



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas

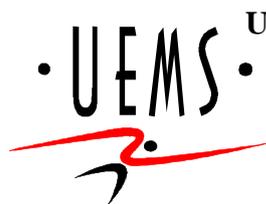


Jenifer Fernanda Damasio

Estudos citogenéticos em espécies dos gêneros *Hypostomus* e *Pimelodella* (Teleósteo, Siluriformes) da bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil

Mundo Novo/MS

2011



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



Estudos citogenéticos em espécies dos gêneros *Hypostomus* e *Pimelodella* (Teleósteo, Siluriformes) da bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil

Orientanda: Jenifer Fernanda Damasio

Orientador: Dr^o Carlos Alexandre Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Mundo Novo/MS

2011



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King



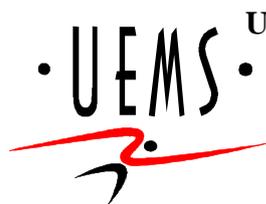
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



Dedico este trabalho ao meu marido, Marcio José Gonçalves Dias e aos meus pais, Eva Damasio e Manoel Damasio pelo incentivo, dedicação e amor incondicional.



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Mundo Novo
Curso de Ciências Biológicas



Agradecimentos

Primeiramente á Deus pela força, graça de vida e por ser meu refúgio, me fortalecendo em todas as ocasiões e aliviando-me as angústias.

Ao Professor DrºCarlos Alexandre Fernandes pela orientação e paciência e por ter dado todo atendimento necessário para o desenvolvimento da pesquisa na área de Citogenética de Peixes e ao FUNDECT por ter financiado a pesquisa.

Á Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pelo espaço físico.

A todos os funcionários e professores da unidade pela colaboração e amizade.

A toda a minha família, pela confiança e motivação.

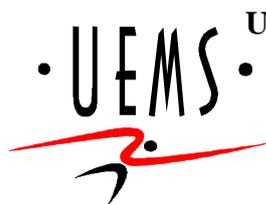
Ao meu esposo Marcio para o qual não existem palavras que expressem toda a minha gratidão e amor.

A todos os amigos do laboratório que sempre estiveram dispostos a ajudar e participar das coletas de peixes.

A todos sem exceção do laboratório de Citogenética de Peixes que sempre estavam dispostos a ajudar de alguma forma.

Aos meus colegas de turma.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



Apresentação

O presente estudo foi organizado em dois capítulos, possibilitando uma melhor discussão e compreensão dos resultados obtidos. Sendo o primeiro referente aos resultados obtidos em *Hypostomus ancistroides*, e tem por título: Análise citogenética em duas populações de *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil, já o segundo descreve os resultados obtidos no gênero *Pimelodella*, tendo como título: Estudos citogenéticos em duas espécies do gênero *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) da bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil.



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



Sumário

Capítulo I

Análise citogenética em duas populações de <i>Hypostomus ancistroides</i> (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil.	2
Introdução	3
Materiais e métodos.....	3
Resultados	4
Discussão	7
Referências.....	9

Capítulo II

Estudos citogenéticos em duas espécies do gênero <i>Pimelodella</i> (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) da bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil.	12
Introdução	133
Materiais e métodos.....	13
Resultados	144
Discussão	166
Referências.....	188



Capítulo I

**Análise citogenética em duas populações de *Hypostomus ancistroides*
(Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil**



Análise citogenética em duas populações de *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil

Resumo

O gênero *Hypostomus*, popularmente conhecido como cascudo é um dos gêneros mais especiosos na família Loricariidae, tendo aproximadamente 120 espécies. Este gênero tem apresentado uma ampla variação cariotípica, com diferentes números diplóides variando entre $2n=52$ cromossomos (*Hypostomus emarginatus*) à $2n=80$ cromossomos (*Hypostomus* sp. 2). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar citogeneticamente duas populações de *Hypostomus ancistroides* pertencentes à bacia do rio Iguatemi, Mato Grosso do Sul, de modo a contribuir com dados que permitam um melhor entendimento das relações evolutivas do gênero dentro da família Loricariidae. Foram analisados quatro espécimes do córrego Dourado e vinte e quatro espécimes do córrego Água Boa. O cariótipo foi organizado em um número diplóide de $2n=68$ cromossomos para as duas populações, distribuídos em $10m+22sm+16st+20a$ para a população do córrego Dourado e $14m+24sm+10st+20a$ para a população do córrego Água Boa e o número fundamental de braços foi de 116 para as duas populações. A Ag-NOR foi detectada no braço curto de quatro cromossomos subtelocêntricos para a população do córrego Água Boa e para a população do córrego Dourado detectada nos braços curtos de dois cromossomos submetacêntricos e de três cromossomos subtelocêntricos, revelando NORs múltiplas para ambas as populações. Blocos heterocromáticos em regiões centroméricas e teloméricas em poucos cromossomos nas duas populações foram observados. Portanto, apesar das duas populações de *H. ancistroides* apresentarem o mesmo número diplóide de $2n=68$ cromossomos, elas defeririam na fórmula cariotípica, indicando que rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas, possam ter ocorrido durante a diversificação destas populações.

Palavras-chaves: cascudo, evolução cariotípica, cromossomos, inversões pericêntricas.



Introdução

O gênero *Hypostomus*, popularmente conhecido como cascudo é um dos gêneros mais especiosos na família Loricariidae, tendo aproximadamente 120 espécies, sendo dominante nos rios brasileiros por apresentar uma grande adaptabilidade a mudanças ambientais, tais como temperatura, pH e alimentação (Endo, 2006). Apresenta uma ampla diversidade quanto ao padrão de coloração e morfologia, o que dificulta a identificação de determinadas espécies, principalmente aquelas com ampla distribuição geográfica (Zawadzki *et al.*, 1999).

