomérica do braço longo do 20º par cromossômico, estas se mostraram positivamente coradas pela CMA₃ e heterocromáticas. Nenhuma diferença cromossômica entre os sexos foi detectada e o padrão de bandamento C foi espécie-específico. Inferências sobre a evolução cariotípica dentro do gênero *Pimelodus* e os possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos neste processo são discutidos.

Key-words: karyotype, diploid number reduction, pericentric inversions, C-Band, Chromomycin A₃.

Introduction

The rio São Francisco basin is the fourth most important Brazilian basin, comprising nearly 7,4% of national territory, which includes North, Northeastern and Center-Western regions (Paiva, 1982). According to Britski *et al.* (1988), 133 fish species are described in the rio São Francisco and 57 of them occur at Três Marias, including: *Pimelodus fur* and *Pimelodus sp.*, considered endemic species; and *P. maculatus*, also found in the rio Paraná

basin. These three species belong to the family Pimelodidae and share several morphological similarities, being identified, basically, by their color patterns.

The family Pimelodidae is one of the most important group within Siluriformes, comprising 31 valid genera and 83 valid species (Lundberg and Littmanm, 2003). *Pimelodus*, with 24 species (Lundberg and Littmanm, 2003) is one of most representative and cytogenetically studied genus of Pimelodidae. It is widespread throughout South American rivers, comprising endemic species, such as *P. ortomanni* (rio Iguaçu basin, Southern Brazil), as well as widely distributed ones, like *P. maculatus*.

The genus *Pimelodus* is known by the maintaince of the diploid number in $2n = 56$ associated with great variation in chromosomal composition (Swarça *et al.*, 2000). A case of structural polymorphism was also detected in this genus (Dias e Foresti, 1993).

In the present work, cytogenetic analyses were carried out in three species of *Pimelodus* from rio_São Francisco, in order to provide useful information for both chromosomal characterization of these species and identification of putative chromosomal rearrangements involved in the evolutionary pathways of the group.

Material and Methods

Karyotypical analyses were carried out in specimens of three species of *Pimelodus*: *P. fur* (16 specimens: 10 females + 6 males), *P. maculatus* (13 specimens: 10 females + 3 males), and *Pimelodus sp.* (25 specimens: 15 females + 10 males), from rio_São Francisco, collected at the municipality of Três Marias, Minas Gerais, Brazil. Identification of some specimens as "*Pimelodus sp.*" followed the diagnostic characters presented by Britski *et al.* (1988). Voucher specimens were kept at the fish collection of Museu de Zoologia da

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil under numbers: MZUSP 86908 - *P. fur*, MZUSP 86907 - *P. maculatus* and MZUSP 86909 - *Pimelodus sp.*

Mitotic chromosomes were obtained from kidney cells, by using the direct preparation technique, adapted from Bertollo *et al.* (1978) for fish studies. Chromosomal morphology was determined according to arm ratio as proposed by Levan *et al.* (1964). The fundamental number (NF) was determined considering metacentric (M), submetacentric (SM) and subtelocentric (ST) chromosomes as biarmed, and acrocentric (A) as uniarmed.

Nucleolar organizer regions (NORs) were visualized by silver staining (Ag-NOR), according to Howell & Black (1980). The base-specific fluorochrome staining was performed according to Schmid (1980) using the GC-specific fluorochrome Chromomycin A₃ (CMA₃). The C-banding was performed as described by Sumner (1972).

Results

P. fur presents $2n = 54$, being the karyotype composed by $32M + 8SM + 6ST + 8A$, and $FN = 100$ (Fig. 1a). *P. maculatus* presents $2n = 56$, a karyotype formula of $32M + 12SM + 12ST$ and $FN = 112$ (Fig. 1b). In *Pimelodus sp.*, the cytogenetic analyses also showed $2n = 56$, being the karyotype composed by $32M + 12SM + 6ST + 6A$, and $NF=106$ (Fig. 1c).

Single Ag-NORs located at terminal position on the long arms of 20th chromosome pair was observed in the three species (Fig. 1 boxes). An NOR size heteromorphism between homologous was also observed in *P. fur*.

C-banding pattern was characteristic for each species and the NORs were C-band positive. *P. fur* and *Pimelodus sp.* (Fig. 2a and 2c) showed C-band positive blocks distributed over pericentromeric and terminal regions of most of chromosomes. In *Pimelodus sp.*, C-band positive segments were also observed in both terminal regions of a pair of M chromosomes.

Amongst studied species, *P. maculatus* presented the lowest amount of C-band positive segments, located in pericentromeric position. (Fig. 2b).

CMA₃ staining revealed fluorescent signals coincident to silver nitrate marks in the three species. Moreover, other fluorescent signals coinciding with some C-band positive segments were also observed in *Pimelodus sp.* (Figs. 2d, 2e, and 2f).

Discussion

The present work presents for the first time, a report of diploid number smaller than $2n = 56$ in the genus *Pimelodus*. Such characteristic observed in *P. fur* is likely to be due to the occurrence of chromosome fusions or translocations, and it might be related to the endemic status of this species. On contrary, a diploid number higher than $2n = 56$ was reported for *P. blochii* ($2n = 58$) (Della-Rosa *et al.* 1980).

Oliveira & Gosztanyi (2000) suggested that $2n = 56$ chromosomes could be the ancestral diploid number within Siluriformes. Therefore, the maintenance of this diploid number could be considered a plesiomorphic condition of the genus *Pimelodus*, while modifications such as those detected in *P. fur* ($2n = 54$) and *P. blochii* ($2n = 58$) may represent rare and apomorphic characteristics for these two species.

Despite of the differences related to diploid number, the species analyzed in the present study present similar karyotypical features: all of them have the same number of M chromosomes (32 chromosomes) with similar size and NORs located at terminal position of longer arm of the 20th chromosome pair. This karyotypic resemblance might indicate their closely evolutionary relationship.

Another novelty reported herein is the absence of A chromosomes in the presently analyzed sample of *P. maculatus*. Until the moment, the lowest number of A chromosomes

described in the genus was one pair (*Pimelodus* sp. from Iguaçú river, Souza *et al.*, 2004a), whereas the highest one was six pairs (*P. fur*, *P. maculatus* and *Pimelodus* sp., Toledo & Ferrari, 1976). The most frequent condition in the genus is the presence of three pairs of these chromosomes (Vissoto *et al.*, 1999; Swarça *et al.*, 2001; Borin & Martins-Santos, 2002) and their lacking observed in *P. fur* could be a result of non-Robertsonian rearrangements, such as pericentric inversions.

Pericentric inversions have been considered one of the major chromosomal rearrangements responsible for the karyotypical variability in several fish groups, particularly in those with maintenance of diploid number, such as Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Falcão & Bertollo, 1985), Serrasalminae (Cestari & Galleti Jr., 1992), Parodontidae (Jesus *et al.*, 1999; Jorge & Moreira-Filho, 2000), Trichomycteridae (Borin & Martins-Santos, 1999), Hypoptomatinae (Artoni & Bertollo, 2001), Pomacanthidae (Affonso *et al.*, 2002), Neoplecostominae (Kavalco *et al.*, 2005) among others.

Based on the available data on the family Pimelodidae, and Siluriformes as well, we propose that pericentric inversions appear to be an important, if not the most influential, mechanism of karyotypic diversification in the family, determining the conservation of diploid number and variation of chromosomal morphology.

Dias & Foresti (1993) have also analyzed *P. maculatus* and *Pimelodus* sp. from rio São Francisco. They reported the same karyotypic constitution for both species (40 M/SM + 16 ST/A), besides the occurrence of a structural polymorphism. These results do not agree with the present data, and different degrees of chromosome condensation probably led to such distinct chromosomal classifications.

Ag-NOR analyses indicated that the studied species follow the general pattern observed in the genus, i.e., a predominance of single Ag-NORs at terminal position of longer arm of subtelocentric chromosomes (Dias & Foresti, 1993; Vissoto *et al.*, 1999; Borin &

Martins-Santos, 2002). On the other hand, the occurrence of Ag-NORs at chromosomal short arms seems to be relatively rare (Borin & Martins-Santos, 2002; Souza *et al.*, 2003).

The NORs of the three species analyzed in the present study were heterochromatic, as also reported in another population of *P. maculatus* studied by Swarça *et al.*, (2001a). A size heteromorphism of these regions between homologous was frequently observed in *P. fur* after C-banding, CMA₃ and silver nitrate staining. Such size heteromorphism has been frequently reported in Pimelodidae (Gil *et al.*, 1998; Vissoto *et al.*, 1999; Swarça *et al.*, 1999, Souza *et al.*, 2004a, b). Because of their redundancy, the rDNA regions are likely more susceptible to unequal crossing-overs or chromosomal rearrangements, leading to size differences between NOR-bearing homologous, particularly if these sites are associated to heterochromatic regions (Moreira-Filho *et al.*, 1984).

Coincidences between CMA₃ and Ag-NOR sites are observed in several pimelodid species, such as *Pirinampus pirinampu* (Swarça *et al.*, 1999), *Zungaro zungaro* (Swarça *et al.*, 2001b), *Pimelodus maculatus* (Swarça *et al.*, 2001a; Borin & Martins-Santos, 2002), *P. abscontidus*, *P. ornatus* (Borin & Martins-Santos, 2002), *P. argentus*, and *P. misteriosus* (Souza *et al.*, 2003). In the present work, the same coincidence between CMA₃ and Ag-NOR signals was observed. Besides, other fluorescent signals were detected on GC-rich C-band positive chromatin of *Pimelodus sp.* This feature shows that this species presents a distinctive heterochromatin composition when compared to the other species. A similar situation was reported in *P. maculatus* from rio Paraguay (Souza *et al.*, 2003).

C-banding pattern permitted the differentiation of each species: *P. fur* and *Pimelodus sp.* presented small C-band positive sites on the centromeric and terminal regions of some chromosomes, similarly to the pattern observed in this group (Vissoto *et al.*, 1999; Borin & Martins-Santos, 2002; Souza *et al.*, 2003). On the other hand, *P. maculatus* presented less C-band positive segments, when compared to the other two species.

Nevertheless, a pair of M chromosomes bearing C-band positive segments on both telomeres were only observed in *Pimelodus sp.* Similar C-banding pattern was reported in other species of the genus *Pimelodus* (*Pimelodus sp.* and *P. heraldoi*, Souza *et al.*, 2004a; *P. maculatus*, *P. ornatus* and *P. absconditus* - Borin & Martins-Santos, 2002) and some pimelodids and heptapterids (*Pimelodella sp.*, Vasconcelos & Martins-Santos, 2000; *Rhamdia sp.*, Garcia *et al.*, 2003; *Ieringichthys labrosus*, Carvalho *et al.*, 2004). This situation is being frequently reported in these groups, indicating that the occurrence of this chromosome pair could be a shared condition and a marker trait for both families.

The present study shows, for the first time, two peculiar situations for representatives of the genus *Pimelodus*: the occurrence of a smaller diploid number in *P. fur* and the absence of A chromosomes in *P. maculatus*. These findings might be related to intrinsic features of rio São Francisco basin, which could favor the endemism of fish species in this basin. The present results are of great importance for evolutionary and cytogenetic studies, providing information for a better understanding of the phylogenetic relationships within this genus and the family Pimelodidae as a whole.

Acknowledgements

The authors are grateful to Yoshimi Sato, CODEVASF, for the assistance in the sample collection. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 02/10516-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

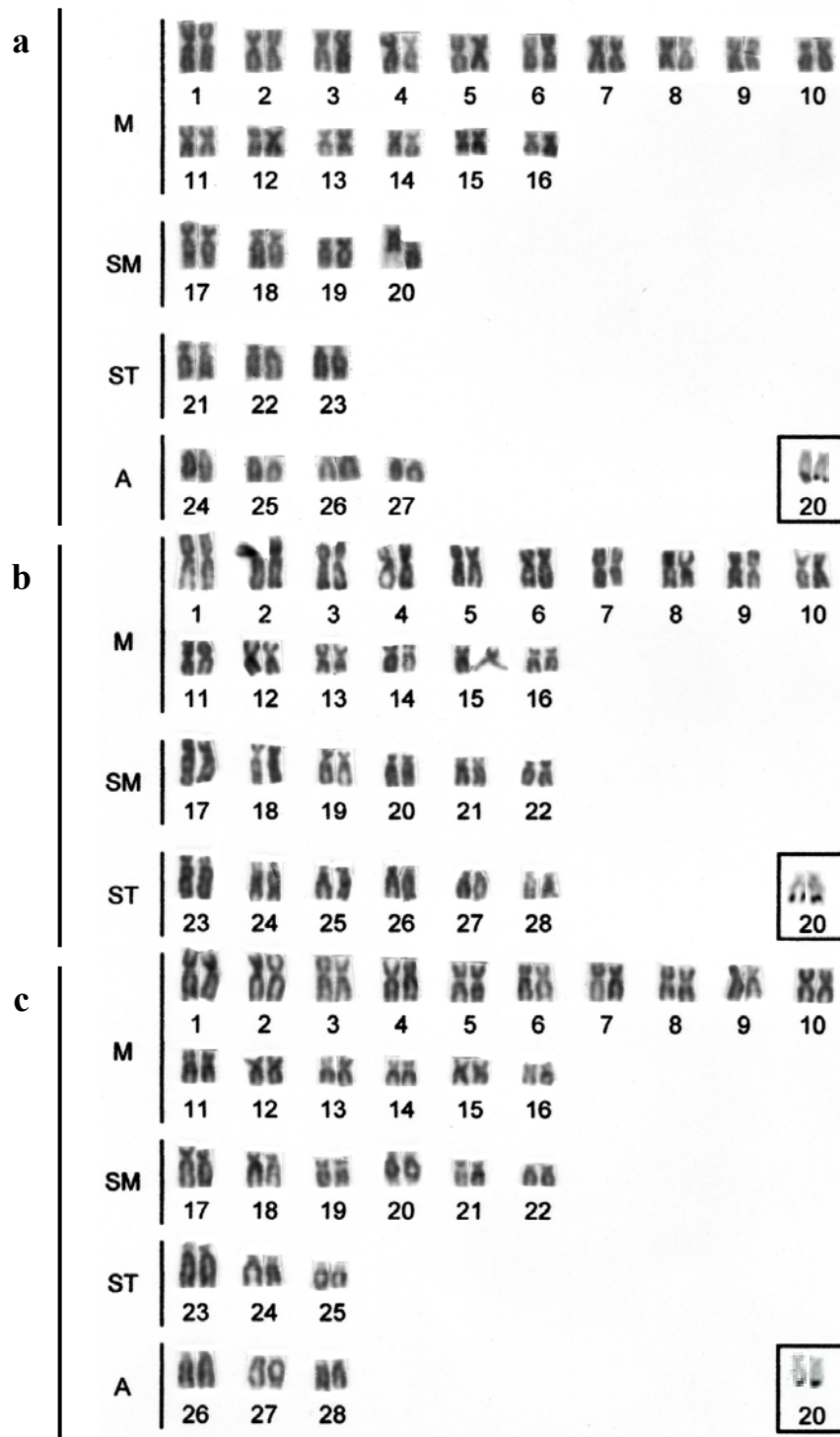


Fig. 4.1: Cariótipos de a) *P. fur*, b) *P. maculatus*, c) *Pimelodus* sp. submetidos a coloração convencional por Giemsa. No detalhe, as regiões organizadoras de nucléolo obtidas através de impregnação por nitrato de prata.

