

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

AMÉRICO MORAES NETO

INVESTIGAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM BAGRES DE INTERESSE
COMERCIAL E PARA A CONSERVAÇÃO

PONTA GROSSA

2009

AMÉRICO MORAES NETO

INVESTIGAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM BAGRES DE INTERESSE
COMERCIAL E PARA A CONSERVAÇÃO

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Maria João Colares-Pereira

PONTA GROSSA

2009



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 02/2009

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo(a) candidato(a) **AMÉRICO MORAES NETO**.

Aos vinte e cinco dias do mês de setembro de dois mil e nove, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **AMÉRICO MORAES NETO**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (orientador), Dr^a Daniele Aparecida Matoso e Dr. Cláudio Zawadzki. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao(a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Investigação da Variabilidade Genética de Grandes Bagres de Interesse Comercial e para a Conservação**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora, e por mim Zoli Catarina Zacharias de Oliveira, na qualidade de secretária.

Ponta Grossa, 25 de setembro de dois mil e nove.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof^a Dr^a Daniele Aparecida Matoso

Prof. Dr. Cláudio Zawadzki

Ficha catalográfica elaborada pelo setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

A811e Moraes Neto, Américo
Investigação da variabilidade genética em bagres de
interesse comercial e para conservação / Ponta Grossa,
2009.
68 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas),
Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade
Estadual do Centro - Oeste – UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria João Colares-Pereira

1. Biologia evolutiva. 2. Macroestrutura cariotípica. 3.
Siluriformes – estudo. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Colares -
Pereira, Maria João. III. Mestrado em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV.T.

CDD: 597.49

Dedico esta dissertação:

Àquele que por um acaso do destino foi único na minha vida, pessoa cujo nome carrego, que me ensinou a valorizar minha família, me ensinou a amar a Sociedade Esportiva Palmeiras e a olhar sempre para frente... meu querido avô Américo Moraes... que me deu carinho e torceu por mim até 31 de julho de 2008 quando, no meio do meu mestrado, partiu para o céu. Por isso, vovô, dedico esta dissertação ao senhor! Sinto saudades...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que participaram, direta ou indiretamente, da realização desta dissertação e que contribuíram para além da minha formação profissional. Além das instituições que financiaram este projeto.

Primeiramente quero agradecer e deixar bem clara minha admiração pelo meu orientador professor Dr. Roberto Ferreira Artoni, que foi a pessoa que me aceitou no Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG em janeiro de 2003 para o estágio voluntário. Obrigado pelo apoio, pelas broncas, conversas, confiança que o senhor me passou durante esses 7 anos, e, sobretudo pela sua amizade e companhia nas partidas de futebol. Professor não é aquele que passa o ensinamento nu e cru para os seus alunos, mas aquele que se preocupa com a formação e bem estar destes, sempre respeitando os limites e sabendo extrair o melhor de cada um, é assim que o vejo professor Roberto. Também te admiro por uma coisa que a professora Dr(a). Daniele Matoso disse, pela sua capacidade em enxergar as verdades escondidas nas pessoas.

A propósito, Daniele, você e a minha colega de mestrado Maelin Silva são as próximas pessoas que gostaria de agradecer em especial. Primeiro de tudo obrigado por serem minhas amigas e não apenas colegas. Quero agradecer também pela ajuda na bancada, pela paciência, pela preocupação comigo, enfim, pela amizade super-sincera que sempre vivemos. Amigo não é aquele que diz as coisas para agradar, mas aquele que diz as coisas pensando no bem do outro, sem apedrejar.

Também quero agradecer ao técnico do laboratório Miguel A. de Carvalho, a secretária do PPG em Biologia Evolutiva Zoli C. Zacarias, professor Dr. Marcelo R. Vicari e a professora Dr(a). Mara C. de Almeida Matiello por tudo que fizeram por mim durante esses 7 anos, não só por esses 2 anos de mestrado. Agradeço a você, Miguel, pela ajuda durante as coletas, preparação e aquisição de materiais, pelas risadas e conversas que tivemos. Sempre aprendi muito com sua simplicidade em resolver os problemas e em levar a vida, amigão. Agradeço a você, Zoli, por ter tido paciência comigo esse tempo todo e por sempre “quebrar uns galhos” para mim. Grande Marcelo, obrigado pelas ajudas na bancada (em especial com o FISH), pela discussão de artigos, opiniões, jogos de futebol, conversas amigáveis e risadas que demos juntos. Professora Mara, te agradeço pelos momentos de descontração, pelas

opiniões, ensinamentos, discussão de artigos e por me fazer pensar quando errei e quando não errei. Há 2 espécies de chatos: os chatos propriamente ditos e os amigos, que são os nossos chatos prediletos!

Não poderia deixar de agradecer as minhas ex-colegas de laboratório Ms. Leila B. Ribeiro e Maria Carolina C. M. Svidnicki pela ajuda que me deram durante o TCC e o mestrado, abrindo peixes, montando cariótipos e fotografando metáfases. Obrigado, Leila, por sua amizade! Também quero agradecer aos meus colegas de mestrado João Felipe M. Sant'Anna, Aline Margraf, Michelle O. Schemberger, Stella Becher e Karin C. Schoveigert, Helena F. M. Pistune, Tatiana C. Machado, Simoni Braatz, aos colegas que conviveram comigo no laboratório e professores pelos ensinamentos, momentos de descontração e pelas pedreiras que enfrentamos juntos durante esses anos. Em especial quero agradecer ao professor Dr. Marcos Pileggi pelas conversas agradáveis, pelas piadas, pelas risadas, pelos jogos de futebol e pelos conselhos e ensinamentos.

Quero agradecer também a professora Dr(a). Maria João Collares-Pereira, aos amigos e ex-colegas de laboratório José Beirão, Ana Rita Monteiro, Dr(a). Marta Gromincho, Carla A. Pereira, Luís Marques, Romina Lopes Henriques, Cláudia A. S. Carvalho, Maria Ana Aboim, Dr. Daniel Schaumann, dona Branca do Nascimento Firmino, dona Maria Rodrigues, aos amigos da residência universitária Luís de Camões por terem me recebido tão bem em Lisboa. Em especial quero agradecer aos colegas gajos e gajas da residência: Rui Cordeiro, Silvia Pinto, Patrícia Sá, Manhal, Hugo Silva, Vitor Lopes, José G. da Silva "timorense" (ex-colega de quarto), Cláudia, Edgar Ribeiro que me ajudaram a sentir menos saudades da vida no Brasil e me fizeram sentir em família. Aliás, se não fosse o Hugo estaria perdido em Portugal até hoje. Não posso deixar de agradecer também ao professor Dr. Luís A. Kioshi Aoki Inoue por conseguir para mim contato na Holanda, a professora Dr. Aurélia Mazon e seu marido Roel por me dar asilo, a amigo Jan Wienholts que me recebeu em Amsterdam, a amiga e ex-colega de laboratório Dowty Movita, e aos professores Dr. Geert F. Wiegertjes e Dr. J. Komen por me receberem na Universidade de Wageningen. Cronologicamente foi apenas uma semana, mas no aspecto pessoal foi uma experiência de vida incrível que jamais vou esquecer!

Outros que não poderia deixar de citar, que me ajudaram direta ou indiretamente: Fabrício V. Furtado "Vermeio" e família, Gabriel "Pinguço" Farhat, José

Ivan V. de Lima “Tiko”, Sandrey “Mineiro” Freitas , Felipe “carioca” Moreira, aos irmãos Felipe e Gustavo Migliorini, Siara Silvestri, Luciana Matsuguma, Silmara C. Silva e família, Danilo A. Zanin e família, Geovan Corrêa, família Artoni, família Svidnicki, Nalini D. Josviak, Dayane Molin, Fernanda D. do Prado, George Yasui, Loren C. Ribeiro, Aryelle Navarro, Samara Schmidt, Eric Marson, Fabiana Artoni, Eduardo Paschoal, Denílton “zulu” Mazoni, Amabile Satiro, Adriana Carareto e família, Caroline Azevedo, Lilian Lee, Diego Gualda, Marco Crespo, Lucas Vicente, Ana Vasic, Guilherme Sobreira, Mariana Ribeiro, Bruno Sanson, família Arcaro, Karolina Kazmierczak, Milton Scheleski de Sousa e família, Camila Cavalcanti, minha psicóloga Edith Pellanda e colegas do futebol e do judô (em especial ao sensei Lauro Azuma). Obrigado por tudo, pelos momentos de risada, de festa, pelos jogos de futebol, pelas conversas amigáveis, pelo carinho, por me receberem em suas casas, por terem conseguido alguns artigos para mim, por terem me ajudado na correção da minha dissertação ou por terem me emprestado seu computador. Quero que vocês saibam o quanto são especiais para mim e o quanto estou grato!

Estou extremamente grato aos amigos da COPEL Éder Gomes, Luís A. M. Ludwig e demais funcionários pela ajuda e pelos exemplares de subúrbio do Iguaçu, lamaris e chorão. Agradeço pela ajuda dos amigos Thiago T. Ushizima e demais funcionários da Empresa MAR & TERRA por me receberem para estágio e ceder exemplares de cachaca e ponto e vírgula. Obrigado, amigos do LAPAD (Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce) por me receberem no laboratório de vocês, em especial quero agradecer ao Dr. Marcos Weingartner pela paciência e camaradagem. Estou grato amigos da UNESP de Botucatu, em especial ao Dr. Márcio C. Chiacchio por me receber em sua casa. Novamente quero agradecer ao meu colega João Felipe M. Sant’Anna por providenciar exemplares de jurupensém. E ao professor Dr. Orlando Moreira-Filho da UFSCAR pelos surubins da Paraíba. Enfim, as Instituições FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA e CNPQ por financiarem este projeto.

Finalmente, quero agradecer a toda minha família (mesmo os que eu não vou citar aqui!), porque sem eles nada teria acontecido. Eles são os maiores financiadores deste trabalho e meus maiores motivos para seguir em frente sempre! Obrigado Américo Moraes Jr (papai), Heleny U. B. Moraes (mamãe), Lariza M. B. Moraes (irmãzinha leitoa), Valdir U. B. Moraes (irmãozinho marechal), dona Anísia C. Genovez (vózinha Véia Anísia), dona Genira Ramos Moraes (vózinha véia Genira),

Américo Moraes (vovozinho veio Américo), Bruno Ubaldo (primo pipoco do trovão), Thiago B. F. Peres (primo cabeção), Adhemar B. F. Peres (primo que gosta de um tempero verde, hehe), Diego B. F. Peres (primo seboso), dona Hilda U. de Brito (tia danada, hehe), Gisele Ramalho (prima gaja gira), Valdir Pimpinati (tio churrasqueiro), dona Solange A. Pimpinati (tia linguaruda, hehe), Valdir Pimpinati Jr (primão), Fabiano Pimpinati (primo zóio), Diego Campanini de Almeida (primo palmeirense revoltado), Marina Ramos (futura prima?), Elisônia “Soninha” A. Gonçalves (mais do que uma amiga, minha mãe aqui em Ponta Grossa todos esses anos)... obrigado por vocês existirem na vida!

"Que nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistas do que parecia impossível."

CHALIE CHAPLIM – ATOR E DIRETOR

"Aquele que não consegue mudar seu pensamento jamais conseguirá mudar coisa alguma. E, por conseguinte jamais progredirá."