Por apresentarem grande variabilidade no número diplóide, na formula cariotípica e no padrão de bandeamentos cromossômico estes peixes têm sido caracterizados como não conservados (Artoni e Bertollo, 1996). Os dados citogenéticos até o presente momento, mostram uma ampla variação cariotípica, com diferentes números diplóides variando entre $2n=52$ cromossomos (*Hypostomus. emarginatus*) à $2n=80$ cromossomos (*Hypostomus* sp.), sendo que o número diplóide mais comum, é de 72 cromossomos (Cereali, 2006).

No gênero *Hypostomus*, prevalece uma tendência de que cromossomos metacêntricos e submetacêntricos estejam presentes em maior quantidade em espécimes cujo número diplóide é menor, enquanto a quantidade de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos tende a ser em maior número nos exemplares cujo número diplóide é maior. As fissões cêntricas são rearranjos de relevante importância na evolução do cariótipo deste grupo, uma vez que estes rearranjos robertsonianos são potencialmente responsáveis pelo alto número diplóide encontrado nas espécies mais derivadas deste grupo (Artoni e Bertollo, 2001).

A escassez de dados inerentes aos peixes pertencentes à bacia do rio Iguatemi torna imprescindível a realização de pesquisas nesta bacia. Diante disso, o presente estudo traz os primeiros dados citogenéticos de duas populações de *H. ancistroides* pertencentes a esta bacia buscando contribuir no melhor entendimento das relações evolutivas do gênero dentro da ordem siluriformes.

Materiais e métodos

Quatro espécimes (2 machos e 2 fêmeas) de *H. ancistroides* foram coletadas no córregos Dourado (23°51'04.9" S e 54° 25'13.9" W) e vinte e quatro (9 machos, 11 fêmeas e



4 com o sexo indeterminado) no córrego Água Boa (23°56'16" S e 54°16'15" W), estes córregos são afluentes do rio Iguatemi, MS, Brasil. Os indivíduos coletados foram colocados em aquários no laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Mundo Novo -MS. Antes de serem eviscerados para obtenção dos cromossomos, os peixes eram anestesiados por *overdose* de óleo de cravo (Griffiths, 2000). Para cada exemplar analisado foi fornecido um número de identificação e obtido o sexo com o auxílio do microscópio.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células extraídas do rim seguindo a metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978), que consiste na inibição das fibras do fuso mitótico aplicando colchicina no animal, seguida de hipotonização da células com cloreto de potássio, fixação da suspensão celular com metanol e ácido acético (3:1) e por último pingar esta suspensão em lâminas e corar com Giemsa. A identificação dos cromossomos foram feitas de acordo ao critério de relação de braços (RB), sugerida por Levan *et al.* (1964) sendo classificados como metacêntricos (m: RB = 1.00 a 1.70), submetacêntricos (sm: RB = 1.71 a 3.00), subtelocêntricos (st: RB = 3.01 a 7.00) e acrocêntricos (a: RB = maior que 7.01). O número fundamental (NF) de braços foi calculado considerando os cromossomos do tipo metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos com dois braços e os cromossomos acrocêntricos com um braço. A técnica de banda-C descrita por Sumner (1972) foi empregada para análise da heterocromatina constitutiva. Ag-NORs foram detectadas por coloração de nitrato de prata (AgNO₃) seguindo o método descrito por Howell e Black (1980).

Resultados

Os exemplares de *H. ancistroides* das populações dos córregos Dourado e Água Boa apresentaram 2n=68 cromossomos com fórmula cariotípica de 10m+22sm+16st+20a, 14m+24sm+10st+20a, respectivamente (Figura 1).

A impregnação por nitrato de prata revelou NORs múltiplas para as duas populações de *H. ancistroides* analisadas, diferindo apenas no tipo cromossômico dos pares encontrados, sendo evidenciada no braço curto de dois cromossomos submetacêntricos e no braço curto de



três cromossomos subtelocêntricos para a população do córrego Dourado e no braço curto de quatro cromossomos subtelocêntricos para a população do córrego Água Boa (Figuras 2 e 3).

A heterocromatina constitutiva foi observada em blocos, em regiões centroméricas e teloméricas em ambas as populações (Figura 4 e 5). Além disso, na população do córrego Água Boa foi observado um grande bloco heterocromático no braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos, com heteromorfismo de tamanho (Figura 5).