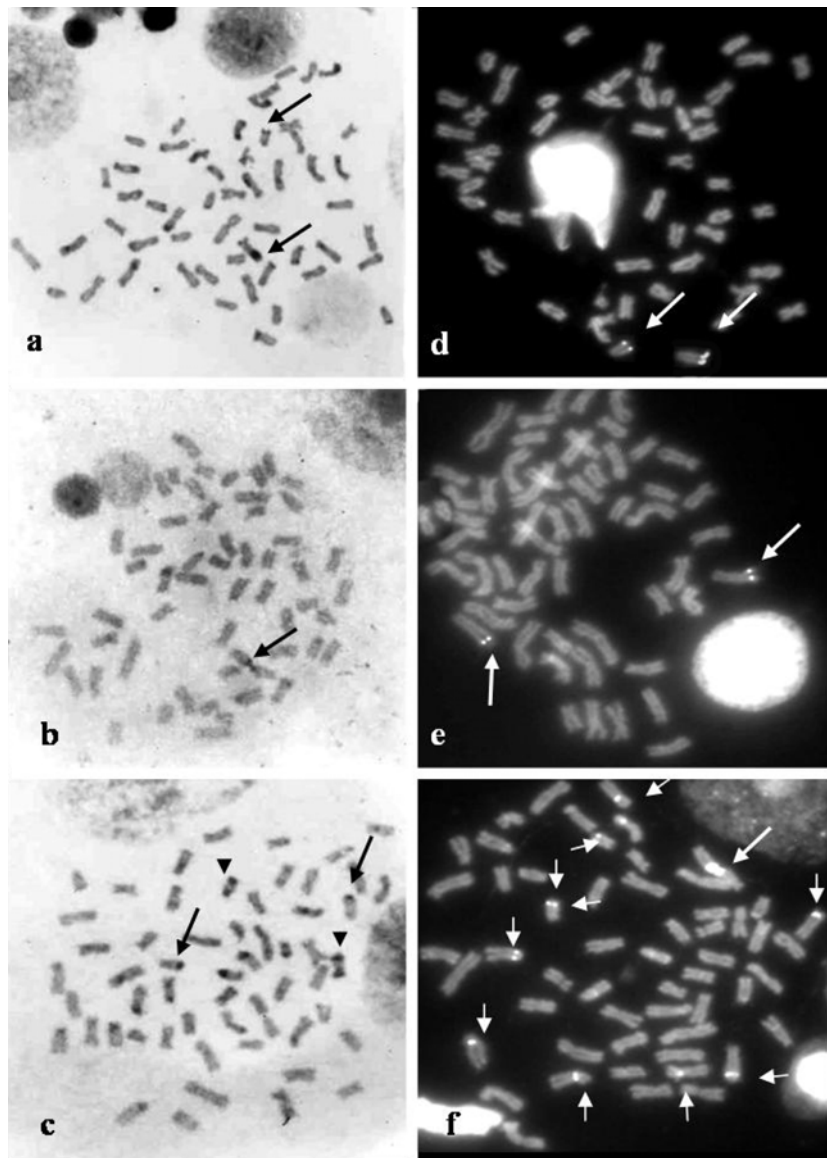


Fig. 4.2: Somatic metaphases of *P. fur* (a, d), *P. maculatus* (b, e) and *Pimelodus sp.* (c, f) submitted to: C banding (a, b, c) and staining with CMA₃ (d, e, f). The major arrows indicate the NOR-bearing pair. NOR association (b, f) and NOR size heteromorphism (a) are evidenced. The arrows indicate positive chromosome regions coinciding with heterochromatin sites after treatment with fluorochrome and the arrowheads indicate a pair of metacentric chromosomes with both telomeres heterochromatic.

*Capítulo II: Localização cromossômica dos sítios de DNAr 5S e 18S em três espécies de *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae)*



Resumo

Pimelodidae é uma das mais representativas famílias de bagres neotropicais, entretanto, estes peixes são ainda pouco estudados citogeneticamente, principalmente no que diz respeito à aplicação de técnicas mais resolutivas como a localização cromossômica de genes ribossomais. No presente trabalho a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S foi aplicada para o mapeamento dos sítios destes genes em *Pimelodus* sp, *P. fur* e *P. maculatus*. Os resultados com sonda 18S confirmaram dados prévios obtidos pela impregnação por nitrato de prata, identificando um sistema de RONS simples para estas espécies. Os dados obtidos com a aplicação da sonda de DNAr 5S evidenciaram uma variação no número e na localização destes sítios, possibilitando inferências sobre a evolução cariotípica do gênero.

Palavras Chave: *Pimelodus*, inversão paracêntrica, DNAr 5S, DNAr 18S.

Introdução

Os peixes constituem um interessante grupo para estudos citogenético/evolutivos, apresentando diversos sistemas de cromossomos sexuais (para revisão ver Moreira-Filho *et al.*, 1993), cromossomos supranumerários (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Portella-Castro *et al.*, 1999, Fenocchio e Bertollo, 2000; Néo *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003), triploidias naturais (para revisão ver Centofante *et al.*, 2001); além de polimorfismos estruturais (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Dias e Foresti, 1993; Vissoto, 2000; Jorge e Moreira-Filho, 2000; Mantovani *et al.*, 2000; Pazza, 2005) e numéricos (Giuliano-Caetano, 1998; Diniz, 2003; Pazza, 2005).

A maioria dos dados disponíveis para esta classe de vertebrados refere-se a estudos da estrutura e evolução cromossômica, enquanto muito pouco é conhecido sobre a organização de seu genoma (Martins e Wasko, 2004).

Em eucariotos superiores, o DNAr encontra-se organizado em duas famílias distintas: a maior, 45S (18S, 28S e 5,8S) e a menor, 5S (Pendas *et al.*, 1994), ambas formadas por múltiplas cópias organizadas em tandem. Ao contrário DNAr 45S, cuja localização também pode ser realizada por outras técnicas, tais como impregnação por nitrato de prata e coloração por fluorocromos GC-específicos, os sítios de DNAr 5S só podem ser localizados através de hibridação *in situ*. (Ferro *et al.*, 2001).

Pouco ainda se sabe sobre a localização cromossômica dos genes ribossomais em peixes neotropicais, principalmente com relação aos genes de RNAr 5S (Martins e Galetti Jr., 1999). Mesmo assim, os poucos dados disponíveis, tem mostrado que estes sítios podem ser um importante marcador citotaxonômico neste grupo.

A família Pimelodidae, uma das maiores famílias de bagres neotropicais (Mees, 1974), é marcada por uma acentuada variabilidade cariotípica, com predomínio de $2n = 56$ cromossomos (Swarça *et al.*, 2000). Entretanto, poucos são os relatos referentes à aplicação de técnicas citogenéticas mais resolutivas em seus representantes, como a hibridação *in situ* fluorescente (Swarça *et al.*, 2001a, b; Garcia, 2003).

O presente trabalho buscou determinar a localização dos genes de DNAr 5S e 18S em três espécies simpátricas do gênero *Pimelodus* encontradas no rio São Francisco, buscando possíveis marcadores quanto à localização e número de clusters de DNAr, bem como confirmar os dados referentes às regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) anteriormente descritos.

Materiais e Métodos

Foram analisados exemplares de três espécies pertencentes ao gênero *Pimelodus*: *Pimelodus* sp. (15 fêmeas, 10 machos), *P. fur* (10 fêmeas, 3 machos) e *P. maculatus* (10 fêmeas, 6 machos), provenientes do rio São Francisco, Município de Três Marias – MG/Brasil. A preparação de cromossomos mitóticos foi obtida a partir de células do rim dos animais, através da técnica de preparação direta adaptada por Bertollo *et al.* (1978) para o estudo em peixes. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) e subtelocêntricos (ST) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (A) como portadores de apenas um braço cromossômico.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) deu-se segundo o protocolo de Pinkel *et al.* (1986) utilizando sondas de rDNA 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de rDNA 5S (Martins e Galetti Jr., 1999).

Resultados

P. fur apresentou $2n = 54$, sendo a fórmula cariotípica dada por $32M + 8SM + 6ST + 8A$, com $NF = 100$. Em *P. maculatus* foi encontrado $2n = 56$, distribuídos em $32M + 12SM + 12ST$, com $NF = 112$. *Pimelodus* sp. também apresentou $2n = 56$, sendo o cariótipo constituído por $32M + 12SM + 6ST + 6A$, com $NF = 106$ (Garcia e Moreira-Filho, 2005a)

A aplicação da sonda de DNAr 18S resultou em um par de sinais fluorescentes localizados na porção terminal do braço longo do 20º par cromossômico para as três espécies analisadas (Fig. 4.3 - boxes). Em *P. fur* pode-se ainda observar um heteromorfismo de tamanho envolvendo as marcações entre os homólogos.

FISH com sonda de DNAr 5S demonstrou uma variação no número e na localização destes sítios ribossômicos entre as três espécies estudadas. *P. fur* apresentou apenas dois sítios, localizados na porção pericentromérica do par cromossômico 17 (Fig. 4.3 – a, boxes). *P. maculatus* apresentou seis sítios de DNAr 5S, distribuídos intersticialmente no par cromossômico 1, em posição pericentromérica no par 21 e posição terminal no braço longo do par 17 (Fig. 4.3 – b, boxes). *Pimelodus* sp. apresentou três pares de cromossomos portadores de cístrons de DNAr 5S, sendo que estes se encontraram localizados em posição intersticial no braço longo do par cromossômico 1, e em posição pericentromérica nos pares 17 e 21 (Fig. 4.3 – c, boxes).

Discussão

Nas três espécies analisadas a aplicação da sonda de DNAr 18S confirmou os dados obtidos previamente com a impregnação por nitrato de prata e coloração por cromomicina A₃ (Garcia e Moreira-Filho, 2005a), indicando a ocorrência de um único par cromossômico portador de RONS para estas. O heteromorfismo de tamanho observado em *P. fur* pelos mesmos autores também foi encontrado no presente trabalho. Este fato, possivelmente, estaria relacionado com um diferente número de cópias destes genes entre os homólogos, resultado de crossing-over desigual ou algum outro tipo de rearranjos cromossômicos (Galetti Jr. *et al.*, 1995, Moreira-Filho *et al.*, 1984; Foresti *et al.*, 1991). Situação semelhante também já foi observada em outros grupos (Galetti Jr. *et al.*, 1984; Affonso, 2000; Wasko e Galetti Jr., 2000; Swarça *et al.*, 2001a; Kavalco *et al.*, 2005).

A maioria das espécies de peixes neotropicais que tiveram a distribuição dos genes de RNAr 5S estudada, apresentam dois pares cromossômicos portadores destes (Martins e Galetti Jr., 1999, 2000, 2001; Vicente *et al.*, 2001, Wasko *et al.*, 2000; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Centofante *et al.*, 2002). Por outro lado, há relatos de espécies com um número elevado

de sítios, como *Astyanax giton* e *A. intermedius* com 10 cromossomos portadores destes clusters (Kavalco *et al.*, 2004); e *Centropyge aurantonotus*, com 18 (Affonso, 2000).

Pimelodus sp. e *P. maculatus* são cariotipicamente semelhantes em relação ao número diplóide, número e posicionamento das RONS, bem como o número de sítios de DNAr 5S. Apesar disto, algumas diferenças foram observadas, como a localização dos genes de RNAr 5S no par cromossômico 17. Ainda com relação aos genes de rDNA 5S, foi encontrada uma distribuição intersticial ou pericentromérica, com exceção dos genes localizados no 17º par de *P. maculatus*. A diferença de localização destes genes no 17º par cromossômico encontrada nas as espécies analisadas, indica que uma provável inversão paracêntrica ocorreu em *P. maculatus*, resultando no transporte destes genes de uma posição pericentromérica para uma posição terminal, constituindo uma condição derivada em relação a *Pimelodus* sp. e *P. fur*. Diferenças na localização deste mesmo gene em *Upsilonodus* e *Astyanax* também foram atribuídas a inversões paracêntricas e pericêntricas, respectivamente (Kavalco *et al.*, 2004).

Em *P. fur* foi observada uma redução no número diplóide bem como uma redução no número de sítios de DNAr 5S (apenas um par). A ausência de marcações no 21º par, poderia ser resultado de deleções ou possíveis perdas cromossômicas que resultaram na redução do número diplóide observada para esta espécie.

Segundo Martins e Galetti Jr. (1999), a localização dos sítios de DNAr 5S em posição intersticial estaria relacionada com um maior grau de proteção destas seqüências, evitando eventos de transposição e crossing, mais freqüentes em áreas mais terminais. Este fato poderia estar relacionado com o alto grau de conservação destas seqüências em relação aos genes de RNAr 45S, os quais geralmente localizam-se nas regiões subteloméricas. A localização não sintênica com os genes de RNAr 45S observada no presente trabalho é a condição mais freqüentemente descrita, sendo que Martinez *et al* (1996) sugerem que esta seja uma característica ancestral em termos de organização gênica e evolução cromossômica. Em

peixes, a presença destas duas famílias gênicas em um mesmo cromossomo já foi relatada em *Salmo* (Pendas *et al.*, 1994), *Orcorhynchus* (Moran *et al.*, 1996), *Parodon* (Vicente *et al.*, 2001) e *Harttia* (Kavalco *et al.*, 2004).