MUHAMMAD ANWAR EL-SADAT – NOBEL DA PAZ 1978

"Você pode pensar muitas coisas. Pode achar que nada supera o capitalismo, ou ter certeza que o comunismo é a única saída. Você pode pensar que existem vários deuses, um, nenhum ou que eles eram astronautas. Você pode ter várias teorias da conspiração. Pode saber quem matou Kennedy. Acreditar que a viagem a lua foi uma grande farsa ou que Elvis está vivo. Você pode pensar que a televisão é mais um eletrodoméstico na sua vida ou que é uma das maiores invenções da humanidade. Você pode pensar muitas coisas. A única coisa que você não pode fazer é não pensar!"

CANAL FUTURA - FILME PUBLICITÁRIO "PENSAMENTOS"

"Até hoje os cientistas discutem como a vida começou. Se a opção sexual é definida pela genética. E porque você boceja quando alguém boceja. Os biólogos querem entender como os pássaros migram. E os nutricionistas se o ovo faz mal a saúde. Como você pode ver, não são as respostas que movem o mundo. São as perguntas!"

CANAL FUTURA - FILME PUBLICITÁRIO "PERGUNTAS"

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

JÚLIO VERNE - ESCRITOR

"Algumas pessoas dizem que conhecimento é poder, mas isso não é verdade. Caráter é poder."

SHRI SATHYA SAI BABA – GURU INDIANO

"O conformismo é o carcereiro da liberdade e o inimigo do crescimento."

JOHN F. KENNEDY – EX-PRESIDENTE AMERICANO

"Quando perdemos o direito de ser diferentes, perdemos o privilégio de ser livres."

CHARLES EVANS HUGHES – POLITICO AMERICANO

"A vida bate em todos nós. Alguns desistem. Outros lutam. Alguns aprendem a lição e seguem em frente. Eles recebem satisfeitos os trancos da vida... Se você aprender essa lição, você se tornará um jovem sábio, rico e feliz. Se você não aprender, passará culpando a vida, um emprego, um baixo salário ou seu chefe pelos seus problemas."

ROBERT T. KIYOSAKI – LIVRO "PAI RICO, PAI POBRE"

"Não importa o quanto você bate, mas sim o quanto agüenta apanhar e continuar. O quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha."

FILME ROCKY BALBOA

"O ponto mais alto das operações militares consiste em simular-se a aceitação dos desígnios do adversário."

SUN TSU – ARTE DA GUERRA

"As pessoas que mais julgam os outros são talvez as que mais erram e tentam procurar a justificação dos seus erros pros outros."

PATRÍCIA SÁ – EX-COLEGA DE LISBOA

RESUMO

Considerando-se a diversidade ictiofaunística neotropical, estudos sobre aspectos de biologia evolutiva são ainda pouco expressivos. Em contraste, o forte impacto ambiental causado pela ação humana tem refletido negativamente sobre as espécies nativas, muitas ainda desconhecidas da ciência. O conhecimento da variabilidade genética intra e inter populacional é de extrema importância para o planejamento tanto da piscicultura quanto para a conservação das populações naturais. No presente trabalho foram analisados citogeneticamente, sobretudo aplicando técnicas de citogenética molecular, 29 exemplares de *Pseudoplatystoma reticulatum* (rio Paraguai, MS), 14 espécimes de *Pimelodus britskii* (rio Iguaçu, PR), 6 indivíduos de *Sorubim lima* (rio Paraguai, MS), e 10 exemplares de *Steindachneridion parahybae* (rio Paraíba do Sul, SP). Os dados obtidos revelaram $2n = 56$ cromossomos para todas as espécies analisadas, fórmulas cariotípicas distintas, compostas basicamente de cromossomos de dois braços e características próprias em relação à localização das RONS através da impregnação pelo íon Ag^+ e pela hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S e 18S. Com exceção de *P. britskii*, que apresentou RONS na região terminal do braço longo, todas as outras espécies apresentaram marcações das Ag^+ RONS em posição terminal no braço curto. Outra característica peculiar de *P. britskii* foi a localização sintênica de um dos sítios de DNAr 5S e o 18S em cromossomos subtelocêntricos, atributo que pode ser considerado uma apomorfia em relação a outros pimelodídeos estudados. O presente estudo visa contribuir com o acervo de dados citogenéticos a respeito dos Siluriformes em estudo, considerando-se que muitas das informações correntes tratam-se das primeiras caracterizações da macroestrutura cariotípica das espécies de peixes analisadas.

Palavras-chave: *Pseudoplatystoma*. *Pimelodus*. *Sorubim*. *Steindachneridion*. cromossomos.

ABSTRACT

Currently, studies of aspects of evolutionary biology in neotropical fishes diversity are still lacking, despite the strong environmental impact caused by human action that has had a negative effect in native species, many of which probably still unknown to science. The knowledge of genetic variability within and between populations is of utmost importance for planning of both fish breeding and conservation of natural populations. In the present study we have analyzed, especially through molecular cytogenetics techniques, 29 specimens of *Pseudoplatystoma reticulatum* (Paraguay river, state of Mato Grosso do Sul), 14 specimens of *Pimelodus britskii* (Iguaçu river, state of Paraná), 6 specimens of *Sorubim lima* (Paraguay river, state of Mato Grosso do Sul) and 10 specimens of *Steindachneridion parahybae* (Paraíba do Sul river, state of São Paulo). Results indicate $2n = 56$ chromosomes for all species, a distinct karyotype formula composed mainly of biarmed chromosomes. Other particular features were found, regarding the location for Ag^+ NORs and fluorescent *in situ* hybridization with 5S and 18S probes. Except *P. britskii*, which showed NORs in the terminal region of the long arm, all species showed Ag^+ NORs in the terminal position of the short arm. Another peculiar feature of this fish was the co-localization of one of the 5S and 18S rDNA sites, which could be considered an apomorphy to the others Pimelodidae studied. The present work aims to contribute to the collection of data on the cytogenetics studies of Siluriformes, considering that much of the here presented information are the first characterization of the karyotype macro-structure of analysed fishes.

Keywords: *Pseudoplatystoma*. *Pimelodus*. *Sorubim*. *Steindachneridion*. chromosomes.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** ESPÉCIES DE PIMELODÍDEOS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO. A) *PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM*, B) *PIMELODUS BRITSKII*, C) *SORUBIM LIMA* E D) *STEINDACHNERIDION PARAHYBAE* 11
- FIGURA 2.** CARIÓTIPO EM GIEMSA (A), BANDA C (B), FISH COM Sonda 18S (SETAS GROSSAS) E 5S (SETAS FINAS) (C) E AG⁺ RON (D) DE *PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM* DO RIO PARAGUAI (MS). m = METACÊNTRICO; sm = SUBMETACÊNTRICO; st = SUBTELOCÊNTRICO; a = ACROCÊNTRICO.. 30
- FIGURA 3.** CARIÓTIPO EM GIEMSA (A), BANDA C (B), FISH COM Sonda 18S (SETAS GROSSAS) E 5S (SETAS FINAS) (C) E AG⁺ RON (D) DE *PIMELODUS BRITSKII* DO RIO IGUAÇU (PR). m = METACÊNTRICO; sm = SUBMETACÊNTRICO; st = SUBTELOCÊNTRICO; a = ACROCÊNTRICO 31
- FIGURA 4.** CARIÓTIPO EM GIEMSA (A), BANDA C (B), FISH COM Sonda 18S (SETAS GROSSAS) E 5S (SETAS FINAS) (C) E AG⁺ RON (D) DE *SORUBIM LIMA* DO RIO PARAGUAI (MS). m = METACÊNTRICO; sm = SUBMETACÊNTRICO; st = SUBTELOCÊNTRICO; a = ACROCÊNTRICO. 32
- FIGURA 5.** CARIÓTIPO EM GIEMSA (A), BANDA C (B), FISH COM Sonda 18S (SETAS GROSSAS) E 5S (SETAS FINAS) (C) E AG⁺ RON (D) DE *STEINDACHNERIDION PARAHYBAE* DO RIO PARAÍBA DO SUL (SP). m = METACÊNTRICO; sm = SUBMETACÊNTRICO; st = SUBTELOCÊNTRICO; a = ACROCÊNTRICO... 33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO.....10

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS CARIOTÍPICAS DAS ESPÉCIES ESTUDADAS. NF = NÚMERO FUNDAMENTAL (NÚMERO DE BRAÇOS CROMOSSÔMICOS); Ag⁺ RONS = MARCAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS PELA PRATA; SÍTIOS 18S = LOCALIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DNA_R 18S; SÍTIOS 5S = LOCALIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DNA_R 5S; BANDA-C = LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA HETEROCROMATINA; M = CROMOSSOMO METACÊNTRICO; SM = CROMOSSOMO SUBMETACÊNTRICO; ST = CROMOSSOMO SUBTELOCÊNTRICO; A = CROMOSSOMO ACROCÊNTRICO; P = BRAÇO CURTO; Q = BRAÇO LONGO; CENT. CROM. = CENTRÔMERO DOS CROMOSSOMOS; TEL. CROM. = TELÔMERO DOS CROMOSSOMOS.....29

ANEXOS

ANEXO I. PARECER 02/2008 (PROTOCOLO 04509/08) DA SUBCOMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.....	49
ANEXO II. LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO EMITIDA PELO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA (PROC. NO. 15115-1)	50
ANEXO III. KARYOTYPIC VARIABILITY IN <i>IHERINGICHTHYS LABROSUS</i> (TELEOSTEI, PIMELODIDAE) FROM THE TIBAGI RIVER BASIN (PARANA STATE, BRAZIL) GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH(2008), V.7,N. 3, PAG. 718-724	52
ANEXO IV. ESTIMULAÇÃO DE MITOSES.....	63
ANEXO V. PREPARAÇÃO DIRETA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS DE PEIXES.....	63
ANEXO VI. DETECÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (RONS) ATRAVÉS DA IMPREGNAÇÃO COM NITRATO DE PRATA (Ag^+NO^3).....	64
ANEXO VII. BANDAMENTO C	65
ANEXO VIII. LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE SONDAS DE DNA _r POR HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH, FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION).....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	A ICTIOFAUNA NEOTROPICAL E A DIVERSIDADE CARIOTÍPICA.....	01
1.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ORDEM DOS SILURIFORMES.....	03
1.3	ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM SILURIFORMES.....	04
2	OBJETIVOS.....	08
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	09
3.2	METODOLOGIAS	12
4	RESULTADOS.....	14
4.1	CAPÍTULO ÚNICO - NOVOS DADOS SOBRE A CITOGENÉTICA DE BAGRES DA REGIÃO NEOTROPICAL (TELEOSTEI: SILURIFORMES: PIMELODIDAE).....	15
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
5.1	DISCUSSÃO GERAL	34
5.2	CONCLUSÃO	38
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7	ANEXOS.....	49

1. Introdução

1.1 A ictiofauna neotropical e a diversidade cariotípica

De acordo com ARTONI et al. (2000), a ictiofauna dulcícola mais rica e diversificada do planeta encontra-se na região Neotropical. O inventário ictiológico das espécies de peixes neotropicais ainda é bastante incompleto o que torna o diagnóstico da diversidade objeto de estudo ainda em aberto. Segundo VARI e MALABARBA (1998), aproximadamente 25% da diversidade mundial de peixes está localizada nessa região, cerca de 8.000 espécies. Mais recentemente, REIS et al. (2003), estimaram em aproximadamente 4.475 espécies válidas e 1.550 espécies não descritas, totalizando mais de 6.000 espécies de peixes para a região Neotropical.