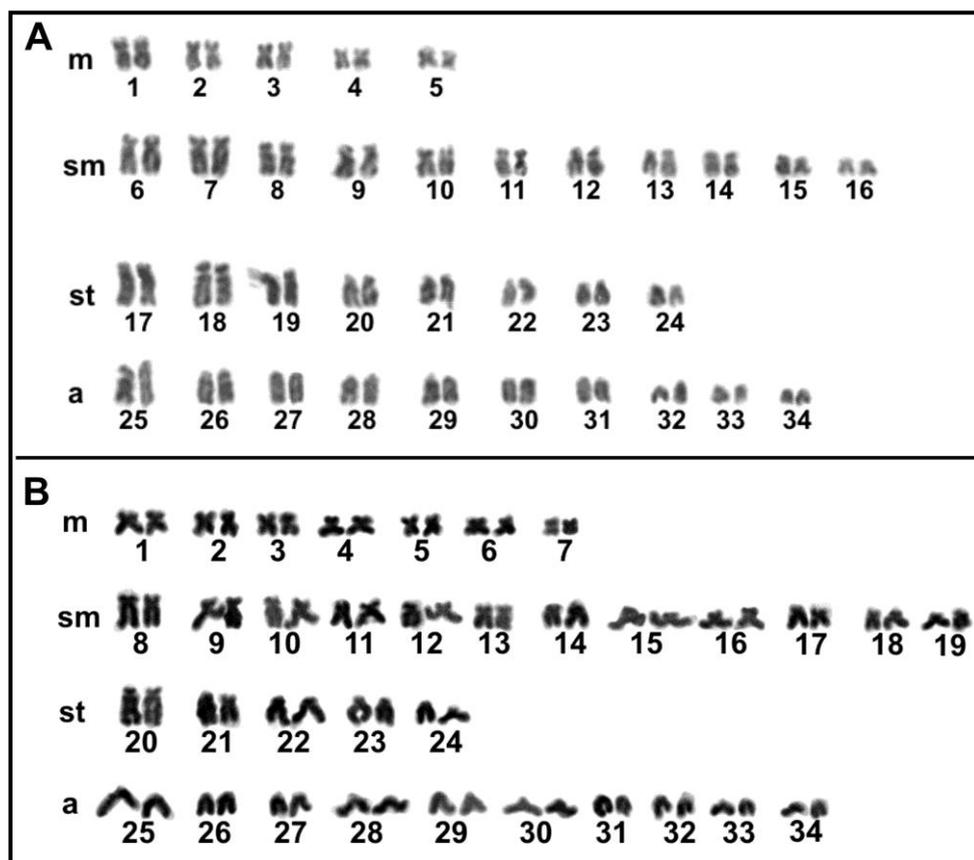


Figura 1 - Cariótipos de *H. ancistroides*. A) população do córrego Dourado. B) população do córrego Água Boa.

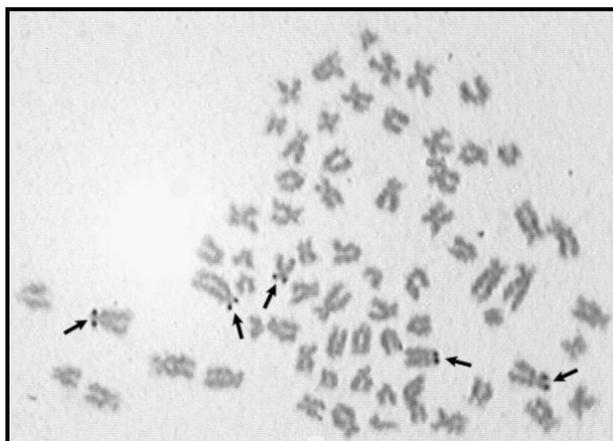


Figura 2 - Cromossomos metafásicos de *H. ancistroides* da população do córrego Dourado, corados pelo nitrato de prata. As setas indicam as Ag-NORs.

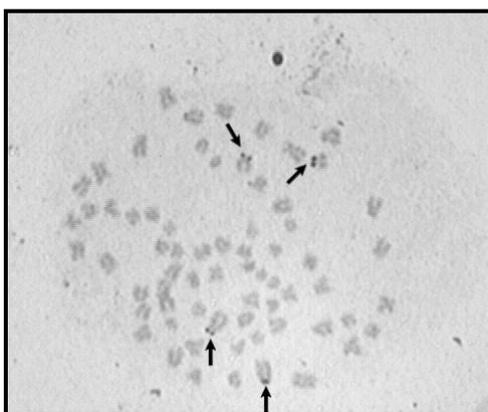


Figura 3 - Cromossomos metafásicos de *H. ancistroides* da população do córrego Água Boa, corados pelo nitrato de prata. As setas indicam as Ag-NORs.

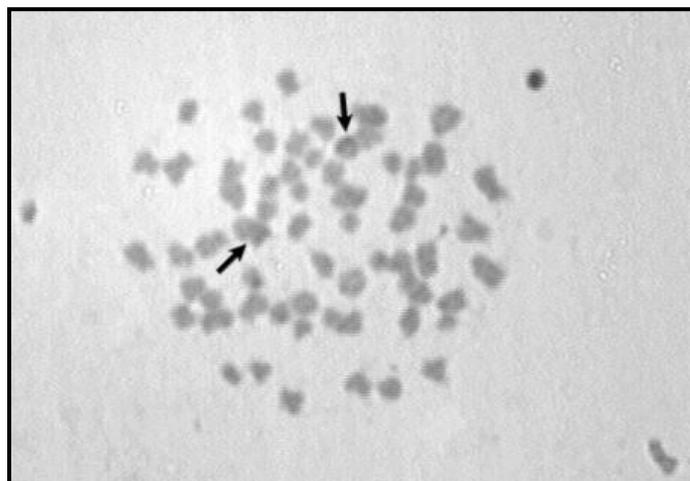


Figura 4 - Cromossomos metafásicos de *H. ancistroides* da população do córrego Dourado, após a banda-C. As setas indicam os cromossomos com grandes blocos heterocromáticos.