Dentre os Siluriformes, são poucos os dados disponíveis sobre a localização dos genes 5S, sendo estes inéditos para a família Pimelodidae. Os poucos estudos realizados envolvem membros das famílias Loricariidae (Kavalco *et al.*, 2004) e Heptapteridae (Garcia *et al.*, 2003), e demonstram o predomínio de apenas um par cromossômico portador de sítios ribossomais, localizados em posição intersticial. Em *Hypostomus* e *Upsilonodus*, um maior número de sítios foi identificado, oito e quatro respectivamente (Kavalco *et al.*, 2004). A falta de dados dentro da família Pimelodidae não nos permite discutir se a presença de seis sítios no gênero *Pimelodus* seria uma característica plesiomórfica ou apomórfica.

O gênero *Pimelodus* é marcado por acentuada variabilidade na constituição cromossômica, com manutenção do número diplóide. A presença de seis sítios de DNAr 5S e a coincidência de localização nos mesmos pares cromossômicos, demonstram a conservação do número e posição dos genes de rDNA 5S dentro deste gênero, fato que poderá vir a ser confirmado com o aumento nos estudos envolvendo estes peixes. Situação semelhante foi encontrada por Mantovanni (2001) em *A. scabripinnis*. Apesar da grande variabilidade cromossômica já descrita para esta espécie, os sítios cromossômicos de DNAr 5S mantiveram-se conservados em diferentes populações.

Os resultados aqui reunidos apresentam, pela primeira vez estudos de localização dos genes de RNAr 5S em *Pimelodus*. Estes dados, associados a outros dados citogenéticos previamente descritos reforçam a proposta de Garcia e Moreira Filho (2005a) de uma origem evolutiva comum para estas três espécies encontradas no rio São Francisco, sendo que diferentes rearranjos tiveram importante papel durante o processo de especiação, dentre eles as inversões cromossômicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Yoshimi Sato, CODEVASF, pelo auxílio nas coletas dos exemplares estudados. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 02/10516-0) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 473313/03-0).

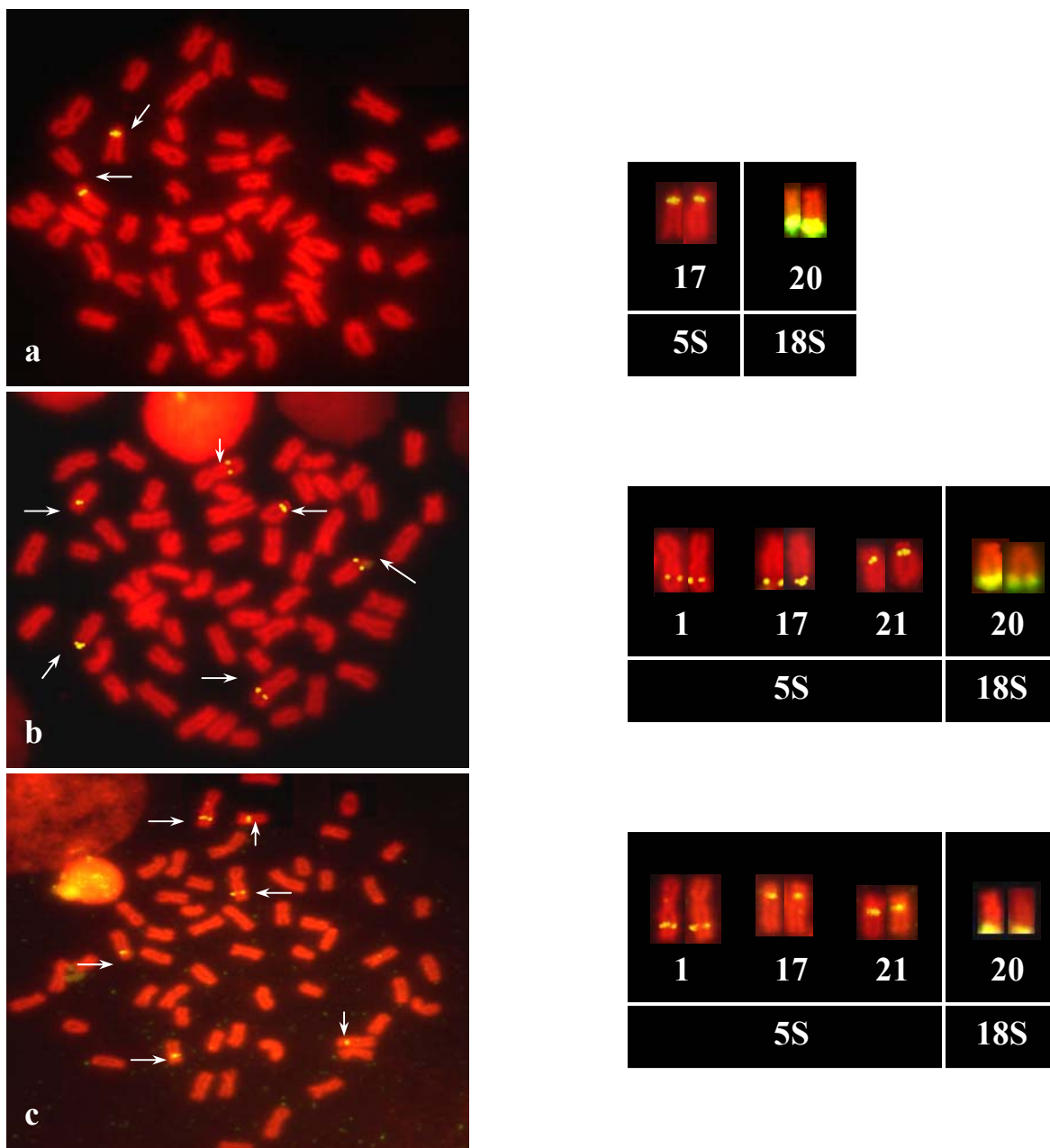


Fig. 4.3: Metáfases somáticas submetidas à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 5S. As setas indicam os sítios em: **a** *P. fur*, **b** *P. maculatus*, **c** *Pimelodus* sp. No detalhe os cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S e o par nucleolar evidenciado pela sonda de DNAr 18S.

Capítulo III: Caracterização citogenética de cinco espécies de
Siluriformes da bacia do rio São Francisco



Resumo

Os Siluriformes compreendem um dos maiores grupos de peixes, entretanto algumas de suas famílias, como Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae são ainda muito pouco conhecidas citogeneticamente. No presente trabalho foram estudadas as seguintes espécies pertencentes a estas famílias: *Parauchenipterus galeatus*, *P. leopardinus*, *Franciscodoras marmoratus*, *Rhamdia quelen* e *Pseudopimelodus zungaro*. Todas as espécies apresentaram $2n = 58$ cromossomos, com exceção de *P. zungaro* com $2n = 54$. As RONS foram simples para todas as espécies, sendo evidenciadas através da impregnação por nitrato de prata, CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S. A aplicação da sonda de DNAr 5s mostrou predomínio de apenas dois sítios portadores destes genes para estes grupos, com exceção de *F. marmoratus* com quatro sítios. Os dados apresentados são discutidos considerando as particularidades e tendências evolutivas de cada grupo.

Palavras chave: Siluriformes, Cariótipo, Fluorocromos, DNAr 5S, DNAr18S.

Introdução

Os Siluriformes compreendem um dos maiores grupos de peixes, formado por cerca de 34 famílias e mais de 2400 espécies (Nelson, 1994). Dentre as diferentes famílias que formam esta ordem, algumas podem ser destacadas por possuírem características bastante interessantes. Embora dotadas de peculiaridades, em termos citogenéticos, estas famílias são pouquíssimo estudadas, sendo que a uma boa parte dos dados disponíveis refere-se a algumas espécies de heptapterídeos.

Auchenipteridae, cujos representantes apresentam distribuição restrita à região Neotropical, são, provavelmente, os únicos silurídeos com fertilização interna (Pinna, 1998).

Algumas espécies apresentam, ainda, a nadadeira anal transformada em um gonopódio utilizado para cópula. (Britski *et al.*, 1988).

Doradidae, por sua vez, é formada por peixes caracterizados pela presença de uma série de placas ósseas ao longo da linha lateral, cobrindo-a total ou parcialmente. Cada uma destas placas é provida de um processo espiniforme voltado para trás (Britski *et al.*, 1988), em alguns casos estas se encontram restritas à base da nadadeira caudal ou à região logo após a cabeça. Na a família Doradidae observa-se a manutenção do número diplóide de $2n = 58$ para a maioria as espécies analisadas (Jorge *et al.*, 1992; Fenocchio *et al.*, 1993).

Pseudopimelodidae é a menor e mais nova família incluída na ordem Siluriformes, possuindo apenas seis gêneros (Shibatta, 2003). As poucas espécies de pseudopimelodídeos cariotipadas até o momento apresentaram $2n = 54$ (Vissoto *et al.*, 1999a; Garcia, 2003).

Heptapteridae inclui peixes de pequeno e médio porte, representando uma das maiores radiações de bagres neotropicais (Pinna, 1998). Os representantes destas duas últimas famílias, anteriormente pertenciam à conhecida família Pimelodidae, a qual foi subdividida por Pinna (1993). Em Heptapteridae o número diplóide varia entre 46 (*Pimelodella*, Dias e Foresti, 1993; Vasconcelos e Martins-Santos, 2000) e 62 cromossomos (*Rhamdia hilarii*, Toledo e Ferrari, 1976), com predomínio de $2n = 58$. Neste grupo já foi relatada a ocorrência de cromossomos supranumerários, polimorfismos estruturais e cromossomos sexuais (Dias e Foresti, 1993; Vissoto *et al.*, 1999b; Vissoto, 2000; Fenocchio *et al.*, 2000; Maistro *et al.*, 2002).

No presente trabalho foram realizados estudos citogenéticos em cinco espécies de peixes pertencentes às famílias Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae. Muitos dos dados apresentados são inéditos e contribuem com novas informações para os estudos citogenéticos e evolutivos deste grupo.

Materiais e Métodos

Análises cariotípicas foram realizadas em exemplares de: *Parauchenipterus leopardinus* (1 machos), *P. galeatus* (7 fêmeas, 5 machos), *Pseudopimelodus zungaru* (3 fêmeas), *Franciscodoras marmoratus* (9 fêmeas, 9 machos) e *Rhamdia quelen* (2 fêmeas, 7 machos), provenientes do rio São Francisco, no Município de Três Marias – MG/Brasil. As espécies *Franciscodoras marmoratus* e *Pseudopimelodus zungaro* são endêmicas da Bacia do rio São Francisco.

A preparação de cromossomos mitóticos foi obtida a partir de células do rim, através da técnica de preparação direta adaptada por Bertollo *et al.* (1978) para o estudo em peixes. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) e subtlocêntricos (ST) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (A) como portadores de apenas um braço cromossômico.

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) utilizou-se técnica descrita por Howell e Black (1980) e para o evidenciamento dos blocos de heterocromatina constitutiva aplicou-se a técnica descrita por Sumner (1972).

O procedimento de coloração cromossômica utilizando cromomicina A₃ (CMA₃) deu-se segundo Schmid (1980), e DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenilindole) de acordo com Schweizer (1980). A hibridação *in situ* fluorescente seguiu o protocolo de Pinkel *et al.*, (1986) com sondas de DNAr 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e DNAr 5S (Martins e Galetti Jr., 1999).

Resultados

Os estudos citogenéticos demonstraram que *Parauchenipterus leopardinus* possui $2n = 58$ com fórmula cariotípica dada por $24M + 24SM + 4ST + 6A$ e $NF = 110$ (Fig. 4.4 – a). *P. galeatus* também apresentou $2n = 58$ cromossomos distribuídos em $24M + 20SM + 6ST + 8A$ e $NF = 108$ (Fig. 4.4 – b). *Pseudopimelodus zungaro*, por sua vez, apresenta $2n = 54$, com $30M + 14SM + 10ST$ e $NF = 108$ (Fig. 4.4 – c). *Franciscodoras marmoratus* possui $2n = 58$, com a seguinte fórmula cariotípica: $28M + 10SM + 8ST + 12A$ e $NF = 104$ (Fig. 4.4 – d). *Rhamdia quelen* também apresentou $2n = 58$ distribuídos em $40M + 6SM + 8ST + 4A$ com $NF = 112$. Para esta espécie foi também observada uma variação numérica relacionada à presença de até quatro cromossomos supranumerários, sendo dois do tipo metacêntrico pequenos e dois microcromossomos do tipo acrocêntrico (Fig. 4.4 – e)

Todas as cinco espécies apresentaram Ag-RONs simples localizadas nos braços curtos de cromossomos dos tipos submeta/subtelocêntricos (par 20 em *P. galeatus* e *P. leopardinus*, par 24 em *P. zungaro*, par 23 em *F. marmoratus* e par 22 em *R. quelen*). Para *F. marmoratus* e *P. zungaro* foi observado um heteromorfismo de tamanho das marcações entre os homólogos (Fig. 4.4 – boxes).

Com relação ao padrão de bandamento C, as espécies estudadas apresentaram de modo geral, blocos heterocromáticos distribuídos preferencialmente em regiões centroméricas e teloméricas. Com a exceção de *P. zungaro*, as demais espécies possuem alguns pares de cromossomos metacêntricos com ambos os telômeros banda C positivos (Fig. 4.5 – a-d). Os cromossomos supranumerários de *R. quelen* mostraram-se, no caso dos cromossomos acrocêntricos, totalmente heterocromáticos, já os do tipo metacêntrico apresentaram ambas regiões subteloméricas portadores de blocos C^+ . (Fig. 4.5 – e)

A coloração por CMA_3 evidenciou um par de blocos fluorescentes coincidentes com as marcações obtidas através da impregnação por nitrato de prata nas cinco espécies

estudadas. Em *P. zungaro* foram ainda observados outros sinais adicionais, correspondentes a regiões heterocromáticas. (Fig 4.6 – a-e). Já a coloração por DAPI mostrou-se homogênea para todo o complemento cromossômico de *F. marmoratus* e *R. quelen*, demonstrando a ausência de sítios AT-ricos. *Parauchenipterus galeatus*, *P. leopardinus* e *Pseudopimelodus zungaro* apresentaram um par de cromossomos portadores de blocos DAPI-positivos, coincidentes com regiões de heterocromatina constitutiva (Fig 4.7 – f-h)

A hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S evidenciou, em todas as espécies analisadas, apenas um par cromossômico portador de sinais fluorescentes, confirmando os resultados obtidos pela impregnação pelo nitrato de prata e coloração por CMA₃ (Fig. 4.4 – boxes).