Os peixes constituem um interessante grupo de estudo tanto do ponto de vista genético, como também sob a ótica evolutiva e ecológica. Estudos citogenéticos neste grupo têm aumentado bastante, uma vez que cerca de 2.600 espécies de todo mundo possuem seu cariótipo descrito segundo PISANO et al. (2006), dos quais, 921 correspondem a espécies neotropicais, somando aproximadamente 252 gêneros distribuídos em 44 famílias (OLIVEIRA et al., 2000). Em termos cariotípicos, diferentes particularidades já foram relatadas neste grupo, o que justifica o aumento nas pesquisas envolvendo estes animais. Pelo fato dos peixes encontrarem-se restritos ao ambiente aquático desde sua origem no Cambriano a aproximadamente 510 milhões de anos, diferentemente de outros grupos vertebrados, eles apresentam maiores restrições quanto a sua dispersão e intensa relação com a história do seu ambiente. No caso dos peixes

dulcícolas, seu confinamento aos sistemas hidrográficos, resulta em um estreito relacionamento entre a história das bacias, tempo evolutivo e a história natural-evolutiva destes animais (ARTONI et al., 2009).

As informações citogenéticas disponíveis atualmente para os peixes neotropicais dulcícolas revelam uma variabilidade cromossômica extraordinária, além de permitirem a identificação das principais tendências evolutivas e de algumas características citogenéticas próprias desta fauna (ALMEIDA TOLEDO et al., 2000). Os dados não se restringem somente a caracterização do número cromossômico e do cariótipo, mas consideram também informações sobre a localização das regiões organizadoras nucleolares (RONS), o padrão de distribuição da heterocromatina, a presença de cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais diferenciados.

De acordo com OLIVEIRA et al. (2000), existe uma grande diversidade cariotípica entre os peixes neotropicais, com cariótipos constituídos de 20 cromossomos como observado em *Pterolebias longipinnis*, e cariótipo composto por 134 cromossomos, em *Corydoras aeneus*. Cromossomos sexuais foram encontrados em 40 espécies e 29 possuem cromossomos supranumerários; o conteúdo de DNA de 56 espécies variou de $1,04 \pm 0,09$ pg, em *Corydoras* cf. *simlatus* ($2n=62$), a $8,75 \pm 1,50$ pg, em *Corydoras metae* ($2n=92$). Considerando-se o tamanho da ictiofauna dulcícola Neotropical, segundo ARTONI et al. (2000), tem-se que o número de espécies citogeneticamente descritas é muito pequeno, contrastando com a biodiversidade regional observada, contudo, tendências evolutivas podem ser propostas para vários grupos de espécies.

1.2 Características gerais da ordem dos Siluriformes

Os Siluriformes são conhecidos popularmente como peixes de couros, bagres, peixes gato e cascudos. São peixes de extrema importância econômica, tanto para pesca esportiva e aquariofilia, quanto para alimentação de subsistência das comunidades ribeirinhas.

A ordem dos Siluriformes pertence à superordem Ostariophysi e é dividida em três subordens: Eusiluroidea (família Pimelodidae), Rhamdioidea (família Rhamdiidae), Loricarioidea (família Loricariidae). É uma das ordens mais diversificadas junto com a ordem dos Characiformes e compreende um grupo de peixes formado por cerca de 134 famílias, 132 gêneros e mais de 2400 espécies (REIS et al., 2003). A maioria de seus integrantes habita águas doces neotropicais, embora exista também uma família cuja ocorrência é predominante na América do Norte, Ictaluridae (GREENWOOD et al., 1966), e outras duas com representantes de água salgada, Ariidae e Plotosidae (LOWE-MCCONNEL, 1975). Não obstante, segundo DE PINNA (1998), ocorrem algumas famílias em regiões neotropicais que apresentam espécies estuarinas, Auchenipteridae e Aspredinidae. A família Pimelodidae é considerada uma das mais diversificadas entre os Siluriformes neotropicais, segundo LUNDBERG et al. (1991). Dentro desta família, o “subgrupo” Sorubiminae compõe-se de 10 gêneros e aproximadamente 22 espécies; notáveis entre esses, pelo seu grande porte, são as espécies dos gêneros *Brachyplatystoma* (piraíbas e douradas), *Pseudoplatystoma* (pintados e surubins) e *Zungaro* (jaú) (BRITSKI, 1972).

Os Siluriformes têm características morfológicas singulares e por isso são facilmente identificáveis. Segundo BRITSKI et al. (1988), são peixes de corpo nú, sempre envolto por uma pele espessa ou coberta, integralmente ou parcialmente, por placas ósseas. As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal portador de um acúleo forte e pungente em alguma espécie. A nadadeira adiposa encontra-se presente e, em geral, é bem desenvolvida; enquanto a nadadeira caudal apresenta forma variável. Normalmente são encontrados três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974).

As espécies de Siluriformes preferem águas escuras, apresentando os mais variados tamanhos, ocupando diversas posições na cadeia alimentar, têm hábito sedentário, noturno ou crepuscular, escondendo-se entre as pedras e a vegetação, no fundo dos rios ou em poços (BRITSKI, 1981). Fazem uso dos seus barbilhões sensitivos para se alimentar de vermes, insetos e peixes (STERBA, 1973).

1.3 Estudos citogenéticos em Siluriformes

Atualmente, dados citogenéticos são conhecidos para aproximadamente 318 espécies de Siluriformes (para revisão consultar <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>, OLIVEIRA et al., 2009). Estudos citogenéticos têm apontado para um padrão de evolução cariotípica do tipo conservado na família Heptapteridae (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992; BORIN e MARTINS-SANTOS, 2004) e variações do número diplóide têm sido conferidas a cromossomos supranumerários ou cromossomos B (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1990; ALMEIDA-TOLEDO et al., 1992; DIAS e FORESTI, 1993;

ABUCARMA e MARTINS–SANTOS, 2001; BORIN e MARTINS–SANTOS, 2004). Rearranjos cromossômicos do tipo inversões pericêntricas e translocações robertsonianas têm sido apontadas como responsáveis pelos polimorfismos cromossômicos intrapopulacionais e alterações do número fundamental entre os pimelodídeos (GIULIANO-CAETANO, 1998; VASCONCELOS e MARTINS-SANTOS, 2000), embora as fissões e fusões sejam significativas entre os loricariídeos (ARTONI e BERTOLLO, 2001).

GARCIA e MOREIRA-FILHO (2005), analisaram três espécies de *Pimelodus* (*Pimelodus fur*, *Pimelodus maculatus* e *Pimelodus* sp.) da bacia do rio São Francisco e encontraram $2n=54$ cromossomos para a espécie *Pimelodus fur*, indicando eventos de fusão e translocação como prováveis causas para a ocorrência desse número diplóide menor que $2n=56$ cromossomos, o mais freqüente e conservado neste gênero. Esses autores sugerem que o número diplóide 56 cromossomos seja considerado uma plesiomorfia dentro do gênero *Pimelodus* e que números diplóides $2n=54$ para *Pimelodus fur* e $2n=58$ para *Pimelodus blochii* sejam divergências dessa plesiomorfia (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000). GARCIA e MOREIRA-FILHO (2005) ainda atribuem um papel significativo na diversificação cariotípica dos pimelodídeos às inversões paracêntricas. Em outros Siluriformes, a exemplo da família Loricariidae, ganham destaque na diversificação cariotípica eventos robertsonianos como fissões e fusões cêntricas.

O estudo das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) tem se intensificado nos últimos anos em Siluriformes. Estas regiões praticamente não diferem entre os peixes de couro, sendo constante a presença de RON simples nas regiões terminais de

um único par cromossômico, onde marcações intersticiais são mais raras (FENOCCHIO et al., 2003). OLIVEIRA e GOSZTONYI (2000) argumentam que RON simples localizada em posição terminal deva representar o estado ancestral para este caráter entre os Siluriformes. Regiões organizadoras de nucléolo com heteromorfismo de tamanho têm sido reportadas para espécies dos gêneros *Pimelodus* (GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2005; SWARÇA et al., 2003), para as espécies *Zungaro zungaro* (SWARÇA et al., 2001), *Steindachneridion* sp. e *Steindachneridion scripta* (SWARÇA, 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (SWARÇA et al., 2005), *Iheringichthys labrosus* (CARVALHO e DIAS, 2007) entre os outros. Esta parece ser uma situação comum entre os peixes neotropicais, de modo geral, devido a eventos de amplificação gênica (cístrons) como duplicações e deleções (GOLD, 1990), *crossing-over* desigual ou troca de cromátides irmãs (PENDÁS, 1993) ou ainda re-replicação (ARTONI et al., 2006).

Sistemas de cromossomos sexuais são raros neste grupo de peixes, sendo descrito em somente 10 espécies de Siluriformes até o momento. Entre os Pimelodidae, apenas *Steindachneridion melanodermatum*, referido como *Steindachneridion* sp. por SWARÇA et al. (2006), apresenta um aparente sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY onde o cromossomo Y é proposto por estes autores como um alossomo putativo. Este sistema está sob investigação e possivelmente reflita um estado heteromórfico de um cromossomo em que seqüências *Alu I*, não heterocromáticas, estejam amplificadas indistintamente entre machos e fêmeas (MATOSO et al., em preparação).

A localização da heterocromatina pelo método de bandamento C tem se mostrado bastante útil na citogenética de peixes, permitindo inferências evolutivas e em alguns

casos para a taxonomia (ARTONI et al., 2000). Contudo, parece ser característico em Siluriformes pouca quantidade de heterocromatina constitutiva (FENOCCHIO e BERTOLO, 1992).

No que tange as técnicas citogenéticas mais recentes, tais como a hibridação *in situ* fluorescente, os dados citogenéticos envolvendo Siluriformes ainda não são numerosos. MARQUES (2002) determinou a localização dos genes 5S e 18S de *Conorhynchos conirostris* em cromossomos distintos. SWARÇA et al. (2003), em estudos com genes 5S em *Steindachneridion scripta* e *Steindachneridion melanoderdatum* (citado como *Steindachneridion* sp.) averiguaram marcações em cromossomos diferentes dos cromossomos que apresentaram a RON. Em estudos recentes envolvendo a espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (SWARÇA et al., 2005), a FISH com sonda de DNA_r 18S confirmou a localização de RON simples em um par de cromossomos. Já o DNA_r 5S foi localizado em cromossomos distintos da RON. Estes dados sugerem que a sintenia entre genes 5S e 18S não deve ser uma situação comum entre os Siluriformes, especialmente entre os Pimelodidae.

2. Objetivos

O conhecimento acerca da variabilidade genética intra e interpopulacional é de extrema importância para o planejamento e sucesso tanto da piscicultura quanto para programas que visam à conservação das populações naturais. Assim, o trabalho teve como objetivo:

1. Caracterizar citogeneticamente as espécies *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Pimelodus britskii*, *Sorubim lima* e *Steindachneridion parahybae*. Sobretudo aplicando técnicas de citogenética molecular;
2. Comparar os dados obtidos com aqueles já descritos na literatura enfatizando aspectos da diversificação e evolução cariotípica das espécies de peixes neotropicais alvo do presente estudo.

3. Material e Métodos

3.1. Material biológico

Foram analisados citogeneticamente 29 exemplares de *Pseudoplatystoma reticulatum* (19 machos, 10 fêmeas; Figura 1a) criados em cativeiro na Estação de Piscicultura do Projeto Pacu, município de Terenos (Mato Grosso do Sul) a partir de matrizes provenientes do rio Paraguai (Mato Grosso do Sul), 14 espécimes de *Pimelodus britskii* (5 machos, 9 fêmeas; Figura 1b) originários da Estação de Hidrobiologia da Usina Ney Braga da Companhia Paranaense de Energia Elétrica – COPEL, município de Candói (Paraná) a partir de matrizes provenientes do rio Iguaçu (Paraná), 6 indivíduos de *Sorubim lima* (1 macho, 5 fêmeas; Figura 1c) provenientes da Estação de Piscicultura BR-FISH, município de São João da Boa Vista (São Paulo) a partir de matrizes do rio Paraguai (Mato Grosso), e 10 exemplares de *Steindachneridion parahybae* (6 machos, 4 fêmeas; Figura 1d) criados em cativeiro na Estação de Piscicultura da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL), município de Paraibuna (São Paulo) a partir de matrizes do rio Paraíba do Sul (Figura 1).