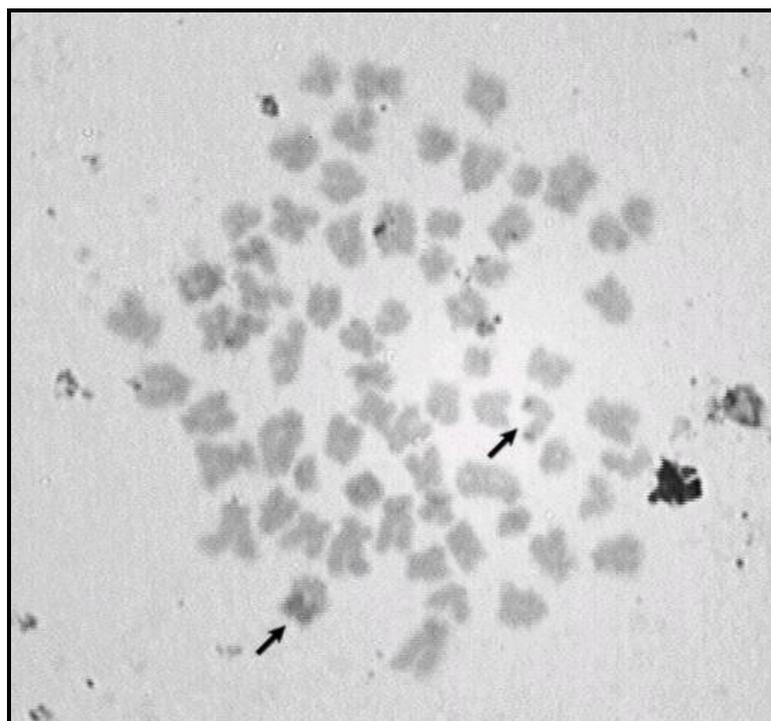


Figura 5 - Cromossomos metafásicos de *H. ancistroides* da população do córrego Água Boa, após a banda-C. As setas indicam um par de cromossomos homólogos heteromorfismo de tamanho de blocos heterocromáticos.

Discussão

As duas populações de *H. ancistroides* aqui analisadas apresentaram o mesmo número diplóide de $2n=68$ cromossomos. Embora, diferenças nas fórmulas cariotípicas foram observadas, sugerindo a ocorrência de polimorfismos cromossômicos, causados por



fenômenos de inversões e duplicações que podem alterar a morfologia dos cromossomos sem alteração de seu número diplóide (Artoni e Bertollo, 2001). A formação de populações pequenas e isoladas de *H. ancistroides*, geralmente em riachos de pequena ordem, mostra a ocorrência de polimorfismos cromossômicos, como acontece mesmo em outros grupos distantes, como *Astyanax scabripinnis*, levando ao processo de especiação. (Kavalco e Morreira-Filho, 2003; Vicari *et al.*, 2010)

Este número diplóide também foi encontrado por Rubert e Giuliano-Caetano (2008) e por Artoni e Bertollo (1996) analisando *H. ancistroides*. No entanto, todas essas populações analisadas diferiram em suas fórmulas cariotípicas. *H. ancistroides* foi descrito anteriormente com $2n=58$ para uma população do rio Mogi Guaçu no Alto Paraná (Michelle *et al* 1977), diferenciando-se do resultado encontrado no presente trabalho. Essa diferença do número diplóide é um forte indicativo de especiação alopátrica e sugere que alterações cromossômicas estruturais principalmente eventos de fusão e inversão cromossômica, estejam envolvidas nesta diversificação cariotípica destas populações.

A impregnação por nitrato de prata revelou NORs múltiplas para as duas populações de *H. ancistroides* analisadas, diferindo apenas no tipo cromossômico dos pares encontrados, tais resultados já haviam sido encontrados por Oliveira e Gosztony (2000) ao analisarem varias populações da bacia do Alto rio Paraná. Rubert e Giuliano-Caetano (2008) analisaram *H. ancistroides* do ribeirão Três Bocas (PR) obtiveram um resultado diferente, com marcação nos braços curtos de dois pares de cromossomos do tipo acrocêntrico, que não foram evidenciados nas populações analisadas no presente estudo.

Com relação a heterocromatina constitutiva as duas populações mostraram poucos cromossomos marcados em regiões centroméricas e teloméricas. A presença de um grande bloco heterocromático no braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos, com heteromorfismo de tamanho observado para a população do córrego Água Boa, também foi detectado para a população do ribeirão Maringá descrita por Endo (2006). Este polimorfismo pode ter surgido a partir de um crossing-over desigual entre os cromossomos homólogos, ou por eventos de duplicação ou deleção cromossômica.

Portanto, apesar das similaridades entre as populações de *H. ancistroides* até agora analisadas, diferenças na macroestrutura cariotípica ($2n$, NF e fórmula cariotípica) mostram a



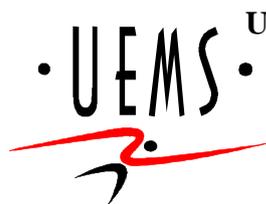
grande diversidade cariotípica evidenciada para esta espécie e indicam processos de diferenciação alopátrica.

Referências

- Artoni RF e Bertollo LA (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerationson karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49:81-90.
- Artoni RF e Bertollo LAC (2001) Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.
- Bertollo LAC, Takahashi CS e Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerda* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1: 103-120.
- Cereali SS (2006) Estudos citogeneticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena-MS. Unpublishd. Dissertação Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 99 pp.
- Endo KS (2006) Análise citogenética de espécies da Subfamília Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do alto rio Paraná. Dissertação de Mestrado, Programa de Genética e Melhoramento (UEM).
- Griffiths SP (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57: 1453–1464.
- Howell WM e Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 81:1014-1015.
- Levan A, Fredga K e Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Kavalco KF e Moreira-Filho O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (pisces, characidae) from Paraiba do Sul River Basin. *Caryologia* 106: 271-461.
- Michelle JL, Takahashi CS e Ferrari I (1977) Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (PISCES). *Cytologia* 42:536-549.



- Oliveira C e Gosztory AE (2000) A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriformes. *Caryologia* 53:31-37.
- Rubert M e Giuliano-Caetano L (2008) Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*. 6:93-100.
- Summer AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromation. *Exp. Cell Res* 75:304-306.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho, Bertollo LAC e Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol*. 76:1094–1116.
- Zawadzki CH, Renesto E e Bini LM. (1999) Allozyme discrimination of the three species of the genus *Hypostomus* Lacepe, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the rio Iguaçu basin (Brazil). *Suisse Zool*.106:91-105.