Com relação à localização do gene de rDNA 5S, foram observadas duas situações distintas: (1) presença de 2 sítios em um par de homólogos, observada nas espécies *P. leopardinus* (Fig. 4.7 – a) e *P. galeatus* (Fig. 4.7 – b) (ambas em posição pericentromérica de um M grande), *P. zungaro* (Fig. 4.7 – c) (posição pericentromérica em um SM grande) e *R. quelen* (Fig. 4.7 – e) (posição intersticial de um par SM grande); e (2) presença de 4 sítios em dois pares de homólogos em *F. marmoratus* (Fig. 4.7 – d) (em posição pericentromérica em um par ST grande e um par SM médio).

Discussão

Poucos são os dados citogenéticos disponíveis para as famílias Auchenipteridae, Doradidae e Pseudopimelodidae, o que dificulta a comparação dos dados obtidos no presente trabalho.

As espécies analisadas de *Parauchenipterus* possuem cariótipo composto por $2n = 58$ cromossomos. Embora o número diplóide mostre-se semelhante para as espécies aqui estudadas, as constituições cariotípicas são diferentes, bem como seus NF, indicando que

possivelmente rearranjos cromossômicos como inversões e translocações estariam envolvidos na evolução cariotípica dentro do gênero. Entretanto, apesar das diferenças na constituição do cariótipo dentro deste gênero, nota-se um certo grau de conservadorismo no que diz respeito as RONS.

Os dados cromossômicos dos pseudopimelodídeos demonstram, até o presente momento, uma manutenção do número diplóide, com pequenas diferenças com relação aos tipos cromossômicos presentes na constituição cariotípica das diversas espécies. Por exemplo, *Microglanis* apresenta apenas cromossomos dos tipos meta/submetacêntricos (Vissoto *et al.*, 1999a) e *Lophiosilurus* possui cromossomos do tipo acrocêntrico (Garcia, 2003), ausentes em *Pseudopimelodus*, indicando uma acentuada variabilidade cariotípica para a família.

Dentro de Doradidae observa-se a manutenção do número diplóide de $2n = 58$ cromossomos nas diferentes espécies estudadas, sendo o cariótipo constituído, principalmente, por elementos de dois braços. De todas as espécies de doradídeos, apenas *Trachydoras* apresentou $2n = 56$, uma situação única dentro do grupo (Fenocchio *et al.*, 1993).

Já no que se refere a Heptapteridae, há uma maior variabilidade, não só quanto ao número diplóide, como também às fórmulas cariotípicas e NFs (Tabela 1). Particularmente quanto ao gênero *Rhamdia* os dados disponíveis no presente fortalecem a idéia do gênero apresentar um número diplóide padrão $2n = 58$, sendo que este freqüentemente mostra-se associado à presença de cromossomos supranumerários (Garcia *et al.*, 2003).

Os Siluriformes geralmente apresentam RONS simples, localizadas em diferentes cromossomos (Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Dias e Foresti, 1993; Borin e Martins-Santos, 2000; Oliveira e Gosztanyi, 2000; Artoni e Bertollo, 2001; entre outros). Dentro de diversas famílias, como Pimelodidae e as demais abordadas no presente estudo, observa-se que estas regiões distribuem-se preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos, sendo que

marcações intersticiais (Fenocchio *et al.*, 2003) são mais raras. Oliveira e Gosztonyi (2000) argumentam que RONS simples localizadas em posição terminal deva representar o estado ancestral para este caráter em Siluriformes. Heteromorfismos nos tamanhos das RONS em peixes têm sido freqüentemente relatada. (Foresti *et al.*, 1981; Galetti Jr. *et al.*, 1984; Moreira Filho *et al.*, 1984; Garcia, 2003; Kavalco *et al.*, 2005). Muitos autores sugerem os mecanismos de crossing-over e adições e deleções como os principais responsáveis por esta diferença de tamanho entre homólogos (Wasko e Galetti Jr, 2000; Swarça *et al.*, 2002; entre outros).

Segundo Pendás *et al.*, (1993), a coincidência de localização entre as marcações obtidas pela aplicação de fluorocromos GC-específicos e as Ag-RONS seria possível devido ao fato da provável ocorrência de altos conteúdos de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre seqüências de DNAs repetitivos adjacentes. Desta forma, esta técnica permitiria a identificação das RONS independentemente de sua atividade durante o ciclo celular anterior. Entretanto, vale ressaltar que em alguns estudos as RONS não se mostraram positivamente coradas por CMA₃ ou MM (Morelli, 1998; Fontana *et al.*, 1998; Kavalco, *et al.*, 2004).

Em todas as espécies estudadas no presente trabalho observou-se coincidência de localização nas marcações obtidas pelo nitrato de prata e CMA₃. Esta característica das RONS já foi relatada para outros Siluriformes (Artoni *et al.*, 1999; Swarça *et al.*, 2001a, b; Maistro *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2003). A presença de sinais fluorescentes adicionais e coincidentes com regiões heterocromáticas em *Pseudopimelodus zungaro*, demonstra que estes blocos encontram-se diferenciados do restante da heterocromatina, mostrando-se ricos em bases GC. Grande quantidade de heterocromatina não relacionada as RONS foi também observada no loricariídeo *Upsilonodus* sp., tendo sido levantada a possibilidade de dispersão desta heterocromatina pelo cariótipo (Kavalco *et al.*, 2004). Nas cinco espécies estudadas a

hibridação utilizando sonda de DNAr 18S confirmou os dados obtidos com a impregnação por nitrato de prata e coloração por cromomicina A₃, caracterizando-as como portadoras de um sistema de RONS simples, o padrão para os Siluriformes de modo geral.

Fluorocromos AT-específicos produzem poucas ou nenhuma banda positiva em peixes. Geralmente a coloração por estes corantes resulta em bandas negativas coincidentes com aquelas CMA₃ positivas ou em uma coloração homogênea do complemento, sendo freqüentemente sugerido que este fato estaria relacionado a características da organização genômica deste grupo de vertebrados (Souza *et al.*, 1996) Há, porém casos onde a aplicação destes fluorocromos resultou em sinais positivos adjacentes a porções GC ricas (Mayr *et al.*, 1988, Artoni *et al.*, 1999).

No presente estudo apenas *Parauchenipterus galeatus*, *P. leopardinus* e *Pseudopimelodus zungaro* mostraram um par de sinais DAPI positivos, coincidentes com regiões heterocromáticas. *P. zungaro*, a aplicação de diferentes fluorocromos demonstrou a existência de três tipos composicionais de heterocromatina: a GC-rica, AT-rica e aquela homogeneamente corada por ambos os fluorocromos. Situação semelhante já foi descrita para os gêneros *Astyanax* (Souza *et al.*, 1996) e *Hypostomus* (Artoni *et al.*, 1999).

O bandamento C demonstrou a existência de pouca quantidade de heterocromatina, distribuída em regiões centroméricas e/ou teloméricas nos cromossomos.

Os cromossomos supranumerários encontrados no gênero *Rhamdia* possuem diferentes graus de heterocromatinização: (1) totalmente eucromáticos (Abucarma e Martin-Santos, 1998), (2) com ambos os telômeros banda C positivos e o restante do cromossomo eucromático (Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000 e Maistro *et al.*, 2002.), (3) ou totalmente heterocromáticos (Vissoto *et al.*, 1999b; Garcia *et al.*, 2003.). No presente estudo foram observados os tipos 2 e 3 em cromossomos acessórios do tipo M e A, respectivamente. Pela primeira vez, observa-se no gênero *Rhamdia* a

ocorrência concomitante de dois tipos diferentes de supranumerários. Fenocchio *et al.* (2000) propõem que os cromossomos B presentes em *Rhamdia* teriam uma origem comum, por sua presença em diferentes populações. O isolamento geográfico destas populações permitiria o surgimento e manutenção das diferenças na morfologia, número e padrão de bandamento C nestes elementos cromossômicos.

O padrão de bandas C observado em alguns supranumerários de *Rhamdia*, onde ambos os telômeros de alguns pares cromossômicos mostram-se heterocromáticos, também é evidenciado nos cromossomos do complemento de outras espécies das famílias Pimelodidae e Heptapteridae (Souza e Dias, 2001; Carvalho e Dias, 2002; Garcia *et al.*, 2003), podendo indicar um compartilhamento ancestral entre estes dois grupos, e uma possível origem dos cromossomos B a partir de cromossomos do complemento. A ocorrência destes cromossomos em representantes das famílias Auchenipteridae e Doradidae, podem indicar que estas possuem um grau de proximidade maior com Pimelodidae e Heptapteridae do que com outras famílias de Siluriformes.

Dados referentes à aplicação de FISH ainda são escassos entre os peixes Neotropicais. Porém, os poucos dados disponíveis com relação ao uso da sonda de DNAr 5S demonstram, até o momento, o predomínio da ocorrência de apenas um par cromossômico portador deste gene ribossômico nos Siluriformes (Garcia 2003; Kavalco *et al.*, 2004) No presente trabalho foram abordadas 4 famílias diferentes, para muitas das quais não há dados sobre a utilização desta técnica. Entretanto, com a exceção de *F. marmoratus*, as demais espécies estudadas no presente trabalho apresentaram apenas um par cromossômico portador de genes de RNAr 5S. Todos os sítios localizaram-se em posição pericentromérica ou intersticial, o que segundo Martins e Galetti Jr. (1999) estaria relacionado com um maior grau de proteção destas seqüências, evitando eventos de transposição e crossing-over, resultando no alto grau de conservação destas seqüências. Em *R. quelen* observou-se ainda uma coincidência no número

e na localização destes genes com relação à *Rhamdia* sp. (Garcia *et al.*, 2003), apesar da diferença no que diz respeito à constituição cariotípica. Situação semelhante foi encontrada em *A. scabripinnis* por Mantovanni (2001) e *Pimelodus* (Garcia e Moreira Filho, 2005b), onde apesar da grande variabilidade cromossômica, os sítios cromossômicos de DNAr 5S mantiveram-se conservados em diferentes populações. Entretanto, estas regiões não estão livres de rearranjos cromossômicos, como observado em *Upsilonodus* sp., onde uma inversão paracêntrica pode ter resultado nos dois sítios sintênicos de rDNA 5S existentes (Kavalco *et al.*, 2004).

Os dados aqui apresentados são em sua maioria inéditos para os Siluriformes, reforçando a necessidade de expansão dos estudos citogenéticos dentro desta ordem de peixes. Estes dados também corroboram as propostas dos sistematas na recente divisão da família Pimelodidae em Heptapteridae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae, uma vez que os dados citogenéticos demonstram, não só apenas com base no número diplóide, que estas compõem grupos geneticamente distintos, possuindo, entretanto, características compartilhadas com os demais Siluriformes.

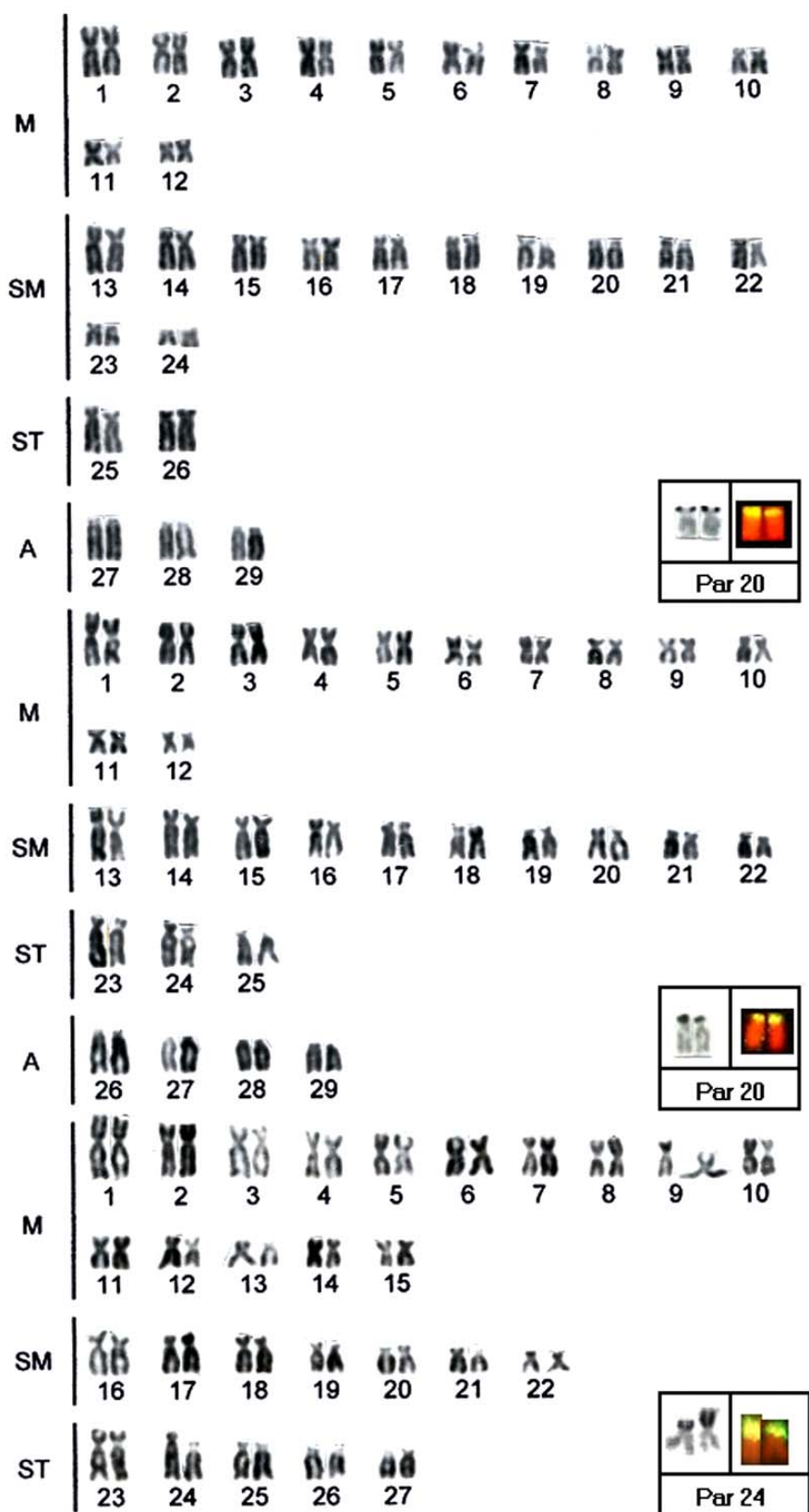
Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Yoshimi Sato, CODEVASF, pelo auxílio nas coletas. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 02/10516-0) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 473313/03-0).