As espécies foram identificadas taxonomicamente pelo Dr. O. A. Shibatta e exemplares representativos de cada espécie foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, PR) com os seguintes números de tombo: *Pseudoplatystoma reticulatum* (MZUEL 5228), *Pimelodus britskii* (MZUEL 5230), *Sorubim lima* (MZUEL 5232) e *Steindachneridion parahybae* (MZUEL 5231).

A Tabela 1 resume as informações sobre o material estudado:

Tabela 1. Caracterização das espécies analisadas no presente estudo.

Ordem	Família	Espécies	Nome popular	Local de coleta	Nº de exemplares
Siluriformes	Pimelodidae	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	Cachara	Rio Paraguai	19♂ e 10♀
		<i>Pimelodus britskii</i>	Chorão	Rio Iguaçu	5♂ e 9♀
		<i>Sorubim lima</i>	Jurupensém	Rio Paraguai	1♂ e 5♀
		<i>Steindachneridion parahybae</i>	Surubim da Paraíba	Rio Paraíba do sul	6♂ e 4♀
TOTAL					59

O presente estudo foi aprovado como parte do projeto “Biodiversidade, citogenética e preservação dos peixes dos Campos Gerais II” pelo parecer 02/2008 (protocolo 04509/08) da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Anexo I) e licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc. no. 15115-1) (Anexo II).

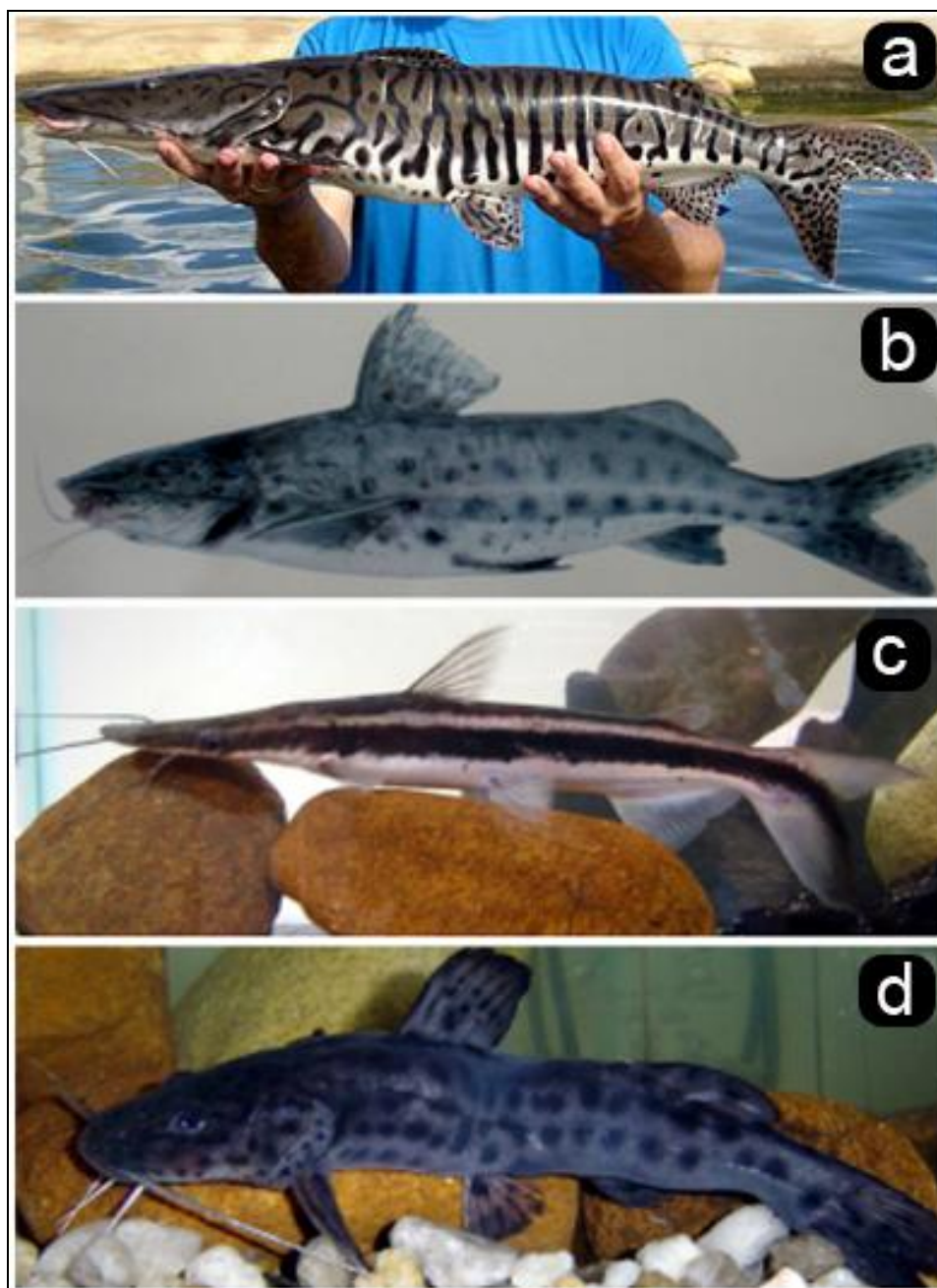


Figura 1. Espécies de pimelodídeos analisadas no presente estudo: a) *Pseudoplatystoma reticulatum*, b) *Pimelodus britskii*, c) *Sorubim lima* e d) *Steindachneridion paraguayae*.

3.2. Metodologias

Na obtenção de preparações citogenéticas das amostras foram adaptados os métodos de estimulação mitótica descrito por OLIVEIRA et al. (1988). Para tal, foi aplicada em cada exemplar uma injeção intramuscular de solução de fermento biológico com sacarose, e em seguida repouso de 48 horas (Protocolo Anexo IV).

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo* foi a descrita por BERTOLLO et al. (1978) e utilizada com algumas adaptações. Primeiramente foi injetada colchicina em cada exemplar, após 45 min de repouso o animal foi anestesiado e seu rim transferido para uma cubeta contendo solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl). Posteriormente, esse material foi dissociado e incubado em estufa a 37 °C. Decorrido aproximadamente 45 min, o material foi retirado da estufa e misturado a 600 µl de fixador gelado, após 1 min foi centrifugado e o sobrenadante foi retirado, foram colocados aproximadamente 2 ml de fixador e posteriormente o material analisado (Protocolo Anexo V).

O procedimento utilizado para detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) que estiveram ativas seguiu a técnica descrita originalmente por HOWELL e BLACK (1980), sendo utilizada uma solução coloidal reveladora e uma de nitrato de prata (Ag+NO₃) (Protocolo Anexo VI).

Para detecção de regiões de heterocromatina foi adaptado o método descrito por SUMNER (1972), tratando a lâmina com uma solução de ácido clorídrico (HCl), uma solução saturada de hidróxido de bário (Ba(OH)₂) e solução salina de citrato (2xSSC) (Protocolo Anexo VII).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) na localização de sondas de DNA foi realizada de acordo com PINKEL et al. (1986), usando sondas 18S provenientes de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI Jr, 2004) e DNA_r 5S de *Leporinus obtusidens* (MARTINS e GALETTI JR, 1999) (Protocolo Anexo VIII).

A partir dos dados obtidos através das análises quali-quantitativas dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diplóide modal para os exemplares de cada espécie. Assim, as melhores metáfases, ou as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas sob microscopia de luz e/ou epifluorescência Olympus BX41[®] com objetiva de imersão de 100x e capturadas com auxílio de câmera CCD para captura digital em tempo real Olympus DP71[®] com 12 *mega pixels* de resolução. Com auxílio do programa Adobe Photoshop versão 7.0, os cromossomos foram isolados e inicialmente arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) segundo os critérios de LEVAN et al. (1964). Posteriormente, foram emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho em cada classe para a organização final do cariótipo.

4. Resultados

Os resultados estão organizados em capítulo único correspondente ao artigo científico:

Capítulo I

Investigação da variabilidade cariotípica em bagres de cultivo e de interesse para a conservação

Capítulo I

Investigação da variabilidade cariotípica em bagres de cultivo e de interesse para a conservação

Resumo

Dados cariotípicos são apresentados para quatro espécies de peixes pertencentes à família Pimelodidae. Estas apresentaram o mesmo número diplóide conservado, $2n = 56$ cromossomos, com fórmulas cariotípicas distintas e características próprias em relação ao comportamento das regiões organizadoras de nucléolos através da impregnação pelo íon Ag^+ e pela hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNA_r 5S e 18S, além da localização da heterocromatina pelo bandamento C. Eventos não-robertsonianos a exemplo das inversões pericentroméricas e os mecanismos de duplicação e transposição de RONS são requeridos para explicar a diversificação cariotípica em *Pseudoplatystoma* do rio Paraguai (MS), *Pimelodus* do rio Iguaçu (PR), *Sorubim* do rio Paraguai (MS) e *Steindachneridion* do rio Paraíba do Sul (SP). Os dados cariotípicos são ainda discutidos em relação aos demais pimelodídeos especialmente em relação à distribuição geográfica das espécies e a variação cariotípica geográfica.

Palavras chave: Cariótipo, *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Pimelodus britskii*, *Sorubim lima*, *Steindachneridion parahybae*.

Introdução

Segundo LUNDBERG e LITTMANN (2003), a família Pimelodidae é considerada uma das mais diversificadas entre os Siluriformes Neotropicais, sendo formada por 30 gêneros e 90 espécies. Apesar de conhecidas popularmente, muitas dessas espécies não foram descritas citogeneticamente nas regiões onde se têm registro delas e algumas se encontram em processo de extinção (HILSDORF e PETRERE Jr., 2002; LUDWIG et al., 2005). Dentre os grandes bagres, os gêneros *Steindachneridion* e *Pseudoplatystoma* ocupam o topo da cadeia alimentar; apresentam grande porte e migram em pelo menos uma fase da vida (MIRANDA, 1997; REVALDAVES et al., 2005). O gênero *Pimelodus* é o que apresenta maior diversidade na família Pimelodidae, incluem 26 espécies distribuídas do Panamá até a Argentina e seu tamanho varia de pequeno a médio porte (LUNDBERG e LITTMANN, 2003; RIBEIRO e LUCENA, 2006a; RIBEIRO e LUCENA, 2006b). O gênero *Sorubim* está distribuído nas bacias hidrográficas Amazônica, do Orinoco, do Paraná e do Paraíba (FROESE e PAULY, 2009).

Estudos citogenéticos em espécies da família Pimelodidae têm demonstrado números diplóides que variam de $2n = 50$ a $2n = 58$, sendo que a maioria das espécies apresenta $2n = 56$ cromossomos (SWARÇA et al., 2007), particularmente entre as espécies da subfamília Sorubiminae. Além disso, os cariótipos são compostos basicamente por cromossomos meta e submetacêntricos, pouca heterocromatina e somente um par de cromossomos portadores da região organizadora de nucléolo (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992; MARTINS-SANTOS et al., 1996, SWARÇA et al., 2001). Contudo, as informações cariotípicas sobre essa família são ainda subestimadas frente a sua diversidade e poucas espécies foram analisadas com técnicas de

citogenética molecular, como por exemplo, a coloração por fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* fluorescente (para revisão consultar <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>, OLIVEIRA et al., 2009).