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



Capítulo II

Estudos citogenéticos em duas espécies do gênero *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) da bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil

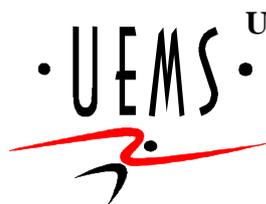


Estudos citogenéticos em duas espécies do gênero *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) da bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil

Resumo

Pimelodella é um dos gêneros pertencentes à família Heptapteridae, constituído de peixes endêmicos neotropicais, inclui peixes de pequeno e médio porte, representando uma das maiores irradiações de bagres. Este gênero tem apresentado uma ampla variabilidade cariotípica, com o número diplóide variando de $2n = 46$ para *Pimelodella* sp., a $2n=58$ para *Pimelodella Kronei*. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar citogeneticamente duas espécies do gênero *Pimelodella*: *P. avanhandavae* e *P. gracilis* pertencentes à bacia do rio Iguatemi, MS. Nos espécimes de *P. avanhandavae* o número diplóide foi de $2n=52$ cromossomos, distribuídos em $24m+20sm+08st$ com NF igual a 104. A Ag-NOR foi detectada no braço curto de um cromossomo subtelocêntrico e na região telomérica do braço longo de um cromossomo submetacêntrico, e na região centromérica de um cromossomo acrocêntrico, revelando sistema de NORs múltiplas. Blocos heterocromáticos em regiões teloméricas foram evidenciados no braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos e em um par de cromossomos metacêntrico. Enquanto que nos espécimes de *P. gracilis* o número diplóide foi de $2n=46$ cromossomos, distribuídos em $20m+18sm+ 06st+2a$, com NF igual a 90. A Ag-NOR foi detectada na região telomérica de um cromossomo metacêntrico, revelando sistema de NOR simples. Em geral, a heterocromatina constitutiva foi evidenciada, na região centromérica e telomérica, com intensidade variável de coloração, além de pequenos segmentos intersticiais e dois grandes blocos pericentroméricos. As duas espécies de *Pimelodella* apresentaram diferenças no número diplóide e fórmula cariotípica, indicando que rearranjos cromossômicos, como fissões e/ou fusões cêntricas, possam ter ocorrido durante a diversificação destas duas espécies.

Palavras-chave: *Pimelodella avanhandavae*, *Pimelodella gracilis*, cromossomos, rearranjos cromossômicos.



Introdução

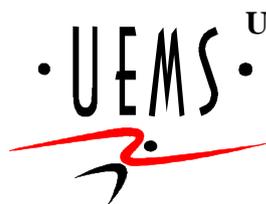
Pimelodella é um dos gêneros pertencentes à família Heptapteridae, constituído de peixes endêmicos neotropicais. Possui uma ampla distribuição em cursos d'água da América Central e do Sul, sendo vários representantes de localidades específicas em áreas de endemismo ictiológicas já reconhecidas (Bockmann e Guazelli, 2003). Inclui peixes de pequeno e médio porte, representando uma das maiores irradiações de bagres (Pinna, 1998).

Apesar de recentemente ser elevados ao status de família, os Heptapteridae, que até recentemente eram considerados como uma subfamília de Pimelodidae apresentam dados desde 1972. No entanto, dos 26 gêneros pertencentes à família Heptapteridae, apenas 7 gêneros possuem estudos citogenéticos, e das 200 espécies apenas 17 espécies são caracterizadas citogeneticamente (Borba, 2009). Os dados citogenéticos existentes para o gênero *Pimelodella*, demonstram uma grande variabilidade cariotípica, com o número diplóide variando de $2n = 46$ para *Pimelodella* sp. (Vasconcelos e Martins-Santos 2000; Vissoto *et al.*, 1999), a $2n=58$ para *P.kronei* (Almeida-Toledo *et al.*, 1992). O gênero *Pimelodella* caracteriza-se pelo cariótipo formado principalmente por pares de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, ocorrendo em menor quantidade cromossomos dos tipos subteloicêntricos e acrocêntricos, mantendo um número fundamental de braço elevado, variando de 80 a 116 (Swarça *et al.*, 2003). Sistemas de cromossomos sexuais do tipo XX/XY foram descritos por Dias e Giuliano Caetano (2002) em *Pimelodella* sp. e mais recentemente foram encontrados em *P. boshimai* um sistema sexual do tipo $X^1X^1X^2X^2/X^1Y^1X^2Y^2$ (Garcia, 2005).

Considerando a ausência de informações citogenéticas do gênero *Pimelodella* da bacia do rio Iguatemi e a ampla variação cariotípica encontrada no gênero, o presente estudo faz uma caracterização cariotípica de *P. avanhandavae* e *P. gracilis*, a fim de contribuir com novos dados citogenéticos deste grupo.