Tabela 5: Resultados obtidos no presente trabalho

Família	Espécie	2N	Fórmula cariotípica	NF	RONs
Auchenipteridae	<i>Paurachenipterus galeatus</i>	58	24M + 20SM + 6ST + 8A	108	Par 20
	<i>Paurachenipterus leopardinus</i>	58	24M + 24SM + 4ST + 6A	110	Par 20
Doradidae	<i>Franciscodoras marmoratus</i>	58	28M + 10SM + 8ST + 12A	104	Par 23
Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i>	58	40M + 6SM + 8ST + 4A	112	Par 22
Pseudopimelodidae	<i>Pseudopimelodus zungaru</i>	54	30M + 14SM + 10A	108	Par 24

Legenda: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico, RONs = regiões organizadoras de nucléolo.



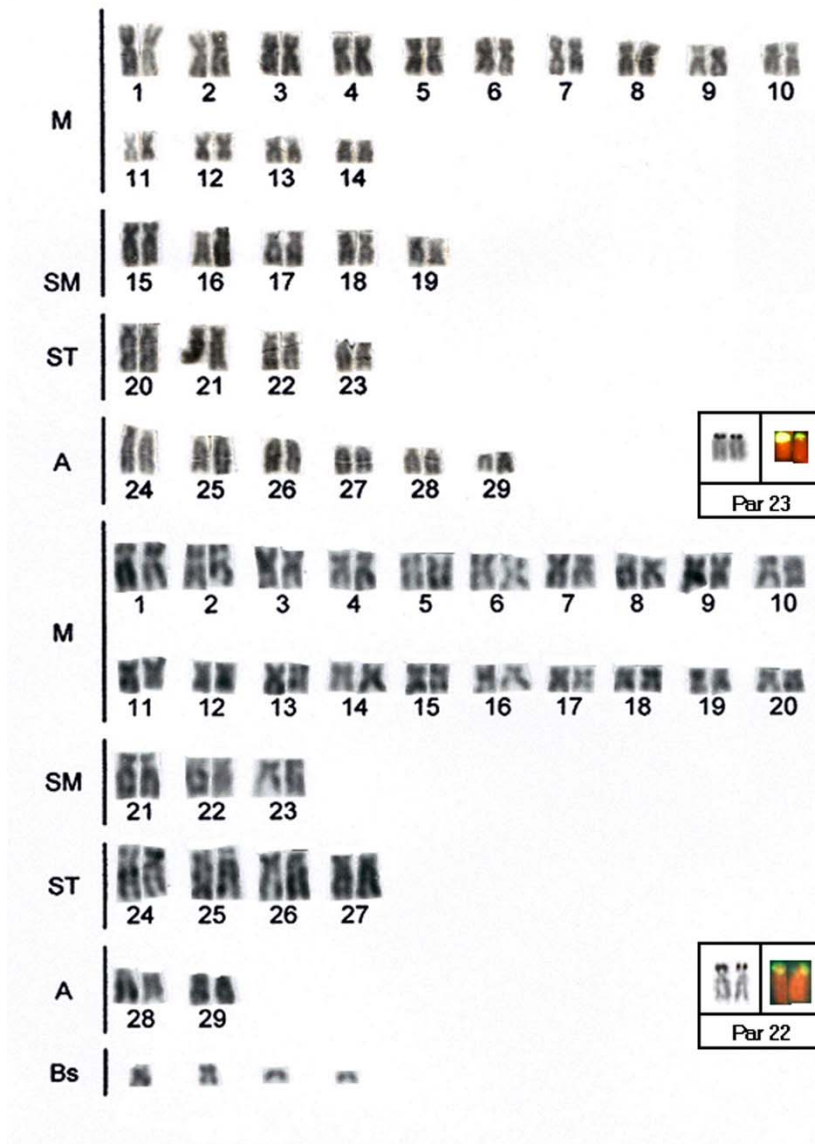


Fig. 4.4: Cariótipos de **a** *Parauchenipterus leopardinus*, **b** *P. galeatus*, **c** *Pseudopimelodus zungaro*, **d** *Franciscodoras marmoratus*, **e** *Rhamdia quelen*. submetidos a coloração convencional por Giemsa. No detalhe, as regiões organizadoras de nucléolo obtidas através de impregnação por nitrato de prata e hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 18S.

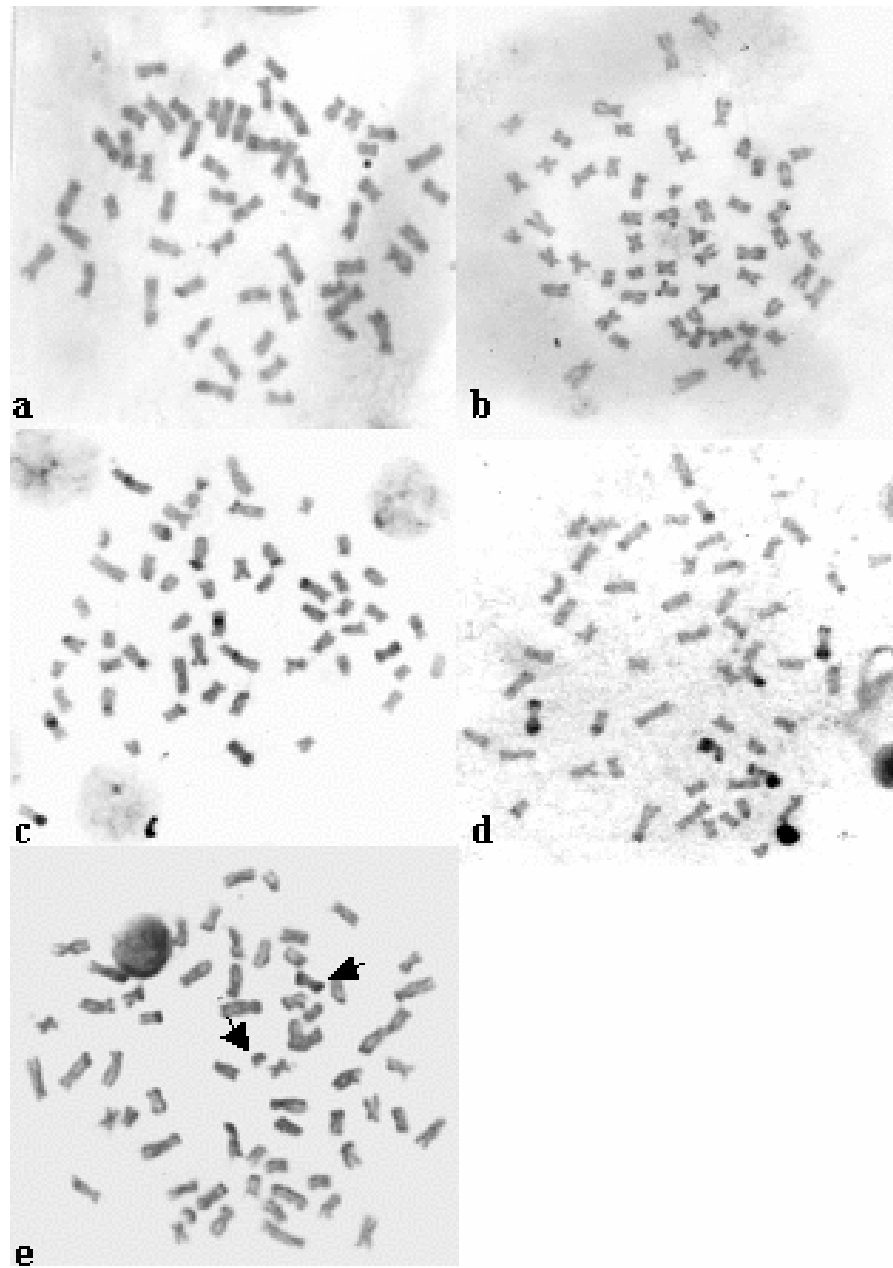


Fig. 4.5: Metáfases somáticas de **a** *Parauchenipterus leopardinus*, **b** *P. galeatus*, **c** *Pseudopimelodus zungaro*, **d** *Franciscodoras marmoratus*, **e** *Rhamdia quelen*. submetidos ao bandamento C. As setas indicam os cromossomos supranumerários encontrados em *Rhamdia quelen*.

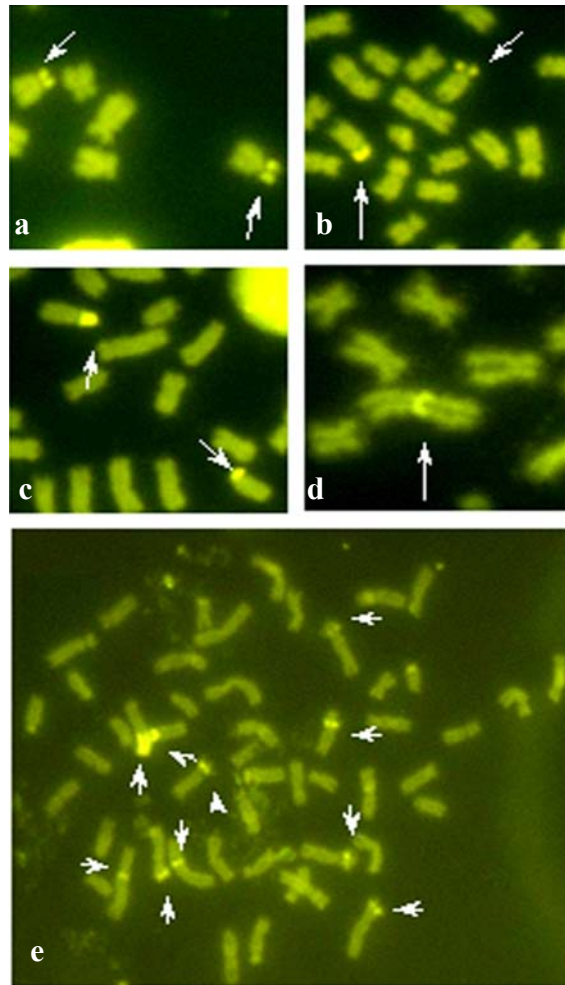


Fig. 4.6: Fragmentos de metáfases somáticas de **a** *Parauchenipterus leopardinus*, **b** *P. galeatus*, **c** *Franciscodoras marmoratus*, **d** *Rhamdia quelen* (associação), **e** *Pseudopimelodus zungaro*. submetidos à coloração por CMA₃. As setas indicam os sinais positivos obtidos através da aplicação da técnica.

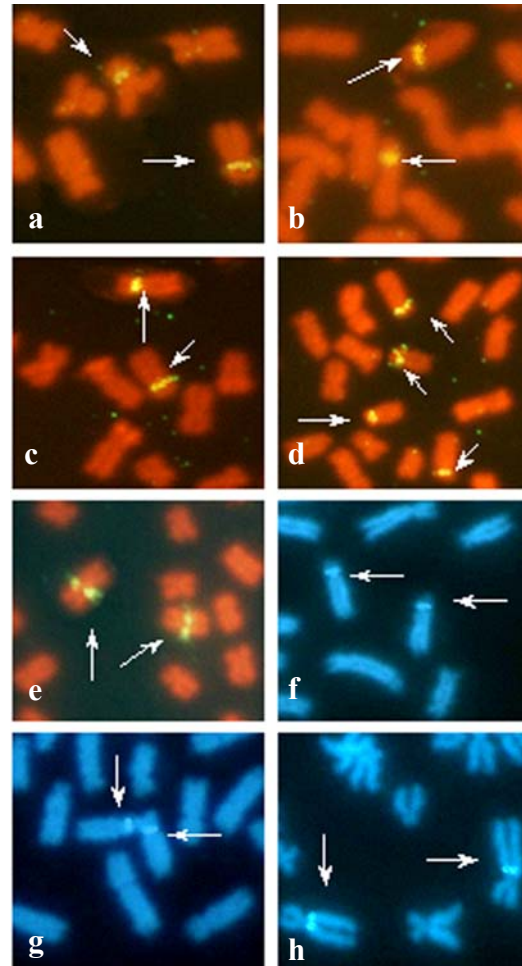


Fig. 4.7: Fragmentos de metáfases somáticas de **a, f** *Parauchenipterus leopardinus*, **b, g** *P. galeatus*, **c, h** *Pseudopimelodus zungaro*, **d** *Franciscodoras marmoratus*, **e** *Rhamdia quelen*. submetidos à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 5S (a-e) e coloração por DA/DAPI (f-h). As setas indicam as marcações obtidas através da aplicação das respectivas técnicas.

Discussão Geral e Conclusões



5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Trabalhos envolvendo levantamentos ictiofaunísticos de bacias brasileiras ainda são raros. O conhecimento sobre os peixes de água doce do Brasil, do ponto de vista da sistemática, ecologia, genética, entre outros, permanece ainda bastante incipiente, podendo estar relacionado com a diversidade de ambientes do território brasileiro.

Diversos fatores têm contribuído para o aumento no interesse pelo estudo destes organismos, um deles é o crescente número de construções de hidrelétricas, barragens artificiais e lagos para piscicultura, que chamam a atenção para o estudo das espécies de peixes presentes no local (Britski *et al.*, 1988).

A bacia do rio São Francisco é caracterizada por uma ictiofauna bastante diversificada, marcada por um alto grau de endemismo. Como pode ser observado na Tabela 3, os estudos citogenéticos envolvendo peixes do rio São Francisco, na região de Três Marias, ainda são escassos perante o grande número de espécies descritas para a localidade, principalmente no que diz respeito aos Siluriformes.

No presente trabalho foram realizados estudos cariotípicos em diversas espécies endêmicas desta bacia, tais como: *Pimelodus* sp., *P. fur*, *Pseudopimelodus zungaro* e *Franciscodoras marmoratus*; e também em espécies compartilhadas com outras bacias brasileiras, como: *Pimelodus maculatus*, *Parauchenipterus galeatus*, *P. leopardinus* e *Rhamdia quelen*. Buscou-se, desta forma, aumentar o número de informações citogenéticas dos Siluriformes brasileiros, uma vez que a grande maioria dos dados obtidos consiste nas primeiras descrições da estrutura cromossômica das espécies analisadas.