Na intenção de contribuir para ampliar a caracterização citogenética dos pimelodídeos, especialmente de interesse para cultivo, foram analisadas quatro espécies de diferentes gêneros desta família, com vistas à comparação cariotípica, à citotaxonomia e evolução desta família de peixes neotropicais.

Material e Métodos

No presente trabalho foram analisados 59 exemplares de peixes da família Pimelodidae, 29 de *Pseudoplatystoma reticulatum* criados em cativeiro na Estação de Piscicultura do Projeto Pacu (município de Terenos, Mato Grosso do Sul) a partir de matrizes provenientes do rio Paraguai (10 machos e 19 fêmeas), 14 exemplares de *Pimelodus britskii* originários da Estação de Hidrobiologia da Usina Ney Braga da Companhia Paranaense de Energia Elétrica - COPEL (município de Cândói, Paraná) a partir de matrizes provenientes do médio rio Iguaçu (5 machos e 9 fêmeas), 6 exemplares de *Sorubim lima* provenientes da piscicultura BR-FISH, São João da Boa Vista (São Paulo), a partir de matrizes do rio Paraguai (1 macho e 5 fêmeas) e 10 exemplares de *Steindachneridion parahybae* criados em cativeiro na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura da Usina Hidroelétrica de Paraibuna da Companhia Energética de São Paulo – CESP (município de Paraibuna, São Paulo), a partir de

matrizes do rio Paraíba do Sul (6 machos e 4 fêmeas). As espécies foram identificadas taxonomicamente pelo Dr. O. A. Shibatta e exemplares representativos de cada espécie foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, PR) com os números de tombo MZUEL 5228 (*Pseudoplatystoma reticulatum*), MZUEL 5230 (*Pimelodus britskii*), MZUEL 5232 (*Sorubim lima*) e MZUEL 5231 (*Steindachneridion parahybae*).

A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu a metodologia de *air drying* adaptada para peixes por BERTOLLO et al. (1978). As regiões heterocromáticas foram detectadas de acordo com a técnica descrita por SUMNER (1972) e coloração com o corante fluorescente DAPI (4,6 diamino 2-fenil-indol). As regiões organizadoras nucleolares foram obtidas pela técnica de impregnação com o íon Prata, segundo HOWELL e BLACK (1980). A hibridação *in situ* fluorescente para localização simultânea do DNA_r maior (18S) e menor (5S), double-FISH, foi realizada de acordo com PINKEL et. al. (1986), usando as sondas de DNA_r 18S descritas para *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI JR, 2004) e DNA_r 5S de *Leporinus obtusidens* (MARTINS e GALETTI JR, 1999).

A identificação cromossômica foi baseada nos critérios da relação de braços (RB), proposto por LEVAN et al. (1964) e os cromossomos classificados no cariótipo em metacêntricos (m); submetacêntricos (sm); subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a). O número fundamental (NF) foi estabelecido como número total de braços cromossômicos do complemento diplóide considerando os tipos (m), (sm) e (st) como portadores de dois braços e o tipo (a) como portador de um único braço cromossômico. Os cromossomos foram analisados sob microscopia óptica fotônica e de epifluorescência (Olympus BX41[®])

e as imagens foram obtidas usando uma câmera de captura em tempo real Olympus DP71[®] com 12 *mega pixels* de resolução.

Resultados

Todas as espécies analisadas apresentaram número diplóide igual a 56 cromossomos, sem evidência morfológica de cromossomos sexuais heteromórficos ou cromossomos supranumerários. Os números fundamentais (NF) foram variáveis entre as espécies estudadas assim como a fórmula cariotípica. Estes dados de macroestrutura cariotípica estão sumarizados na Tabela 1.

Em relação ao bandamento C, em *P. reticulatum* as regiões heterocromáticas foram localizadas preferencialmente nas regiões centroméricas dos pares cromossômicos 2, 3, 5, 12, 23, 26, 27, 28 e 29. Os pares cromossômicos 5 e 19 apresentaram regiões heterocromáticas localizadas na posição terminal de seus braços curtos, enquanto os pares 24 e 25 apresentaram marcação no braço longo e os pares 7 e 8 apresentaram regiões heterocromáticas na extremidade de ambos os braços cromossômicos (marcação bitelomérica), figura 2B. A heterocromatina em *P. britskii* foi localizada nas regiões centroméricas dos pares cromossômicos 2, 4, 26 e 27. Marcações na posição terminal dos braços longos foram presentes nos pares cromossômicos 2, 16, e 18 enquanto o par 22 apresentou uma marcação bitelomérica discreta (Figura 3B). Em *S. lima*, os pares cromossômicos 25 e 28 apresentaram heterocromatina na região centromérica, enquanto os pares 2, 3 e 13 apresentaram marcações biteloméricas (Figura 4B). Foram encontradas bandas heterocromáticas centroméricas, em *S. parahybae*, nos pares cromossômicos 9, 19, 26 e 27. Bandas teloméricas foram

observadas no braço curto dos pares 6, 21, 22, 23 e 24, ao passo que marcações biteloméricas foram evidenciadas nos pares 4, 13 e 20 (Figura 5B).

A marcação por impregnação pelo íon prata revelou um par de Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag^+ RONs) localizadas na porção terminal do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico em *P. reticulatum* (Figura 2D). Em *P. britskii*, a Ag^+ RONs foi localizada na porção terminal do braço longo de um par cromossômico subtelocêntrico (Figura 3D), enquanto *S. lima* evidenciou marcações pela prata também em um par subtelocêntrico, porém no braço curto (Figura 4D). *S. parahybae*, apresentou impregnação pela prata no braço curto de um par cromossômico submetacêntrico também em posição terminal (Figura 5D). Em todas as espécies as Ag^+ RONs coincidiram com a marcação obtida pela sonda 18S e apenas um par de marcações com a sonda 5S na região intersticial de um par cromossômico comparável entre as espécies foi evidenciado (Figuras 2C, 4C e 5C), com exceção para *P. britskii* que apresentou dois pares de cromossomos com seqüências 5S localizadas (Figura 3C). A análise por double-FISH evidenciou sítios em sintenia com marcações para as sondas 18S e 5S em um par cromossômico em *P. britskii* (Figura 3C).

Discussão

A condição de espécies vulneráveis ou em risco de extinção determinou que este trabalho fosse conduzido com espécimes criados em cativeiro para todas as espécies analisadas, como tentativa de minimizar possíveis impactos e principalmente, oportunizando o acesso a espécies de rara ocorrência na natureza, de modo a permitir uma abordagem acerca da evolução cariotípica e conservação destas espécies (ARTONI et al., 2009). O número diplóide igual a 56 cromossomos encontrado para todas as espécies avaliadas sustenta a hipótese de que este número diplóide seja freqüente, comparável e provavelmente uma sinapomorfia para a maioria dos pimelodídeos. O número fundamental elevado e fórmula cariotípica com predomínio de cromossomos meta e submetacêntricos reforçam uma condição de ancestralidade cariotípica já destacada anteriormente na literatura (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992; DIAS e FORESTI, 1993; VISSOTO et al., 1999; CARVALHO et al., 2004; GARCIA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2008 e TRECO et al., 2008).

Um levantamento realizado até o momento para as espécies pertencentes a esta família de peixes neotropicais mostra que cerca de 30% destas, entre as 90 espécies nominais citadas por LUNDBERG e LITTMANN (2003), têm sua constituição cariotípica ao menos preliminarmente descrita (para revisão consultar <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>, OLIVEIRA et al., 2009). Com um terço das espécies já cariotipadas, tendências evolutivas podem ser apontadas, especialmente para o gênero *Pimelodus* e para outros bagres supostamente relacionados em sua condição sistemática assim como os gêneros *Steindachneridion*, *Pseudoplatystoma* e *Sorubim*, embora estes constituam, na opinião

de DE PINNA (1998), uma politomia dentro da família Pimelodidae. Considerando as espécies e populações já analisadas em relação a alguma característica cariotípica, indicam uma forte tendência conservativa para a macroestrutura cariotípica destas espécies. No presente trabalho não foi diferente e podemos destacar que *Pimelodus britskii* apresentou um caráter diferenciado em relação às demais espécies quando analisada em relação aos sítios de DNA_r maior e menor de peixes localizados em sintenia. Esta é uma condição pouco freqüente entre as espécies já analisadas citogeneticamente (MARTINS e GALETTI Jr, 1999, 2000, 2001). Esta distinção pode colocar o estado deste caráter, quando analisado sob ótica da sistemática filogenética, como uma possível apomorfia com a robustez do caráter devendo também ser testada em relação a outras populações da mesma espécie e em outras espécies do gênero *Pimelodus*. Em *Pimelodus fur*, por exemplo, as porções ribossomais do DNA estão localizadas em cromossomos distintos (GARCIA et al., 2005). Mecanismos como conversão e *crossing-over* desigual freqüentemente ocorrem dentro desses arranjos gênicos durante a evolução, de acordo com DOVER (1986). Nesse contexto, segundo DINIZ et al. (2009), a localização de sítios de DNA_r 5S e 18S em diferentes cromossomos e diferentes posições seria uma maneira de restringir a fixação de rearranjos desfavoráveis como, por exemplo, translocação de segmentos entre estes genes.

Não obstante, as características da macroestrutura cariotípica podem ser consideradas marcadores citotaxonômicos para as espécies aqui estudadas. A fórmula cariotípica 22m+20sm+6st+8a verificada em *Pseudoplatystoma reticulatum* do rio Paraguai (bacia do Prata) é distinta daquela observada por FENOCCHIO e BERTOLLO

(1992), citado como *Pseudoplatystoma fasciatum*, com 18m+14sm+10st+14a em exemplares do rio Solimões da Bacia Amazônica e, ainda, diferente da fórmula cariotípica encontrada por PORTO-FORESTI et al. (2000) com 10m+6sm+6st+6a para a mesma espécie no mesmo rio Paraguai. Fórmulas cariotípicas diferentes entre populações de uma mesma espécie provenientes de bacias hidrográficas distintas geralmente são evidências de processos de evolução cariotípica devido a isolamento geográfico e interrupção do fluxo gênico, conforme o trabalho de MOREIRA-FILHO e BERTOLLO (1991) com *Astyanax scabripinnis*. Eventos não robertsonianos de diversificação cariotípica, a exemplo de inversões peri e paracêntricas são requeridos para explicar as diferenças cariotípicas evidenciadas entre estas populações de *P. reticulatum*. Resgatando a história biogeográfica das bacias hidrográficas que abrigam as populações de *P. reticulatum* alopatricamente distribuídas, temos que em alusão ao trabalho de MONTROYA-BURGOS (2003) com cascudos do gênero *Hypostomus*, podemos hipotetizar que as populações de *P. reticulatum* da bacia do rio São Francisco devem estar isoladas daquelas do Paraná/Paraguai a cerca de 5,7 a 6,4 m.a.