Materiais e métodos

Quinze espécimes de *P. avanhandavae* (7 machos, 5 fêmeas e 3 com o sexo indeterminado) e doze de *P. gracilis* (4 machos, 4 fêmeas e 4 com o sexo indeterminado)



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Mundo Novo

Curso de Ciências Biológicas



foram coletadas no córrego Água Boa (23°56'16" S e 54°16'15" W), um afluente do rio Iguatemi, MS, Brasil. Os indivíduos coletados foram colocados em aquários no laboratório de citogenética de peixes da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Mundo Novo -MS. Antes de serem eviscerados para obtenção dos cromossomos, os peixes eram anestesiados por *overdose* de óleo de cravo (Griffiths, 2000). Para cada exemplar analisado foi fornecido um número de identificação e obtido o sexo com o auxílio do microscópio.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células extraídas do rim seguindo a metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978), que consiste na inibição das fibras do fuso mitótico aplicando colchicina no animal, seguida de hipotonização das células com cloreto de potássio, fixação da suspensão celular com metanol e ácido acético (3:1) e por último pingar esta suspensão em lâminas e corar com Giemsa. A identificação dos cromossomos foi feita de acordo ao critério de relação de braços (RB), sugerida por Levan *et al.* (1964) sendo classificados como metacêntricos (m: RB = 1.00 a 1.70), submetacêntricos (sm: RB = 1.71 a 3.00), subtelocêntricos (st: RB = 3.01 a 7.00) e acrocêntricos (a: RB = maior que 7.01). O número fundamental (NF) de braços foi calculado considerando os cromossomos do tipo metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos com dois braços e os cromossomos acrocêntricos com um braço. A técnica de banda-C descrita por Sumner (1972) foi empregada para análise da heterocromatina constitutiva. As regiões organizadoras do nucléolo (Ag-NORs) foram detectadas por coloração de nitrato de prata (AgNO₃) seguindo o método descrito por Howell e Black (1980).

Resultados

A população de *P. avanhandavae* apresentou número diplóide de $2n=52$ cromossomos, distribuídos em $24m+20sm+08st$ para ambos os sexos, com NF igual a 104 (figura 1A). Em *P. gracilis* o número diplóide observado foi de $2n=46$ cromossomos, distribuídos em $20m+18sm+06st+2a$ para ambos os sexos, com NF igual a 90 (figura 1B).

Em relação as regiões organizadoras do nucléolo, a população de *P. avanhandavae* revelou sistema de NORs múltiplas, com marcações no braço curto de um par de cromossomos subtelocêntricos e na região terminal do braço longo de par de cromossomos



acrocêntricos (Figura 2A). Enquanto que a população de *P. gracilis* apresentou sistema de NOR simples com marcação na região terminal de um cromossomo metacêntrico, (Figura 2B).

Em relação a heterocromatina constitutiva em *P. avanhandavae* foram observados grandes blocos heterocromáticos em regiões pericêntricas em um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 2C). E em *P. gracilis* a heterocromatina constitutiva foi evidenciada na região centrômerica e telomérica de alguns cromossomos, com intensidade variável de coloração, além de pequenos segmentos intersticiais evidentes em dois cromossomos e dois grandes blocos pericentroméricos em um par de submetacêntricos (Figura 2D).

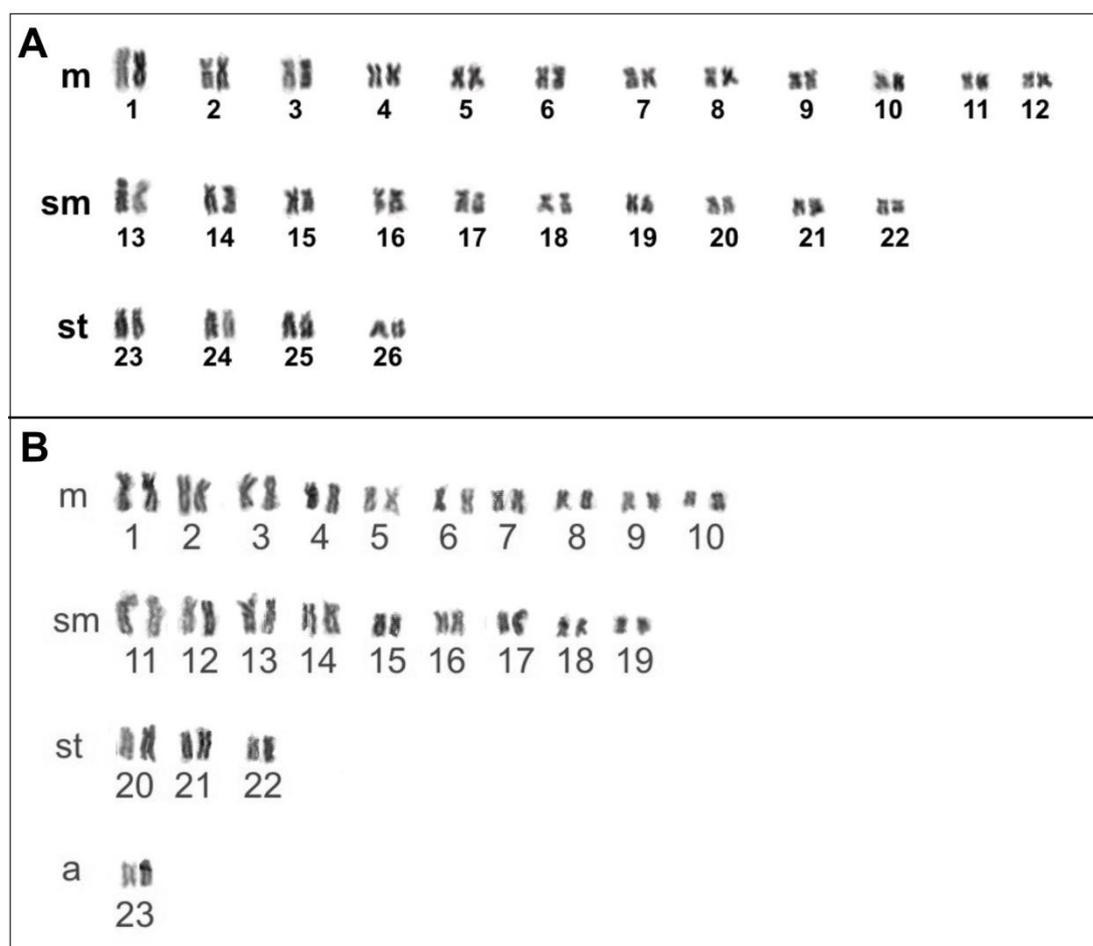


Figura 1- Cariótipos de *P.avanhandavae* (A); *P. gracilis* (B), após coloração convencional por giemsa.