Foi notória a manutenção do número diplóide observada nas famílias estudadas. Em Pseudopimelodidae prevalece $2n = 54$ cromossomos; em Auchenipteridae, Doradidae e Heptapteridae, $2n = 58$; e em Pimelodidae, prevalece $2n = 56$, com raras exceções (Tabela 1 e presentes dados). Embora haja um forte conservadorismo do número diplóide, há uma

acentuada variabilidade cariotípica, a qual pode ou não estar associada a polimorfismos cromossômicos, como por exemplo cromossomos supranumerários (Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Dias e Foresti, 1993; Garcia *et al.*, 2003).

Segundo Galetti Jr. *et al.* (2000), o isolamento geográfico maior das águas continentais em relação ao ambiente marinho, favorece o desenvolvimento de novos citótipos e a fixação de efeitos de eventos, como por exemplo, deriva genética. Estes efeitos podem ser maximizados quando associados a outras características ambientais presentes na bacia do São Francisco, e possivelmente responsáveis pelo alto grau de endemismo da ictiofauna local.

Os resultados apresentados referentes a *Pimelodus* sp., *P. fur*, *P. maculatus*, *Parauchenipterus galeatus* e *P. leopardinus* demonstram que as inversões cromossômicas, paracêntricas e principalmente as pericêntricas, possuem um grande papel na diversificação cromossômica de Pimelodidae, Auchenipteridae e dos Siluriformes de modo geral, podendo constituir um importante, senão o mais importante, mecanismo de evolução cariotípica dentro destes grupos, principalmente em Pimelodidae (Garcia e Moreira-Filho, 2005a).

A possibilidade de realizar alterações na estrutura cariotípica, sem modificar o número diplóide reforça teoria de homeostase celular (Galetti Jr., *et al.*, 2000), e também é observada em subfamílias de Loricariidae: Hypoptomatinae (Artoni e Bertollo, 2001; Kavalco *et al.* 2005), Neoplecostominae (Kavalco *et al.* 2005), e Hemipsilichthiinae (Alves, 2000), entre outros Siluriformes.

Através dos estudos citogenéticos foi possível identificar nas três espécies de *Pimelodus* algumas tendências de evolução cariotípica. As diferenças cariotípicas entre *Pimelodus* sp. e *P. maculatus* possivelmente estão relacionadas com inversões pericêntricas que resultaram na ausência de cromossomos do tipo acrocêntrico nesta última. Estas espécies apresentaram o mesmo número de sítios de DNAr 5S, localizados nos mesmos cromossomos, sendo que no 17º par, o posicionamento terminal destes genes em *P. maculatus* indica uma

condição derivada em relação a *Pimelodus* sp.. *P. fur*, por sua vez, apresentou redução do número diplóide, bem como de sítios de DNAr 5S, condição resultante, possivelmente, de fusões e/ou deleções cromossômicas.

A aplicação de técnicas de citogenética molecular, mais especificamente a FISH com sonda de DNAr 5S, mostrou-se bastante informativa na caracterização cromossômica destas espécies de Siluriformes. Esta técnica, ainda muito pouco aplicada neste grupo de peixes, permitiu a caracterização das três espécies de *Pimelodus* analisadas, constituindo um marcador populacional para a região de Três Marias. Nas demais espécies estudadas foi possível obter padrões diferenciados de número e localização destes sítios. A localização de genes ribossômicos tem se mostrado importante na indicação das relações evolutivas em peixes, como apontado para outro gênero neotropical, *Astyanax* (Characidae), onde dois grupos podem ser identificados com relação à localização de genes de DNAr 5S (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Kavalco *et al.*, 2004), apoiando hipóteses do polifiletismo do gênero (Weitzmann e Malabarba, 1998). Desta forma, as variações observadas com relação a este gene no gênero *Pimelodus* podem constituir uma importante ferramenta citotaxonômica, muito embora haja grupos com maior conservadorismo quanto a este caráter (Martins e Galetti, 2000).

O uso de fluorocromos associados ao estudo da heterocromatina constitutiva foi bastante útil na caracterização das espécies estudadas, principalmente em *P. zungaro* e *Pimelodus* sp., que apresentaram uma grande quantidade de blocos GC-ricos, bem como nas espécies que apresentaram heterocromatina AT-rica (*P. galeatus*, *P. leopardinus* e *P. zungaro*), uma condição rara em peixes (Souza e Moreira-Filho, 1995), permitindo a caracterização de alguns tipos de heterocromatina nas espécies estudadas.

Com relação ao bandamento C, o estudo das regiões heterocromáticas mostra-se bastante útil no estudo e caracterização de populações de peixes, bem como na detecção de

polimorfismos cromossômicos (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Mantovani *et al.*, 2000; Vissoto, 2000; Vicari *et al.*, 2003). De forma geral, os silurídeos analisados apresentaram pouca quantidade de heterocromatina, dispersa preferencialmente em regiões pericentroméricas e periteloméricas, sendo que em alguns casos cromossomos metacêntricos com ambos os telômeros banca C positivos foram observados. Este padrão, caracterizado por uma menor quantidade de heterocromatina é assumido por diversos autores como o predominante para os representantes da subordem Siluroidei (Vissoto *et al.*, 1999a; Vasconcelos e Martins-Santos, 2000, Souza *et al.*, 2003.)

Outra característica bastante comum entre estes peixes é a ocorrência de RONS simples, no presente estudo esta foi confirmada tanto pela impregnação por nitrato de prata quanto por hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S. Dentro de diversas famílias, como Pimelodidae e as demais aqui abordadas, observa-se que estas regiões distribuem-se preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos, sendo que marcações intersticiais (Fenocchio *et al.*, 2003) são mais raras. Oliveira e Gosztanyi (2000) argumentam que RONS simples localizadas em posição terminal deva representar o estado ancestral para este caráter em Siluriformes.

Os cromossomos supranumerários representam um dos casos de variação numérica mais interessantes e mesmo assim um dos menos compreendidos. Não se sabe ainda quais as possíveis funções destes cromossomos ou como se originaram. A presença de cromossomos B, marcante para o gênero *Rhamdia* e também visualizado em outros gêneros (Tabela 3) pode sugerir que estes possuem uma origem comum anterior à diversificação destes grupos de peixes. Entretanto, a aplicação da técnica de bandeamento C nos cromossomos B dos diferentes representantes destas famílias demonstrou uma variação acentuada no padrão de bandas, sugerindo que após a diversificação destes grupos os cromossomos B poderiam ter evoluído independente em cada um deles.

Os dados cariotípicos aqui apresentados são indicativos da grande diversidade da ictiofauna do rio São Francisco e da possível atuação de fatores que influenciam no alto grau de endemismo dos peixes desta bacia. Através do estudo citogenético de representantes das famílias de Siluriformes encontradas no município de Três Marias, algumas tendências de evolução cromossômica puderam ser levantadas para espécies que já possuíam informações citogenéticas prévias, como *Pimelodus* e *Rhamdia*, o que permite uma maior compreensão dos processos de diferenciação e evolução cariotípica dentro destes gêneros. Os demais dados referentes às outras espécies analisadas no presente estudo, constituem informações inéditas, ressaltando a necessidade da ampliação dos estudos envolvendo este grupo de peixes.

Referências Bibliográficas



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abucarma, M. e Martins-Santos I.C. (1996) Caracterização cromossômica de duas espécies da família Pimelodidae (Pisces, Siluriformes). *VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos, SP, p. 73.
- Abucarma, M. e Martins-Santos I.C. (1998) Cromossomos B em espécies do gênero *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes) endêmica da bacia do Rio Iguaçu. *VII Simpósio de Citogenética Aplicada de Peixes Neotropicais*, Londrina, PR, resumo B5.
- Affonso, P.R.A.M. (2000) Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Affonso, P.R.A.M.; Guedes, W.; Pauls, E. e Galetti Jr., P.M (2002). Close karyotypical relationship between two species of marine angelfish from South Atlantic: *Pocamanthus arcuatus* and *P. paru* (Perciformes, Pomacanthidae). *Caryologia* 55(4): 323-329.
- Almeida-Toledo, L.F., e Toledo Filho, S.A. (1985) Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigmannia sp* (Pisces, Sternopygidae) from the amazon basin. *Genetica*, 66: 85-88
- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Trajano, E. Toledo Filho, S.A. (1992) Cytogenetic analysis of the Brazilian catfish *Pimelodella kronei* and it presumed ancestor *P. transitoria*. *Caryologia*, 45 (3-4): 255-262.
- Almeida-Toledo, L.F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonillo, C.; Porto-Foresti, F. e Daniel-Silva, M.F.Z. (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet. Genome Res.*, 97: 229-233.
- Alves, A.L.(2000) Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Andrade, S.F, Maistro, E.L, Oliveira, C. e Foresti, F. (1998) Caracterização cromossômica da espécie *Rhamdia sp.* (Pisces, Pimelodidae), proveniente do Rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. *Resumos do 44º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia, SP, p. 66.
- Artoni, R.F. (1996) Estudos citogenéticos na família Loricariidae com ênfase no gênero *Hypostomus* (Lacepede, 1803) (Pisces, Siluriformes). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Artoni, R.F. e Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201-210.
- Artoni, R.F. e Bertollo, L.A.C. (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity*, 89: 15-19.

- Artoni, R.F.; Molina, W.F.; Bertollo, L.A.C. e Galetti Jr., P.M. (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genet. Mol. Biol.**, 22: 1-6.
- Bertollo, L.A.C. e Cavallaro, Z.I. (1992) A high differentiated W chromosome system in characid fish, *Triportheus quentarii*. **Cytogenet. Cell Genet.**, 60: 60-63.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. e Moreira-Filho O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil. J. Genet.**, 1: 103-120.
- Bigoni, A.P.V.; Almeida-Toledo, L.F.; Toledo Filho, S.A. (1992) Estudos citogenéticos em *Pseudoplatystoma coruscans* (Pimelodidae, Sorubiminae) do rio Mogi-Guaçu, SP. **Resumos do IV Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes Neotropicais**, Rio de Janeiro, RJ, p. 32.
- Borin, I.A. e Martins-Santos, I.C. (1999). Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Telostei, Siluriformes) from Iguazu river basin. **Genetica**, 106: 215-221.
- Borin, I. e Martins-Santos, I.C. (2000a) Ocorrência de cromossomos B em duas espécies do gênero *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) da bacia do Rio Iguazu. **Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP, p. 62.
- Borin, I. e Martins-Santos, I.C. (2000b) Caracterização citogenética de quatro espécies do gênero *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) das bacias do Rio Iguazu e Paraná. **Resumos do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Manaus, AM, p. 91.
- Borin, I. E Martins-Santos, I.C. (2002) Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. **Cytologia**, 67: 199-204
- Born, G.G. e Bertollo, L.A.C. (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with polymorphic NOR bearing X chromosome. **Chrom. Res.**, 8: 111-118.
- Britski, H.A. (1981) Peixes de água doce. In: Carvalho, J.C.M. (Coord.). **Atlas da fauna brasileira**. Melhoramentos, São Paulo, SP, pp. 84-93.
- Britski, H.A.; Sato, Y. e Rosa, A.B.S. (1988) **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**. Câmara dos Deputados/ CODEVASF, Brasília, 143p.
- Carvalho, R.A. e Dias, A.L. (2001) Caracterização citogenética de *Rhamdia quelem* (Pisces, Rhamdiidae) provenientes da Bacia do Rio Tibagi/PR. **Resumos do Congresso Nacional de Ictiologia**, p. 73.
- Carvalho, R.A., Giuliano-Caetano, L e Dias, A.L. (2004) Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river, Paraná, Brazil. **Cytologia**, 69(4):381-385.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C e 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: 3: 253-260.

Centofante, L.; Bertollo, L.A.C. e Moreria-Filho, O. (2002) A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Paradon* (Pisces, Paradontidae). *Caryologia*, 54(3): 253-260.

Cestari, M.M. e Galetti Jr., P.M. (1992). Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, pisces). *Brasil. J. Genet.*, 15(3): 555-567

Costa, L.J. e Reggi, R. (1986) Estudos preliminares de duas espécies da família Pimelodidae: *Pimelodus maculatus* e *Parapimelodus valenciennes* do rio Guaíba-RS. *Resumos do I Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes Neotropicais*, São Carlos, SP, p. 34.

Della-Rosa, V.A.; Bertollo L.A.C.; Ferrari, I.; Moreira-Filho, O. e Foresti F. (1980). Estudos citogenéticos de peixes da Amazônia. II Ordem Siluriformes. *Ciência e Cultura*, 32: 735.

Dergan, J.A e Bertollo, L.A.C. (1990) Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná Basins, Brasil. *Brazil. J. Genet.*, 13(4): 755-766.

Dias, A.L. e Foresti, F. (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev. Brasil. de Genet.*, 16: 585-600.

Diniz, D.B. (2003) Estudos citogenéticos populacionais em *Hoplerithrynus unitaeniatus* (Pices, Erythrinidae). Análise da biodiversidade. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

Falcão, J.N. e Bertollo, L.A.C. (1985). Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynoptomatinae (Pisces, Characidae). *J. Fish Biol.*, 27: 157-163.

Faria, A.F; Brito, J.G. e Venere, P.C. (2000) Citogenética de Pimelodidae: caracterização cromossômica de *Pimelodus blochii*, *Pimelodella cristata* e *Hemisorubim platyrhynchus* (Siluriformes) do médio Rio Araguaia. *Resumos do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Manaus, AM, p. 92.

Fauaz, G.; Vicente, V.E. e Moreira Filho, O.(1994) Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 17: 157-163.

Feldberg, E.; Porto, J.I.R. e Bertollo, L.A.C. (1992) Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Brazil. J. Genet.*, 15(2): 369-383.

Feldberg, E. Porto, J.I.R., Santos, E.P. e Valentim, F.C.(1999) Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the central Amazon. *Genet. Mol. Biol.*, 22(3): 351-356.