O caso de *Steindachneridion parahybae* é ainda mais especial por se tratar de uma primeira descrição cariotípica para esta espécie que se apresenta, na atualidade, em alto risco de extinção listada como ameaçada no livro vermelho do Ministério do Meio Ambiente (ROSA e LIMA, 2008). A macroestrutura cariotípica não difere da verificada em outros pimelodídeos, evidenciando um elevado número de cromossomos de dois braços, contudo, apresenta quatro pares de cromossomos acrocêntricos. A localização cromossômica dos cístrons ribossomais evidenciados pela double-FISH com sonda 5S nesta espécie, marcou na região intersticial de um par de cromossomos

submetacêntricos, enquanto a sonda 18S foi localizada em apenas um cromossomo. SWARÇA et al. (2005) estudando o cariótipo de *Steindachneridion scriptum* (citado como *S. scripta*), encontrou número diplóide de 56 cromossomos com a fórmula cariotípica $24m+20sm+4st+8a$ e $NF = 104$. A manutenção do $2n = 56$ e do $NF = 104$ em oposição às diferenças cariotípicas verificadas para os tipos cromossômicos entre *S. scriptum* e *S. melanodermatum* reforçam a ocorrência de inversões na diversificação cariotípica destas espécies, a exemplo do que deve ocorrer em maior escala entre os pimelodídeos. Segundo GARAVELLO (2005) são atualmente reconhecidas seis espécies de *Steindachneridion* distribuídas pelas drenagens costeiras do leste e alto Paraná. *Steindachneridion parahybae* é endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul, enquanto *S. scriptum* possui uma distribuição mais ampla pelas bacias dos rios Uruguai e Alto Paraná. Contudo, o isolamento geográfico destas espécies remonta aos 4,2 m.a. quando analisado comparativamente a distribuição de espécies do gênero *Hypostomus* entre as bacias hidrográficas do alto Paraná e bacias costeiras (MONTROYA-BURGOS, 2003). Semelhante ao requerido para explicar a diversificação cariotípica encontrada entre os *Pseudoplatystoma*, aqui também ressaltamos a importância da vicariância na diversificação cariotípica das espécies de *Steindachneridion*.

Duas descrições cariotípicas foram realizadas anteriormente para *Sorubim lima* primeiramente por FENOCCHIO e BERTOLLO (1992) que estudaram uma amostra populacional do rio Solimões na Bacia Amazônica e, posteriormente, por MARTINS-SANTOS et al. (1996) que analisaram uma população do rio Paraná na Bacia do Alto Paraná. Embora os estudos tenham sido concordantes em relação ao número cromossômico diplóide com $2n = 56$ cromossomos, as fórmulas cariotípicas foram

ligeiramente discordantes com $18m+12sm+14st+12a$ e $20m+14sm+10st+12a$, respectivamente. Nossos resultados para a amostra populacional de *S. lima* do rio Paraguai também corrobora o $2n = 56$ cromossomos e diverge mais expressivamente em relação às fórmulas cariotípicas anteriormente descritas para esta espécie apresentando $24m+16sm+8st+8a$. Estas discrepâncias cariotípicas acima apontadas denotam a presença de rearranjos cromossômicos decorrendo em variações geográficas a exemplo do que foi anteriormente ressaltado para *P. reticulatum* e *S. parahybae*.

Marcadores de heterocromatina já foram empregados por FENOCCHIO e BERTOLLO (1992) na tentativa de individualizar espécies de *Pseudoplatystoma*. Nossos resultados apontam para uma grande variação interespecífica de distribuição da heterocromatina sobre os cromossomos das espécies analisadas. Contudo, são características gerais observadas que os segmentos heterocromáticos estejam localizados próximos ao centrômero e telômero dos cromossomos, e que ainda estas bandas sejam pouco evidentes. Algumas bandas biteloméricas mais consistentes e marcadoras podem ser evidenciadas em cromossomos de dois braços em *Pseudoplatystoma reticulatum* (par no. 8), *Pimelodus britskii* (par no. 22), *Sorubim lima* (par no. 13) e *Steindachneridion parahybae* (par no. 8).

Os dados cariotípicos aqui levantados praticamente distinguem as espécies/populações em relação aos demais pimelodídeos já estudados citogeneticamente, embora o número diplóide modal de $2n = 56$ cromossomos deva ser considerado um caráter compartilhado pela maioria das espécies desta família de peixes neotropicais.

O emprego da citogenética molecular, especialmente da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), sobretudo para a localização cromossômica de regiões de DNA_r, tem apontado um caminho bastante promissor para análises evolutivas e citotaxonômicas em peixes. No presente caso, verificamos um estado derivado para a distribuição de cistrons ribossomais 18S em sintenia com regiões 5S e, esta última dispersa em maior número de cromossomos no complemento cariotípico de *Pimelodus britskii*, uma condição pouco comum entre os peixes que pode indicar uma apomorfia para a espécie, ao menos no nível dos pimelodídeos já analisados com estes marcadores. As demais espécies aqui analisadas apresentaram RONS simples em um único par cromossômico com localização e tipos cromossômicos distintos.

Em conclusão, os dados cariotípicos, de bandamentos cromossômicos e localização de sondas de DNA_r foram significantes não só para a caracterização citogenética das populações e espécies aqui representadas, assim como para subsidiar a citotaxonomia. A biogeografia histórica e o tempo evolutivo também se mostraram fundamentais para a interpretação das diferenças cariotípicas verificadas entre populações alopátricas.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Dr. O.A. Shibatta pela identificação das espécies e aos Biólogos Luiz A. M. Ludwig (COPEL), Danilo Caneppele (CESP), João Felipe Moutinho Sant'Anna e ao Zootecnista Thiago Tetsuo Ushizima (MAR & TERRA IND. e COM. de PESCADOS LTDA) por providenciar exemplares das espécies analisadas. Este estudo foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento

Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Nós agradecemos ainda ao Sr. Miguel A Carvalho pelo apoio técnico e assistência no laboratório.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 2. Características cariotípicas das espécies estudadas. NF = número fundamental (número de braços cromossômicos); Ag⁺RONs = marcação das regiões organizadoras de nucléolos pela Prata; Sítios 18S = localização de seqüências DNA_r 18S; Sítios 5S = localização de seqüências DNA_r 5S; banda-C = localização cromossômica da heterocromatina; m = cromossomo metacêntrico; sm = cromossomo submetacêntrico; st = cromossomo subteloentrico; a = cromossomo acrocêntrico; p = braço curto; q = braço longo; Cent. Crom. = centrômero dos cromossomos; Tel. Crom. = telômero dos cromossomos.

Espécie	Fórmula Cariotípica	NF	Ag+RONs	Sítios 18S	Sítios 5S	banda-C
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	22m+20sm+6st+8a	104	Braço p terminal cromossomo sm	Braço p terminal cromossomo sm	Braço p intersticial cromossomo sm	Cent. Crom. 2, 3, 5, 12, 23, 26, 27, 28 e 29. Tel. Crom. 5 e 19 braço p; 24 e 25 braço q; 7 e 8 braço p e q.
<i>Pimelodus britskii</i>	24m+18sm+8st+6a	106	Braço q terminal cromossomo st	Braço q terminal cromossomo st sintênica ao 5S	Braço p intersticial cromossomo sm; Braço q terminal cromossomo st sintênica ao 18S	Cent. Crom. 2, 4, 26 e 27. Tel. Crom. 2, 16 e 18 braço q; 22 braço p e q.
<i>Sorubim lima</i>	24m+16sm+8st+8a	104	Braço p terminal cromossomo st	Braço p terminal cromossomo st	Braço p intersticial cromossomo sm	Cent. Crom. 25 e 28. Tel. Crom. 2, 3 e 13 braço q e q.
<i>Steindachneridion parahybae</i>	14m+22sm+12st+8a	104	Braço p terminal cromossomo sm	Braço p terminal cromossomo sm	Braço p intersticial cromossomo sm	Cent. Crom. 9, 19, 26 e 27. Tel. Crom. 6, 21, 22, 23 e 24 braço p e 4, 13 e 20 braço p e q.

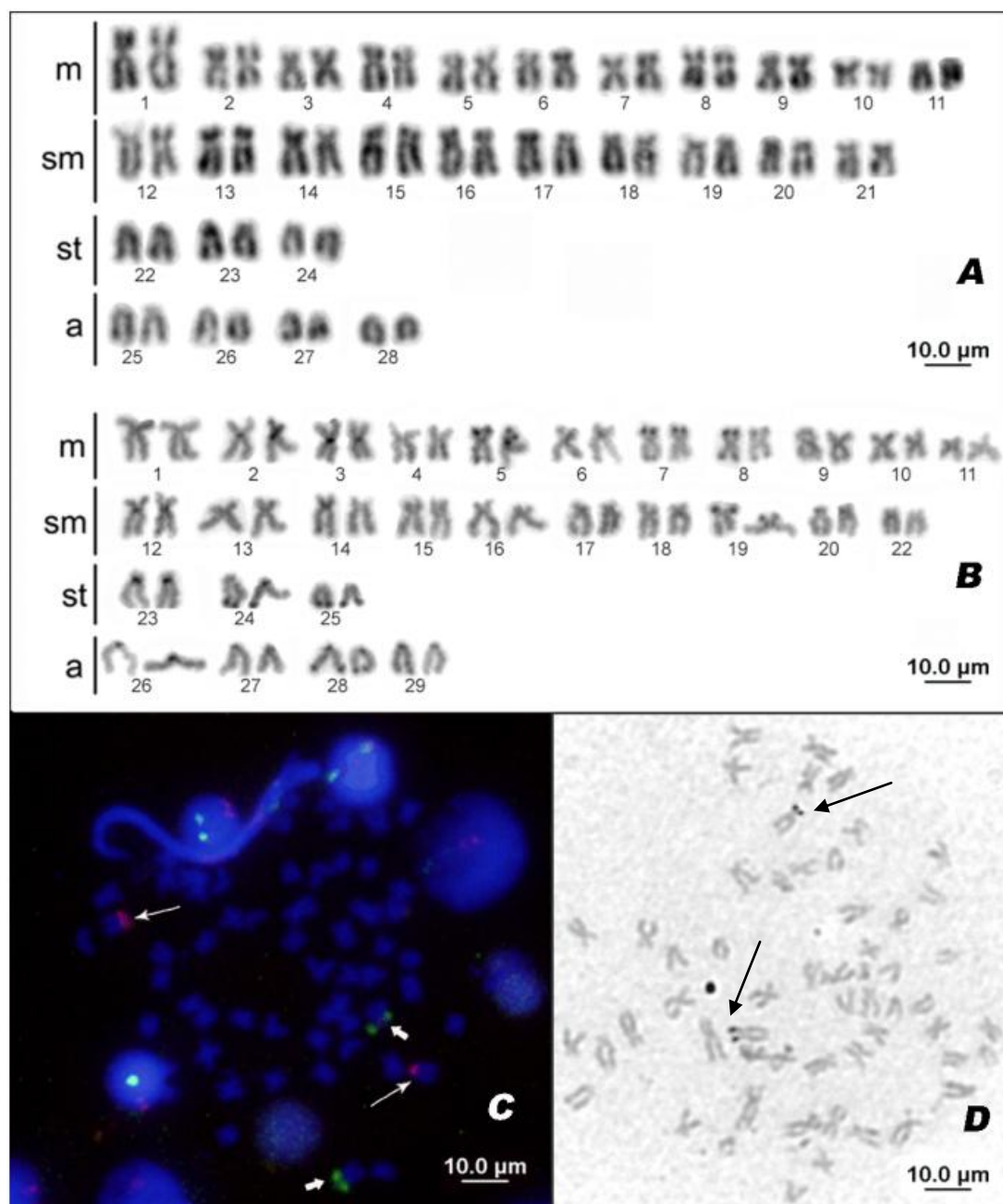


Figura 2. Cariótipo em GIEMSA (A), banda C (B), FISH com sonda 18S (setas grossas) e 5S (setas finas) (C) e Ag⁺RONs (setas negras) (D) de *Pseudoplatystoma reticulatum* do rio Paraguai (MS). m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico.