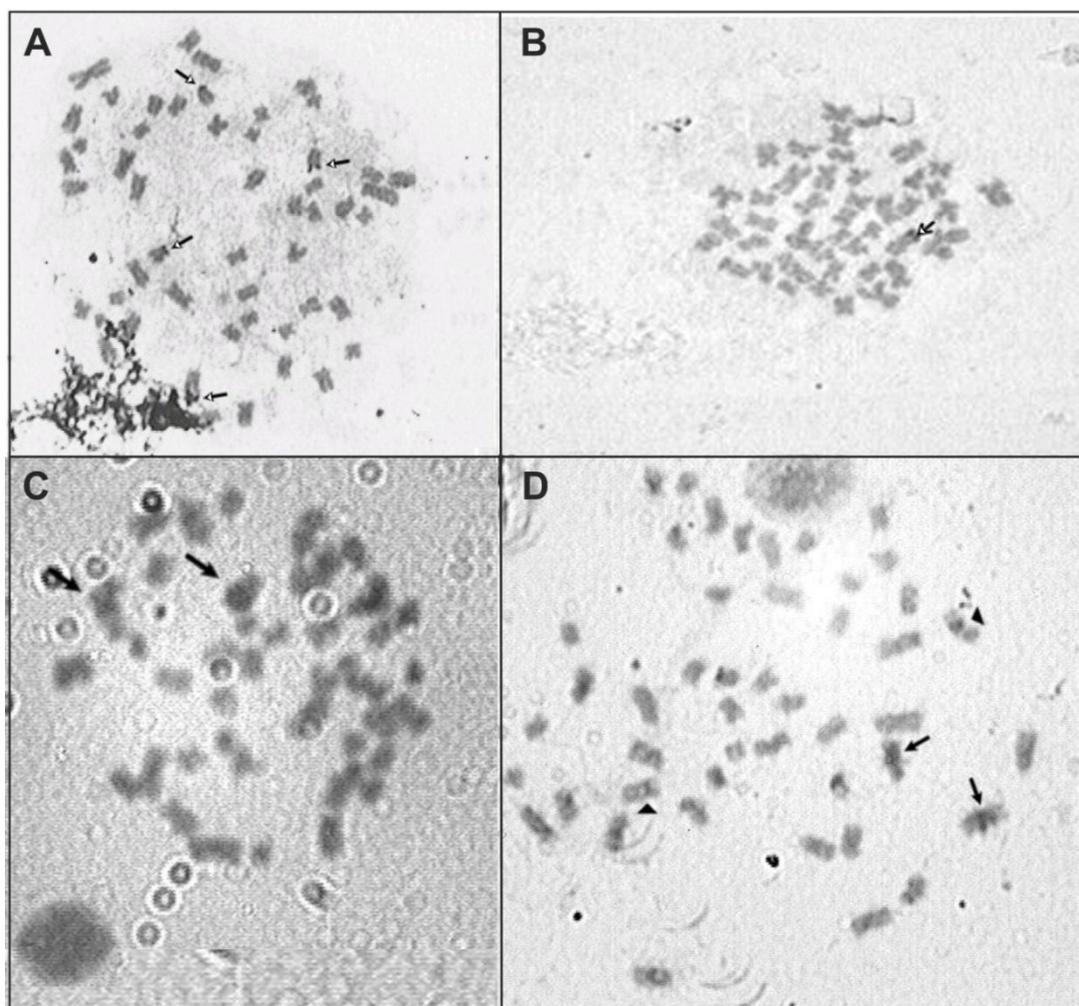


Figura 2 - Ag-NORs de *P. avanhandavae* (A) e *P. gracilis* (B). Setas com ponta clara indicam os sítios Ag-NORs. Padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva em *P. avanhandavae* (C) e *P. gracilis* (D). As setas com ponta escura indicam grandes blocos heterocromáticos em submetacêntricos e as cabeças de seta indicam as marcações intersticiais.

Discussão

A população de *P. avanhandavae* aqui analisada, apresentou o número diplóide de $2n=52$ cromossomos, tais resultados corroboram com resultados já descritos para a população do rio Tibagi por Swarça *et al.* (2003), porém com divergências em relação à fórmula cariotípica, principalmente em relação ao tipo cromossômico encontrado, no presente estudo foi encontrado cromossomos do tipo subteloentrico e acrocêntrico, os quais não foram



descritos para a população do rio Tibagi, essas variações podem ser devido à diferença de condensação nos cromossomos, levando a uma confusa classificação ou poderia ser um resultado de rearranjos cromossômicos que possam ter ocorrido durante a diversificação destas populações.

Em relação a região organizadora do nucléolo a população de *P. avanhandavae* do córrego Água Boa revelou sistema de NOR múltipla com marcações em cromossomos submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos, diferindo da população avaliada por Swarça *et al.* (2003) do rio Tibagi onde foi detectado marcações em um par de cromossomos metacêntricos, após análise por Ag-NOR, Cromomicina A₃ e hibridação *in situ* com sonda DNAr 18S indicando sistema de NOR simples.