- Fenocchio, A.S. (1993) Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C. (1990) Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**, 81: 193- 198.
- Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C. (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from Brazilian Amazon region. **Cytobios**, 69: 41-46.
- Fenocchio, A.S.; Jorge, L.C.; Venere, P.C. e Bertollo, L.A.C (1993) Karyotypic characterizations and nucleolus organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). **Rev. Brasil. de Genet.**, 16(4): 1097-1101.
- Fenocchio, A.S.; Pstorii, M.C.; Lopez, P.A.; Sanchez, S.; Alberdi, A.J.; Bordenave, S. e Dib, M.C. (1994) Levantamento citogenético em peixes de água-doce da Argentina: resumo das espécies estudadas. **Resumos do V Simpósio de Citogenética Aplicada a Peixes Neotropicais**, Botucatu, SP, p. 8.
- Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. e Camacho, J.P.M. (2000) B chromosomes in two fish species genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia biol. (Kraków)**, 48: 105-109.
- Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Dias, A.L. e Swarça, A.C. (2003) Cytogenetic studies and correlations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). **Cytologia**, 68(4): 363-368.
- Fenocchio, A.S.; Swarça, A.C. e Dias, A.L. (2004) Dados caritópicos preliminares em *Glanidium riberoi* (Auchenipteridae, Siluriformes) do rio Iguazu (PR). **Resumos X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Natal, RN, p.138.
- Ferro, D.A.M.; Neo, D.M.; Moreira Filho, O e Bertollo, L.A.C. (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110: 55-62.
- Fonseca, Y.M.; Oliveira, G.A. e Maistro, E.L. (2001) Primeira descrição citogenética da espécie *Rhamdella microcephala* (Pisces, Pimelodidae), coletada na nascente do Rio Machado, MG. **CD-ROM de anais do 47º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP.
- Fontana, F.; Tagliavini, J.; Congiu, L.; Lanfredi, M.; Cgicca, M.; Laurente, C. e Rossi, R. (1998) Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. **Marine Biol.**, 132: 495-501.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. e Toledo-Filho, S.A. (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenet. Cell Genet.**, 31: 137-144.
- Fowler, H.W. (1950) Os peixes de água doce do Brasil. **Act. Arq. Zool. São Paulo**, 6: 568-579.

- Galetti Jr., P.M. Almeida-paiva, J.C.; Portella, A.L.B.S.; Sato, Y e Cardoso, E.L. (1981) Estudos citogenéticos em peixes do rio São Francisco. *Ciência e Cultura*, p. 699.
- Galetti Jr., P.M e Foresti, F. (1986) Evolution of the ZZ/ZW system in Leporinus (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.*, 43: 43-46.
- Galetti Jr., P.M. Almeida-paiva, J.C.; Portella, A.L.B.S.; Sato, Y e Cardoso, E.L. (1981) Estudos citogenéticos em peixes do rio São Francisco. *Ciência e Cultura*, p. 699.
- Galetti Jr., P.M.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C. e Moreira-Filho, O. (1984a) Karyotypic similarity in three species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia*, 37(4): 401-406.
- Galetti Jr., P.M; Bertolo, L.A.C.; Moreira Filho, O.; Ferro, D.A.M.; Dias, A.L., Portela, A.L.B.S. e Venere, P.C. (1984b) Levantamento citogenético preliminar em peixes da região de Três Marias 9Mg) – Bacia do rio São Francisco. *In: Associação Mineira de Aquicultura (AMA). Resumos. Coletânea 1982-1987*, p. 55.
- Galetti Jr., P.M; César, A.C.G e Vênere, P.C. (1991a) Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Caryologia*, 44, 3-4 : 287-292.
- Galetti Jr., P.M; César, A.C.G.; Vênere, P.C. e Foresti, F.(1991b) Heterochromatin and karyotype reorganization in fishes of the family Anostomidae. *Cytogenet. Cell Genet.* 56 : 116-121.
- Galetti Jr.; Mestriner, C.A; Monaco, P.J. e Rasch, E.M. (1995) Post-zygotic modifications and intra and inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: repost of a case involving *Leporinus friderici*. *Chrom.. Res.*, 3: 285-290.
- Galetti Jr.; Aguilar, C.T. e Molina, W.(2000) An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420: 55-62
- Garcia, C. (2003) Contribuições aos estudos citogenéticos de representantes de três famílias de Siluriformes. *Monografia*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP
- Garcia, C. e Moreira-Filho (2005a) Análises citogenéticas em três espécies de *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio São Francisco: considerações sobre a evolução cariotípica do gênero. Presente volume.
- Garcia, C. e Moreira-Filho (2005b) Localização cromossômica dos sítios de DNAr 5S e 18S em três espécies de *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae). Presente volume.
- Garcia, R.M.G.; Sachete, S e Martins-Santos, I.C. (1990) Aspectos citogenéticos de *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) do rio Paraná, região de Porto Rico, PR. *Resumos do III Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes Neotropicais*, Botucatu, SP, p. 33.
- Garcia, C.; Moreira Filho, O.; Bertollo, L.A.C e Centofante, L (2003) B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* 64(4): 403-411.

- Garcia, J.B.F; Dias, A.L. e Fenocchio, A.S. (2004) Caracterização cromossômica de *Pariolius* cf. *longicaudus* (Pisces, Pimelodidae) do rio Tibagi (PR). **Resumos X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Natal, RN, p. 145.
- Gil, H.R.; Feldberg, E.; Almeida-Val, V.M.F. e Val, A.L.(1998) Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). **Brazil. J. Med. Biol. Res.**, 31(11): 1449-1458.
- Giuliano-Caetano, L. e Bertollo, L.A.C. (1988) Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, state of Amazonas). **Brazil. J. Genet.**, 11(2): 299-306.
- Giuliano-Caetano, L e Bertollo, L.A.C (1990) Karyotypic variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae) II Occurrence of natural triploidy. **Rev. Brasil. Genet.** 13: 231-237.
- Gold, J.R.; Li, Y.C.; Shipley, N.S. e Powers, P.K. (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **J.Fish. Biol.**, 37: 563-575.
- Greenwood, P.H.; Rosen, D.E.; Weitzman, S.H. e Myers, G.S. (1966) Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. **American Mus. Nat. Hist.**, 131(4): 341-455.
- Hatanaka, T. (2001) Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus margravii* (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico do rio São Francisco. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Hatanaka, T. e Galetti Jr., P.M. (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122: 239-244.
- Heras, M.P. e Moreira-Filho, O. (1996) Caracterização cromossômica de *Lophiosilurus alexandri* (Pisces, Pimelodidae), uma espécie em extinção. **7º Encontro de biólogos**, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras –USP, Ribeirão Preto, SP, p. 49.
- Hochberg, V.B.M. e Erdtmann, B. (1988) Cytogenetical and morphological considerations of *Rhamdia quelem* (Pisces, Pimelodidae) – the occurrence of B chromosomes and polymorphical NOR regions. **Rev. Brasil. Genet.**, 11(3): 563-576
- Howell, W.M. (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, 62: 361-367
- Howell, W.M e Black, D.A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015.
- Jack, E.M.; Harrison, C.J.; Allen, T.D. e Harris, R. (1985) The structural basis for C-banding: a scanning electron microscopy study. **Chromosoma**, 91: 363-368.

- Jesus, C. M. e Moreira-Filho, O. (2000) Cytogenetic studies in some *Apareidon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**, 65: 397-160.
- Jesus, C.M.; Bertollo, L.A.C. e Moreira-Filho, O. (1999) Comparative cytogenetics of *Apareidon affinis* (pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genetica**, 105: 63-67.
- Jorge, L.C. e Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies on *Apareidon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. **Genetica**, 49: 1-7.
- Jorge, L.C.; Fenocchio, A.S. e Bertollo, L.A.C. (1992) Estudios cariotipicos preliminaries en *Rhynodoras d'orbigny* (Pisces, Doradidae). **Rev. Ictio.**, 1: 21-27.
- Justi, A.J. (1993) Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Curvier, 1819) (Pisces, Characidae) de três bacias hidrográficas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Kavalco, K.F. (2003) Contribuição citogenética à análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Paraitinga. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C. e Moreira-Filho, O. (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river Basin, Brazil. **Cytogenet. Genome Res.**, 106: 107-110.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C. e Moreira-Filho, O. (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, 94: 180-186.
- Levan, A.; Fredga, K. E Sandberg, H.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220.
- Lowe-McConeel (1975) **Fish communities in tropical freshwaters – Their distribution, ecology and evolution**. Longman London, 337p.
- Lundeberg, J.G.; Mago-Leccia, F. e Nass, P. (1991) *Exallodontus aguanai* a new Genus and species of Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from deep river channel of South America, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. **Proc. Biol. Soc. Wash.**, 104(4): 840-869.
- Maistro, E.L; Dias, A.L.; Foresti, F ; Oliveira, C. e Moreira Filho (1994) Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia** 47: 233-239
- Maistro, E.L; Oliveira, C. E Foresti, F. (2002) Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, silver nitrate and Cma₃ staining and Restriction Endonuclease banding. **Cytologia**, 67: 25-31.
- Mantovani, M. (2001) Citogenética comparativa entre populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Paranapanema. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

- Mantovani, M; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A. e Moreira-Filho, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae); tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, 109: 161-168.
- Margarido, V.P. e Galetti Jr., P.M. (1996) Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios**, 85: 219-228.
- Margarido, V.P e Gavasso, E (2000) Análise cariotípica em *Pimelodus ortomanni* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) coletado no Rio Iguaçu – Baciado Iguaçu. **Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP, p. 63.
- Martinez, J.L.; Moran, P.; Garcia-Vasquez, E. e Pendas, A.M. (1996) Chromosomal localization of the major and 5S rDNA genes in the european eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenet. Cell Genet.**, 73: 149-152.
- Martinez, E.R.M; Oliveira, C. e Foresti, F. (2004) Estudos filogenéticos na família Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes) com base em seqüências de DNA mitocondrial. **Resumos X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Natal, RN, p. 134.
- Martins, C. e Galetti Jr., P.M. (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chrom. Res.**, 7: 363-367.
- Martins, C e Galetti Jr., P.M (2000) Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chrom. Res.**, 8: 353-355.
- Martins, C e Galetti Jr., P.M (2001) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome** 44: 903- 910.
- Martins, C. e Wasko, A.P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in fish genome. In: **Focus on Genome Research** (Ed. C.R. Williams). Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, pp. 289-318.
- Martins-Santos, I.C.; Julio-Jr., H.F; Garcia, R.M.G. E Sanchete, S. (1988) Análise cromossômica em 2 espécies da ordem Siluriformes (Osteichthyes). **Resumos do II Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicals** – Maringá, p. 40.
- Martins-Santos, I.C.; Julio-Jr., H.F. E Burin, I. (1996) Karyotypic studies of four species of the Sorubiminae subfamily (Pisces, Siluriformes). **Caryologia**, 49: 73-80.
- Mayr, B; Kalat, M. e Rab, P. (1988) Heterochromatin and band karyotypes in three species of salmonids. **Theor. Appl. Genet.**, 76: 45-53.
- Mees, G.F. (1974) Auchenipteridae and Pimelodidae. **Zool. Verh.** 132: 115-246.

- Mestriner, C.A. e Galetti Jr, P.M (1986). Observações preliminares sobre os cromossomos de *Lophiosilurus alexandri* e suas relações com o grupo Pimelodidae. **Resumos do I Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. São Carlos, p. 49.
- Milhomem, S.S.R.; Souza, A.C.P.; Nascimento, A.L.; Carvalho Jr.,J.R., Feldeberg, E.; Barros,R.M.S.; Pieczarka, J.C. e Nagamachi, C.Y. (2002) Estudos cromossômicos de *Hassar cf. notospilus* e *Hassar sp.* (Doradidae, Siluriformes) **IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Maringá-PR, p 87.
- Milhomem, S.S.R.; Souza, A.C.P.; Nascimento, A.L.; Castro, R.R.; Carvalho Jr.,J.R., Feldeberg, E.; Barros,R.M.S.; Pieczarka, J.C. e Nagamachi, C.Y. (2003) Análises cromossômicas de *Platydoras cf. costatus* (Doradidae, Siluriformes). **CD-ROM Resumos do 49º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia – SP
- Molina, W.F. e Galetti Jr. (1996) Nova descrição de cromossomos sexuais no gênero *Leporinus* (Pisces, anastomidae). **VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. São Carlos, SP., p 52.
- Morán, P.; Martinez, J.L.; Garcia-Vazquez, E. e Pendás, A.M. (1996) Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout. **Cytogenet. Cell Genet.** 75: 145-150.
- Moreira Filho, O. e Bertollo, L.A.C. (1990) Uma técnica alternativa para preparações cromossômicas em peixes. **III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**, Botucatu, SP, p. 42.
- Moreira-Filho, O. e Bertollo, L.A.C (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): species complex. **Brazil. J. Genet.**, 14: 331-357.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. e Galetti Jr., P.M. (1984) Structure and variability of nucleolar organizing regions in Paradontidae fish. **Canad. J. Genet. Cytol.**, 26(5): 564-568.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. e Galetti Jr. P.M. (1993) Distribution of sex chromosome mechanism in neotropical fish and description of ZZ/ZW system in *Paradon hilarii* (Paradontidae). **Caryologia**, 46(3): 115-125.
- Moreira-Filho, O.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C. e Bertollo, L.A.C. (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characiformes). **Cytologia**, 66: 59-64.
- Morelii, S. (1998) Citogenética evolutiva em espécies do gênero *Hoplias*, grupo *lacerdae*. Macroestrutura cariotípica, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Morelli, S. e Bertollo, L.A.C (1983) Cytogenetic consideration on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II Occurrence of natural triploidy. **Caryologia** 36: 245-250.
- Nelson, S.J. (1994) **Fishes of the world**. 3 rd. Ed. United States of America. Ed. John Wiley & Sons. 600p.