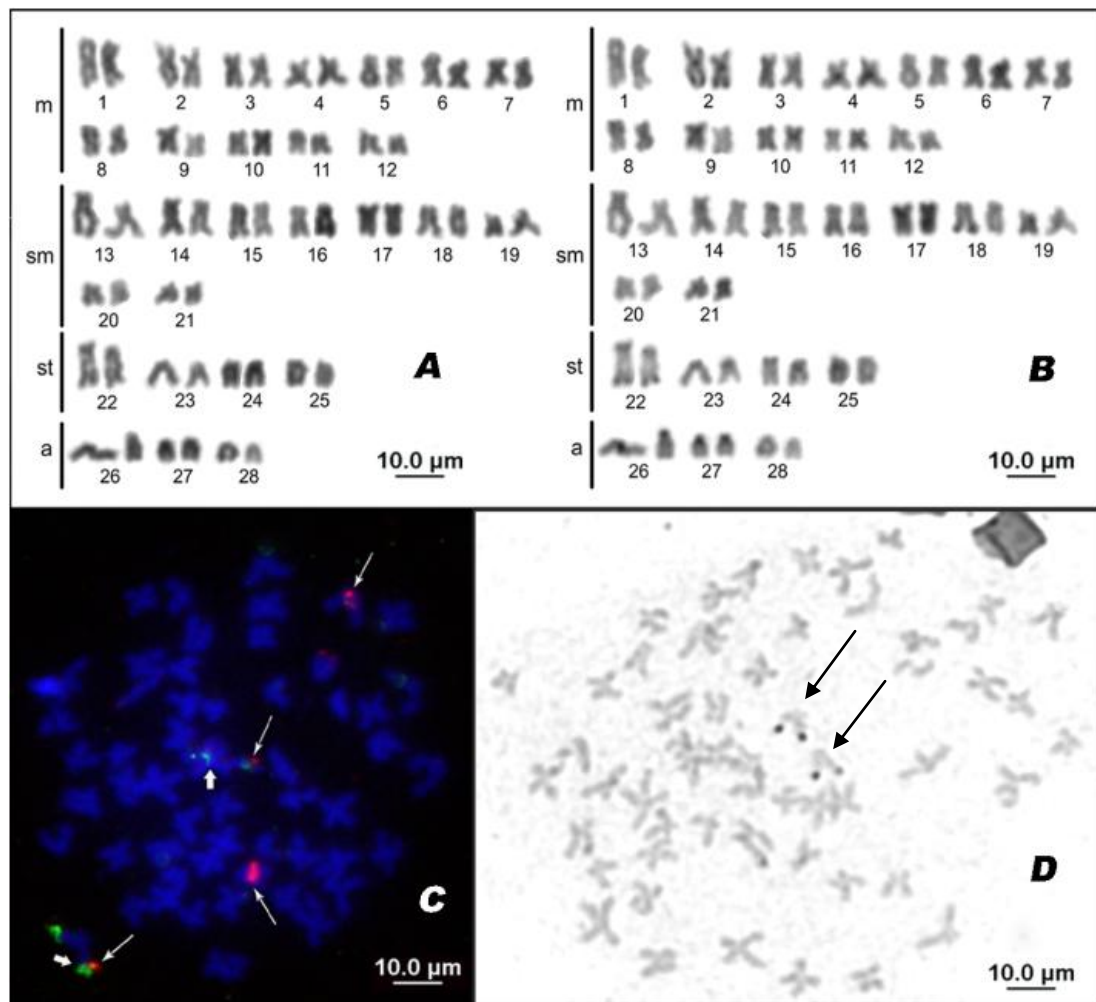


Figura 3. Cariótipo em GIEMSA (A), banda C (B), FISH com sonda 18S (setas grossas) e 5S (setas finas) (C) e Ag⁺RONs (setas negras) (D) de *Pimelodus britskii* do rio Iguaçu (PR). m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico.

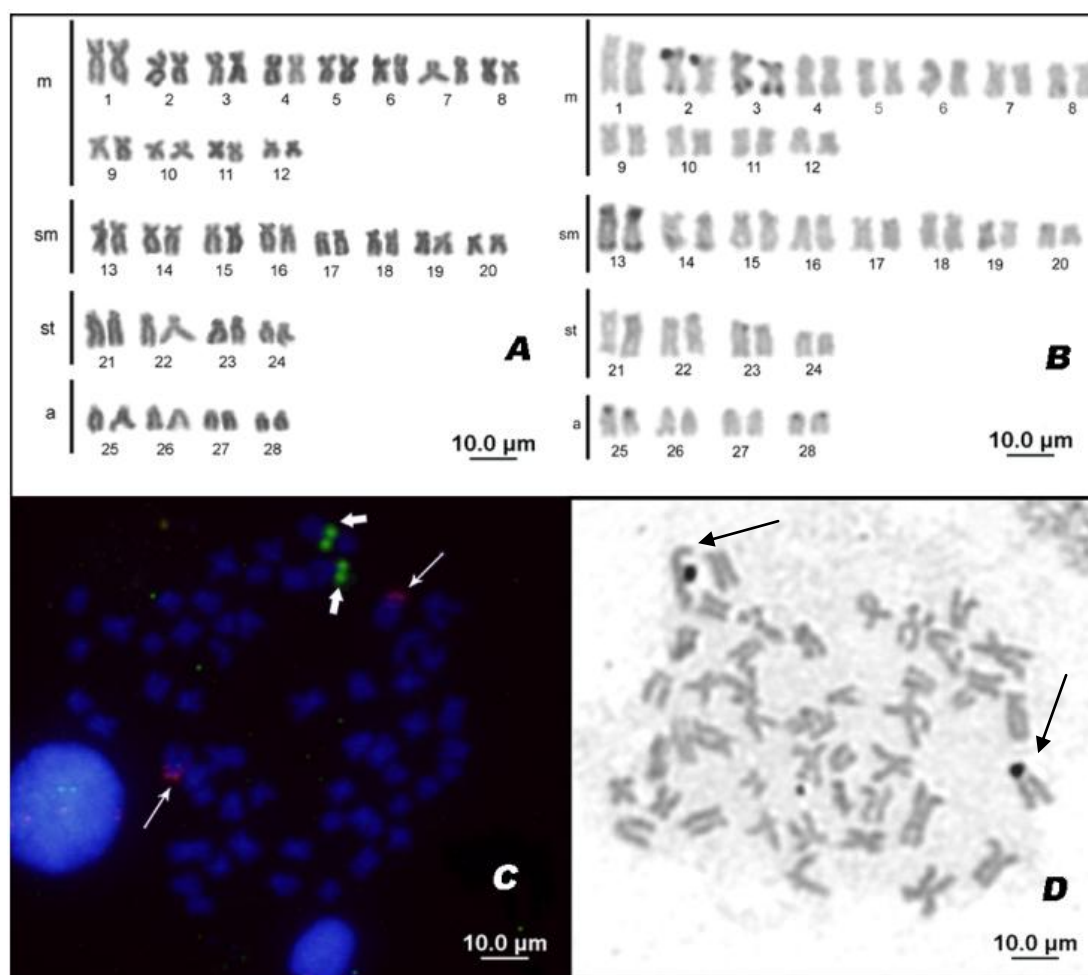


Figura 4. Cariótipo em GIEMSA (A), banda C (B), FISH com sonda 18S (setas grossas) e 5S (setas finas) (C) e Ag⁺RONs (setas negras) (D) de *Sorubim lima* do rio Paraguai (MS). m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico.

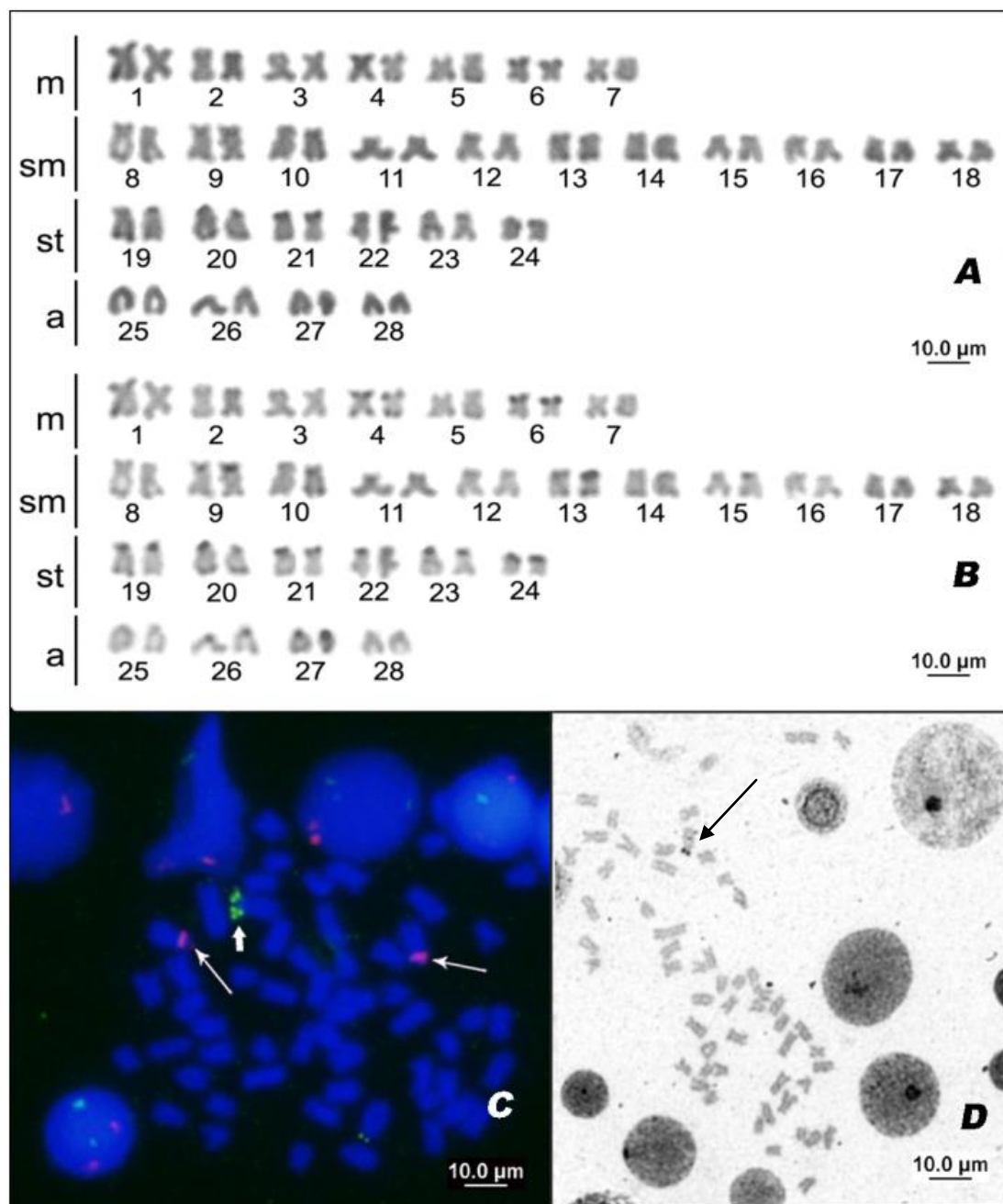


Figura 5. Cariótipo em GIEMSA (A), banda C (B), FISH com sonda 18S (setas grossas) e 5S (setas finas) (C) e Ag⁺RONs (setas negras) (D) de *Steindachneridion parahybae* do rio Paraíba do Sul (SP). m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico.

5. Considerações finais

5.1 Discussão Geral

Considerando-se a diversidade ictiofaunística neotropical, estudos sobre aspectos de biologia evolutiva são ainda pouco expressivos. Em contraste, o impacto ambiental causado pelo desmatamento das matas ciliares, a construção de hidrelétricas e construção de pesqueiros com espécies exóticas e/ou híbridas têm causado forte impacto sobre as espécies nativas, muitas ainda desconhecidas da ciência (PETRERE Jr, 1995; MIRANDA, 1997; SATO, 1997; HILSDORF e PETRERE Jr, 2002; LUDWIG et al., 2005). Em agravamento, é perceptível a perda de diversidade biológica e da própria variabilidade genética, com conseqüente extinção de espécies, populações (PRIOLI et al., 2003) e dos seus *pool gênicos*.