Com relação à heterocromatina constitutiva foram observados poucos cromossomos marcados em regiões centroméricas e teloméricas de *P. avanhandavae*, tais resultados já haviam sido descritos por Swarça *et al.* (2003) nesta espécie, e por Vasconcelos e Martins-Santos (2000) em *Pimelodella* sp, mas nesses estudo foi observado um par de cromossomos metacêntricos com marcação bitelomérica (cromossomo marcador), tal resultado não foi encontrado no presente estudo. Portanto, comparando as duas populações de *P. avanhandavae* até agora descritas citogeneticamente, conclui-se que apesar de apresentarem o mesmo número diplóide, variações na macroestrutura cariotípica como: padrão de NORs e heterocromatina constitutiva podem indicar que sejam espécies diferentes, mostrando claramente a necessidade de uma revisão taxonômica deste gênero.

Em contraste a *P. avanhandavae*, a população de *P. gracilis* apresentou um número diplóide diferente com $2n=46$ cromossomos, este número de cromossomos já havia sido constatado em *Pimelodella* sp por Dias e Foresti (1993) e em *P. meeki* por Vidotto *et al.* (2004). Embora o número diplóide seja igual para as três espécies de *Pimelodella*, as constituições cariotípicas são diferentes, com NF de 90 para *P. gracilis* aqui analisada e NF de 92 para *Pimelodella* sp. e *P. meeki* (Dias e Foresti, 1993; Vidotto *et al.*, 2004).

Em *P. gracilis* a impregnação por nitrato de prata relevou sistema de NORs simples, tal resultado corrobora com descrito por Garcia e Almeida-Toledo (2010), em análise de *P. gracialis*, porém diferem no tipo cromossômico marcado. Este sistema já havia sido detectado



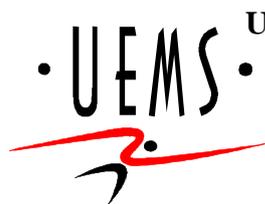
em algumas espécies do gênero *Pimelodella*, como em *P. boshimai* (Roman e Margarido 2002), *P. avanhandavae* (Swarça et al., 2003) e em *P. kronei* (Almeida-Toledo et al., 1992).

Com relação a heterocromatina constitutiva, vários blocos heterocromáticos em regiões centroméricas, teloméricas e intersticiais foram observados em *P. gracilis*, tais resultados já haviam sido encontrados em *P. gracialis* por Garcia e Almeida-Toledo (2010) e por Dias e Foresti (1993) em *Pimelodella* sp, diferenciando-se apenas no número de marcações. A ocorrência de blocos heterocromáticos intersticiais em *Pimelodella* permite diferenciar espécies e populações, tais como *P. gracilis* que, embora tenha apresentado a mesma constituição cariotípica de *P. gracialis*, pode ser distinguida pela presença de vários blocos intersticiais, os quais são encontrados em apenas um par de cromossomos em *P. gracialis*, tal variação leva a hipotetizar, que estas se tratam de espécies diferentes.

O presente trabalho é a primeira descrição cariotípica de *P. gracilis*. Além disso, este estudo mostra que a citogenética pode ajudar esclarecer as relações taxonômicas, já que as duas espécies de *Pimelodella* analisadas, mesmo sendo morfologicamente muito semelhantes, induzindo até há uma classificação taxonômica errônea, conseguem ser muito bem separadas citogeneticamente, tanto pelo número diplóide quanto pela formula cariotípica, mostrando que a citogenética de peixes é uma boa ferramenta de caráter citotaxonômico.

Referências

- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E e Toledo-Filho AS (1992) Cytogenetic analysis of the blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45:255-262.
- Bertollo LAC, Takahashi CS e Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerda* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1: 103-120.
- Bockmann FA e Guazelli GM (2003) Heptapteridae in: check list of Freshwater fishes of south and central America (CLOFFSCA). Edipucrs, 1a ed, Porto Alegre p 406-431.
- Borba RS, Parise-Maltempi PP e Alves AL (2009) Tendência da evolução cariotípica na família Heptapteridae (Teleostei: Siluriformes). *Águas de Lindóia*, 55º congresso de genética.



- Dias AL e Giuliano-Caetano L (2002) Citogenética de alguns grupos de peixes do rio Tibagi. A Bacia do Rio Tibagi. Londrina, EDUEL p 473-529.
- Dias AL e Foresti F (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). Brazil J Genet, 16: 585-600.
- Garcia C (2005) Contribuição aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. São Carlos, SP, dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos.
- Garcia C e Almeida-Toledo LF (2010) Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. Caryologia 63:32-40.
- Griffiths SP (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. Journal of Fish Biology 57: 1453–1464.
- Howell WM e Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia, 81:1014-1015.
- Levan A, Fredga K e Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.
- Pinna MCC (1998) Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi): Historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS and Lucena CAS (eds) Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, EDIPUCRS pp 279-330.
- Roman MP e Margarido VP (2000) Estudos citogenéticos em três gêneros de Siluriformes (PISCES) coletados no rio Iguazu - Quedas do Iguazu Paraná. São Carlos, SP, dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos.
- Swarça AC, Vidotto AP e Dias AL (2003) Cytogenetic characterization of *Pimelodella avanhandave* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná state, Brazil). Caryologia 56:421-425.
- Summer AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromation. Exp. Cell Res 75:304-306.
- Vasconcelos C e Martins-Santos IC (2000) Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). Hereditas 137:103-107.



- Vidotto AP, Swarça AC, Fenocchio AS e Dias AL (2004) Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi river basin (Brazil). *Hereditas* 95: 517-520.
- Vissoto PC, Foresti F e Oliveira C, (1999). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chrom Science* 3:1-7.