- Neo, D.M; Bertollo, L.A.C e Moreira-Filho, O. (2001) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genética**, 108 : 211-215.
- Oliveira, C. e Gosztanyi, A.E. (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. **Caryologia**, 53(1): 31-37.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Mori, L. e Toledo-Filho, S.A. (1992) Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfish genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **J. Fish Biol.**, 40: 419-431.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Mori, L. e Toledo-Filho, S.A. (1992) Cytogenetic and DNA content studies on armoured catfish genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from southeast coast of Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, 16: 617-629.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. e Foresti, F. (2000) Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. Resumos VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manuas – AM, p. 24.
- Ozouf-Costaz, C. e Foresti, F. (1992) Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. **Netherlands J. Zool.**, 42(2-3): 277-290.
- Paganelli, H.H. (1990) Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax* com especial referência a *Astyanax bimaculatus* (Linneaus, 1758). Considerações taxonômicas e evolutivas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Paganelli, H.H. e Moreira Filho, O. (1986) Considerações cariotípicas de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) de três bacias hidrográficas. **Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Zoologia**, p.120.
- Paiva, M.P. (1982) **Grandes represas do Brasil**. Editerra Editorial, 292p.
- Paiva, M.P. (1983) **Peixes e pescas de águas interiores do Brasil**, Editerra Editorial, 158p.
- Paiva, L.R.S. e Júlio Jr., H.F. (2001) Análise cromossômica de *Trachydoras paraguayensis* e *Pterodoras granulosus* (Pisces, Siluriformes, Doradidae) introduzidas no Alto Rio Paraná. **CD-ROM de anais do 47º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP.
- Pardue, M.P. e Henning, W. (1990) Heterochromatin: junk or collectors item? **Chrom. Focus**. 100: 3-7.
- Pauls, E. e Bertollo, L.A.C. (1983). Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, 36 : 307-314.

- Pazza, R. (2005) Contribuições citogenéticas à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Pauls, E. e Bertollo, L.A.C. (1990). Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, 81 : 117-123.
- Pendás, A.M.; Morán, P. e Garcia-Vazquez, E. (1993) Multi-chromosoma location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. **Chrom. Res.** 1: 63-67.
- Pendás, A.M.; Morán, P.; Freije, J.P. e Garcia-Vazquez, E. (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmo 5S rDNA. **Cytogenet. Cell. Genet.** 67: 31-36.
- Pfister, S.C. (1997) Contribuição aos estudos cariotípicos da família Characidae de Três Marias (MG) – Bacia do rio São Francisco. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Pfister, S.C.; Moreira-Filho, O. e Bertollo, L.A.C. (1997) Cytogenetic studies in *Orthospinus franciscensis* (Pisces, Characidae, Stethaprioninae) and some considerations about karyotype evolution of the group. **Cytobios**, 91: 97-101.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83: 2934-2938.
- Pinna, M.C.C. (1993) Higher-Level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Telostei, Ostariophysi). **Tese de doutorado**, The City University of New York, New York.
- Pinna, M.C.C. (1998) Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes** (eds. Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S. e Lucena, C.A.S.), Edpures, Porto Alegre – Brasil, pp.79-330.
- Portela, A.L.B.S., Galetti Jr., P.M. e Bertollo, L.A.C. (1988) Considerations of chromosome evolution of Tetragonapterinae (Characidae). **Brazil. J. Genet.** 11(2): 307-313.
- Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr., H.F e Nishiyama, P.B. (1999) Ocorrência de cromossomos supranumerários restritos aos machos de *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Paraná (PR): análise do complexo sinaptonêmico. **Resumos do 45º Congresso nacional de Genética**, Gramado, RS. p.33
- Porto-Foresti, F.; Andreatta, A.A.; Oliveira, C e Foresti, F. (2000) Estudos citogenéticos em cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Telostei, Siluriformes) da bacia do Rio Paraguai. **Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia – SP, p. 52.
- Prado, C.H.B.A. e Galetti Jr., P.M. (1986) Considerações iniciais sobre a estrutura cromossômica no gênero *Pygocentrus* (Serrasalmininae, Characiformes). **Resumos do I**

Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. São Carlos, p.56

- Reed, K.M; Dorschener, M. e Phillips, R.B. (1997) Characteristis of two salmonid repetitive DNA families in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Cytogenet. Cell Genet.* 79: 187-187.
- Roman M.P, Pegararo J.L. e Margarido, V.P. (2001) Análises citogenéticas em quatro espécies de siluriformes (Pisces), com ênfase ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. *CD-ROM de anais do 47º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia, SP.
- Roman, M. P.; Moreira-Filho, O.M. e Margarido, V.P (2002a) Análise citogenética em *Pariolius hollandi* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguaçu. *IX Simpósio de citogenética e genética de Peixes*, Maringá, p 75.
- Roman, M. P.; Moreira-Filho, O.M. e Margarido, V.P (2002b) O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguaçu e um caso de triploidia natural.. *IX Simpósio de citogenética e genética de Peixes*, Maringá, p 76.
- Salvador, B e Moreira-Filho, O. (1992) B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69 : 50-56.
- Schimid, M. (1980) Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and at rich chromosomes regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- Shweizer, D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 27: 190-193.
- Silva, E.B (2004) Estudos citogenéticos comparativos entre espécies do gênero *Paradon* (Pisces, Paradontidae). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Silva, C.T.; Dias, A.L. e Giuliano Caetano, L. (1996) Análise citogenética em *Iheringichthys labrosus* e *Pimelodella sp.* (Pisces, Pimelodidae) da Bacia do Rio Tibage/PR. *Resumos do VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*. São Carlos, SP, p. 76.
- Souza, I.L e Moreira-Filho, O. (1995) .Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex. (Pisces, Characidae). I: Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60: 1-14.
- Souza, L. e Dias, A.L. (2000) Dados cromossômicos preliminares de *Pimelodus absconditus*, uma nova espécie de pimelodídeo (Pisces, Siluriformes). *Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia – SP, p. 53.
- Souza, I.L.; Moreira-Filho, O. e Galetti Jr., P.M. (1996) Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazil. J. Genet.*, 19(3): 405-410.

- Souza, A.B.; Fonseca, C.G.; Pinheiro, L.E.L. e Ribeiro, L.P. (1992) Estudos citogenéticos preliminares em *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) da Bacia do rio Paraguai. **Resumos do IV Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada a Peixes Neotropicais**, Rio de Janeiro, RJ, p. 28.
- Souza, A.C.P.; Nagamachi, C.Y.; Rodrigues, L.R.R.; Rissino, J.D.; Barros, R.M. e Pieczarka, J.C. (2000a) Descrição cariotípica de *Pimelodus gr. altipinnis* (Siluriformes, Pimelodidae). **Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia – SP, p. 62.
- Souza, A.C.P.; Nagamachi, C.Y.; Rissino, J.D.; Jaime Jr, R.C.; Barros, R.M. E Pieczarka, J.C. (2000b) Descrição cariotípica de *Pimelodus cf. maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae). **VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Manaus-AM, p. 90.
- Souza, E.L.M.; Feldberg, E. e Nakayama, C.M (2002) Análise cromossômica de quatro espécies da família Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) da Bacia Amazônica. **IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Maringá-PR, p. 84.
- Souza, L.; Giuliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (2003) Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraná river basin. **Cytologia**, 68(4) 345-350.
- Souza, L.; Giuliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (2004a) Banding chromosome pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from Parana river basin of Brazil. **Folia Biol. (Kraków)**, 52(3-4): 165-169.
- Souza, L.; Swarça, A.C e Dias, A.L (2004b) Analyses of the nucleolus organizer region in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) using AgNO₃, CMA₃ and FISH with the 18S rDNA probe. **Caryologia**, 57(4): 145-151.
- Sterba, G. (1973) **Freshwater fishes of the world**. T.F.H. Publications, USA, Vol. I e II, 887p.
- Stivari, M. K. e Martins-Santos, I.C.(2002) Estudos citogenéticos e ocorrência de cromossomo B em *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae) do rio Aguapei, SP, Brasil. **IX Simpósio de ciotgenética e genética de Peixes**, Maringá, PR, pp.80
- Stolf, R.; Swarça, A.C.; Giuliano Caetano, L. e Dias, A.L (2004) Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis aff. schubarti* (Siluriforme, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. **Caryologia**, 57(4): 348-352.
- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Exp. Cell**, 75: 304-306.
- Swarça, A.C.; Giuliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (1999) Cytogenetic characterization through chromosomal banding of *Pinirampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi River basin PR/Brazil. **Caryologia**, 52: 31-35.
- Swarça, A.C.; Giuliano-Caetano. L. e Dias, A.L. (2000a). Cytogenetics of species of the families Pimelodidae e Rhamdiidae (Siluriformes). **Genet. Mol. Biol.**, 23(3): 589-593.

- Swarça, A.L.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. e Cestari, M.M. (2000b) AgNo₃, CMA₃ e FISH em duas populações de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae). **VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Manaus-AM, p. 94.
- Swarça, A.C.; Giuliano-Caetano, L.; Vanzela, A.L.L. e Dias, A.L. (2001a) Heteromorphism of rDNA size in *Pirinampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) detected by *in situ* hybridization. **Cytologia**, 66: 275-278.
- Swarça, A.L.; Cestari, M.M.; Giuliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (2001b) Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). **Chrom. Science**, 5 : 51-55.
- Swarça, A.L.; Giuliano-Caetano, L. e Dias, A.L. (2001c) Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**, 110: 97-100.
- Swarça, A.C.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M e Dias, A.L. (2002a) Descrição de um sistema de determinação sexual XX/XY em *Steindachneridion sp.* (Pisces, Pimelodidae). **IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Maringá, PR, p. 66.
- Swarça, A.C.; Fenocchio, A.S.; Dias, A.L e Cestari, M.M. (2002b) NOR, CMA₃, hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18s em *Steindachneridion sp.* (Pisces, Pimelodidae). **IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Maringá, PR, p. 67.
- Swarça, A.C.; Fenocchio, A.S.; Dias, A.L. e Cestari, M.M (2002c) Bandamento cromossômico em duas espécies de pimelodídeos (Pisces, Siluriformes) combinando as técnicas de CBG, CMA₃ e DAPI. **IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Maringá, PR, p. 65.
- Swarça, A.C; Vidotto, A.P e Dias, A.L (2003a) Cytogenetic characterization of *Pimelodella aff. avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi river (Paraná state, Brazil). **Caryologia**, 56(4): 421-425.
- Swarça, A.C.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M e Dias, A.L. (2003b) Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish specie (Pimelodidae, Siluriformes). **Genetica**, 119: 87-92.
- Terencio, M.L.; Almeida, M.C. e Artoni, R.F. (2001) Citogenética de *Pimelodus ortomanni*, uma espécie de mandi endêmica ao Rio Iguaçu. **CD-ROM de anais do 47º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia –SP.
- Toledo, V. e Ferrari, I. (1976a) Estudo citogenético de *Pimelodella sp.* e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. **Científica**, 4: 120-123.
- Toledo, V. e Ferrari, I. (1976b) Estudos citogenéticos de três espécies do gênero *Pimelodus* (pisces, Pimelodidae). **Científica**, 4: 101-106.
- Troy, W.P. e Miyazawa, C.S. (2000) Análises citogenéticas de Doradidae (Pisces, Siluriformes) do Pantanal Matogrossense. **Resumos do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Manaus, AM, p. 82.

- Varcacel, A.; Brunner, P. e Maggese, M.C. (1993) B Chromosome polymorphism in South America catfish *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, 110: 111-118.
- Vari, R.P. e Malabarba, L.R. (1998). Neotropical ichthyology: An overview. In: ***Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*** (eds. Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S. e Lucena, C.A.S.), Edpurcs, Porto Alegre – Brasil (eds. L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S Lucena e C.A.S Lucena), pp. 1-11.
- Vasconcelos, C. e Martins-Santos, I.C. (2000) Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132: 103-109.
- Venere, P.C. e Galetti Jr., P.M (1985) Natural triploidy and B chromosome in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae). ***Brasil. J. Genet.*** 8: 681-687
- Venere, P.C. e Galetti Jr., (1989) Chromosome relationships of some neotropical Characiformes of the family Curmatidae. ***Brazil. J. Genet.*** 12: 17-25.
- Venere, P.C.; Galetti Jr., P.M.; Melo, C.E. e Centofante, L. (1995) Citogenética de Doradidae com a descrição dos cariótipos e as RONS de *Hassar wilderi* e *Rhynodoras sp.* (Siluriformes, Doradidae) do Médio Rio Araguaia. ***Resumos do XI Encontro Brasileiro de Ictiologia***. PUCAMP, Campinas, SP, C1.
- Venere, P.C. e Galetti Jr., P.M (1998) Cromossomos sexuais em *Opsodoras sp.* (Siluriformes, Doradidae) do médio rio Araguaia. ***Resumos do VII Simpósio de Citogenética e Genética Evolutiva Aplicada de Peixes Neotropicais***. Londrina, PR, resumo B.10.
- Verma, R.S. e Babu, A. (1995) ***Human chromosomes. Principles and techniques***. Second edition InC. MacGraw-Hill.419 p.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F. e Bertollo, L.A.C. (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplías malabaricus* fish populations. ***Cytogenet. Genome Res.***, 101: 24-28.
- Vicente, M.R.R.; Margarido, V.P. e Galetti Jr., P.M. (1994) Estudos cromossômicos em *Imparfinis piperatus* (Pisces, Siluriformes) do riacho São João (Bacia do Leste). ***Resumos do V Simpósio de Citogenética e Genética Evolutiva Aplicada de Peixes Neotropicais***. Botucatu, SP, resumo A.12.
- Vicente, V.E; Jesus, C.M e Moreira Filho, O. (2001) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Paradon* species (Pisces, Paradontidae) ***Caryologia*** 4: 365-369
- Vidotto, A.P; Swarça, A.C; Fenochio, A.S. e Dias, A.L. (2004) Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi river basin (Brazil). ***J. Heredity***, 95(6): 517-520.
- Vissoto, P.C.; Foresti, F. E Oliveira, C. (1997) A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). ***Cytologia***, 62: 61-66.
- Vissoto, P.C.; Foresti, F. e Oliveira, C. (1999a) Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). ***Chrom. Science***, 3:1-7.

- Vissoto, P.C.; Foresti, F. e Oliveira, C. (1999b) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chrom. Science*, 3: 9-13.
- Vissoto, P. C. (2000) Análise citogenética no gênero *Imparfinis* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Wasko, A.P.e Galetti Jr., P.M. (2000) Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genet. Mol. Biol.*, 23(1): 135-138.
- Weitzman, S.H. e Malabarba, L.R.(1998) Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes) In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes* (eds. Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S. e Lucena, C.A.S.), Edpures, Porto Alegre – Brasil,
- Wichman, H.A.; Payne, C.T.; Ryder, O.A.; Hamilton, M.J.; Maltbie, M. e Baker, R.J.(1991) Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J. Heredity*, 82: 369-377.
- Yunis, J.J. e Yasmineh, W.G. (1971) Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. *Science*, 174: 1200-1209.

SITES CONSULTADOS

(www.codevasf.gov.br/produtos/aquicultura.htm#0).

(www.mg.gov.br)