O conhecimento prévio a respeito da variabilidade genética dentro e entre populações é de extrema importância para o planejamento e o sucesso de programas de conservação *in situ* e repovoamento de peixes (TOLEDO-FILHO, 1994; ALVES et al, 2001). Estes são muito comuns nas hidrelétricas brasileiras dada à exigência legal para as concessões de uso do recurso hídrico para fins de obtenção de energia elétrica. A Companhia Energética de São Paulo (CESP) desenvolve em seus reservatórios programas de conservação da biodiversidade ictiológica com foco no desenvolvimento de tecnologia para a reprodução de espécies nativas em cativeiro com vistas à reintrodução de alevinos no ambiente natural. As espécies em risco de extinção *Brycon insignis* (Piabanha) e *Steindachneridion parahybae* (Surubim do Paraíba), por exemplo, foram eleitas para estudos de reprodução induzida pela CESP na bacia do Rio Paraíba do Sul (HILSDORF e PETRERE Jr, 2002). No rio Iguaçu, a Companhia Paranaense de Energia Elétrica – COPEL, através da Estação de

Hidrobiologia da Usina Ney Braga, realiza repovoamento de espécies da região, entre elas *Steindachneridion melanodermatum* (LUDWIG et al., 2005).

A acessibilidade às técnicas bioquímicas e de genética molecular, nas últimas décadas, fez destas juntamente com a citogenética, importantes ferramentas para o manejo de populações de animais selvagens e de cativeiro, permitindo evidenciar o grau de variabilidade de uma população e dessa forma justificando projetos que visam conservar o patrimônio biológico/genético de populações e espécies em extinção.

RENESTO et al. (2000) verificaram, através de padrões de isoenzimas, a existência de isolamento reprodutivo entre *Pimelodus ortmanni* e *Pimelodus* sp. (aqui identificado como *Pimelodus britskii*) do rio Iguaçu (Paraná, Brasil), concluindo que se tratam de espécies distintas. Estes dados são confirmados pelas nossas análises citogenéticas com *P. britskii* tendo o cariótipo acessado pela primeira vez. A comparação através da eletroforese de aloenzimas de duas populações de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricaridae) do rio Ivaí (Paraná, Brasil), revelou que *Rineloricaria pentamaculata* e *Rineloricaria* aff. *pentamaculata* diferiram em frequências alélicas em três loci polimórficos, e de acordo com LIMEIRA et al. (2009) se trata de espécies em *statu nascendi*.

ALVES et al. (2001) utilizaram de sequenciamento e de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de genes do DNA_{mt} de *Anaecypris hispanica*, espécie restrita a tributários da bacia de drenagem do Rio Guadiana, Portugal, para inferir sobre a estruturação populacional e variabilidade genética nesta espécie em diferentes populações, conseguindo indicar áreas de interesse para a conservação. Em peixes neotropicais o emprego de marcadores moleculares para a conservação biológica ainda é pouco expressivo, mas em franca expansão. PRIOLI et al. (2000), com o intuito de analisar a diferenciação genética entre *Pseudoplatystoma corruscans*

e *Pseudoplatystoma reticulatum*, identificaram marcadores espécie-específicos utilizando análise de seqüências D-Loop de DNA_{mt}, marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SPARS (*Single Primers Amplifications Reactions*), verificando a presença de um exemplar híbrido coletado na natureza. Nossos dados caracterizam o cariótipo de uma população de *P. reticulatum*, comparativamente distinta na macroestrutura cariotípica de outras populações já estudadas para esta espécie. A bem destas diferenças, verificamos um número diplóide conservado de $2n = 56$ cromossomos com a maioria de cromossomos de dois braços e cariótipo unimodal no tamanho dos cromossomos o que pode facilitar o pareamento de cromossomos homeólogos (oriundos de gametas de espécies distintas na formação do zigoto) viabilizando a fertilidade da espécie híbrida em hipótese. Este fato se reveste em importante risco para a conservação das duas espécies anteriormente citadas se colocadas artificialmente em condições de simpatria na natureza, como no caso do rio Paraná ou na soltura ou escape de piscicultura de híbridos de *P. reticulatum* x *P. corruscam*.

Os dados citogenéticos disponíveis para os peixes neotropicais de água doce, de acordo com ALMEIDA-TOLEDO et al. (2000), revelam uma variabilidade genética surpreendente, além de possibilitarem a identificação das principais tendências evolutivas e de algumas características citogenéticas peculiares desta fauna. RIBEIRO et al. (2008) conduziu análises citogenéticas em amostra populacional de *Iheringichthys labrosus* do alto rio Tibagi e comparou com dados citogenéticos obtidos por CARVALHO et al. (2004) em *I. labrosus* do baixo rio Tibagi. Dessa forma, os autores concluíram que apesar de se tratarem da mesma espécie oriunda do mesmo rio, o comportamento das espécies estudadas (espécies não migratórias habitantes de regiões profundas) poderia favorecer o isolamento reprodutivo entre estas populações sugerindo a fixação de divergências cariotípicas em decorrência de

alterações cromossômicas como observado por RIBEIRO et al. (2008). Da mesma forma, como constatado no presente trabalho, a divergência entre fórmulas cariotípicas verificada entre populações dispares de peixes dos gêneros *Pseudoplatystoma* e *Sorubim* habitantes de rios e bacias hidrográficas distintas pode ser explicada com base no isolamento reprodutivo. Quando as divergências genéticas são sentidas em populações de uma espécie em uma dada bacia hidrográfica são requeridos atributos comportamentais como hábito migratório ou sedentário para explicar a restrição ao fluxo gênico (MIRANDA, 1997; REVALDAVES et al., 2005), ao passo que para a análise da evolução cariotípica há que se lançar mão de um conhecimento integrado do tempo evolutivo e da história geomorfológica em somatória a biologia das espécies (ARTONI et al., 2009).

Maximizar a variabilidade genética dentro de populações naturais e evitar erros que acelerem o processo de introgressão genética são objetos dos programas de conservação e constituem o principal desafio para a genética da conservação (PRIOLI et al., 2000; HILSDORF e PETRERE Jr, 2002; ARTONI et al., 2006). Assim, a identificação de patrimônios genéticos, entre estes a variabilidade cariotípica, em risco de extinção, quer seja por endemismo ou ação antrópica, constitui importante ferramenta para programas de repovoamento e manutenção da biodiversidade.

5.2 Conclusão

Através do presente estudo, procurou-se contribuir com o acervo de informações citogenéticas a respeito dos Siluriformes *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Pimelodus britskii*, *Steindachneridion parahybae* e *Sorubim lima*, considerando-se que muitas das informações correntes tratam-se das primeiras caracterizações da macroestrutura cariotípica das espécies de peixes analisadas. Não obstante, marcadores cromossômicos aplicados à piscicultura e na proteção ambiental ainda são muito pouco explorados.

Assim foram possíveis as seguintes conclusões em relação aos objetivos propostos:

Objetivo 1. Caracterizar citogeneticamente as espécies *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Pimelodus britskii*, *Sorubim lima* e *Steindachneridion parahybae*. Sobretudo aplicando técnicas de citogenética molecular;

Conclusão 1. Todos os pimelodídeos estudados, pertencentes a quatro gêneros distintos, corroboraram o número diplóide modal de 56 cromossomos, cariótipo composto basicamente por cromossomos meta e submetacêntricos, portanto com número fundamental elevado. Essas informações sustentam a hipótese de que $2n = 56$ cromossomos seja o número diplóide basal para a família Pimelodidae.

Objetivo 2. Comparar os dados obtidos com aqueles já descritos na literatura enfatizando aspectos da diversificação e evolução cariotípica das espécies de peixes neotropicais alvo do presente estudo.

Conclusão 2. A fórmula cariotípica de *Pseudoplatystoma reticulatum* apresentou divergências com outras fórmulas descritas na literatura, sugerindo variação

cariotípica geográfica. *Pimelodus britskii* exibiu localização sintênica dos genes 18S e 5S do DNA_r. Em peixes esta é uma condição pouco freqüente as espécies já estudadas neste aspecto, e pode ser uma apomorfia para esta espécie cariotipada pela primeira vez. A respeito de *Sorubim lima*, existem poucos trabalhos em citogenética, contudo, também existe divergência quanto à fórmula cariotípica também sugerindo variação cariotípica geográfica. Quanto a *Steindachneridion parahybae* trata-se da primeira caracterização cariotípica para essa espécie, que consta na lista de vermelha de animais em extinção, e apresenta semelhança com outras espécies congêneres.

6. Referências Bibliográficas

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I.S. **Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the river Iguaçu basin.** Cytologia, v. 66, p. 299 – 306. 2001.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Biodiversity and fisheries management in the Paraná river basin: Successes and Failures.** In: Would Fisheries Trust. (Org.). Canada: BLUE MILLENIUM, p. 28. 2002.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. **Contribuição à citogenética de Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi).** Tese de Doutorado, I.B., Universidade de São Paulo, Brasil. 1978.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.A.L. **As Regiões organizadoras de nucléolo em peixes.** Ciência e Cultura, v. 37, p. 448-453. 1985.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A.; BERNARDINO, G.; FERRARI, V.A.; ALCANTARA, R.C.F. **Cytogenetics studies in *Colosoma mitrei*, *Colosoma macropomum* and their interspecific hibrid.** In: Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture (Ed K. Tiews). Heenemann Verlagsgesellschaft mb H, Berlin, v. 1, p. 189-195. 1987.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TRAJANO, E. **Cytogenetics analysis of the brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*.** Caryologia, v. 45, p. 255-262. 1992.

ALMEIDA TOLEDO, L.R.; FORESTI, F.; DANIEL, M.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. **Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes).** Chromosoma. v. 109, n. 3, p. 197-200. 2000.

ALVES, A.L. **Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial.** Dissertação de Mestrado. I.B., Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2000.

ALVES, M.J.; COELHO, H.; COLLARES-PEREIRA, M.J.; COELHO, M.M. **Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaecypris hispanica*: importance for conservation.** Heredity, v. 87, n. 4, p. 463-473. 2001.

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. **Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas.** Publicação UEPG- Biological and Health Sciences, v. 6, n. 1, p. 43-60. 2000.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. **Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes).** Hereditas, v. 134, p. 201-210. 2001.

ARTONI, R.F.; ALMEIDA, M.C. **Conservação genética dos peixes do parque estadual de vila velha: Uma abordagem inicial.** In: ARTONI, R.F.; SHIBATTA, O.A. Peixes do Parque Estadual de Vila Velha: Aspectos da história natural, da biologia evolutiva e da conservação. Ponta Grossa: Editora UEPG, cap. 5, p. 79-91. 2006.

ARTONI R.F.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO L.A.C. **Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. Review in fish biology and fisheries.** v. 19, p. 393-401. 2009.

AVISE, J.C.; REEB, C.A.; SANDERS, N.C. **Geographic population and species differences in mitochondrial DNA of mouthbrooding marine catfishes (Ariidae) and demersal spawning toadfishes (Batrachoididae).** Evolution v. 41, p. 991-1002. 1987.

AVISE, J.C. **Phylogeography.** Boston, MA: Harvard University Press. 2000.

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

BIGONI, A.P.V.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. **Estudos citogenéticos em *Pseudoplatystoma corruscans* (Pimelodidae, Sorubiminae) do rio Mogi-Guaçu, SP.** In: Proc. IV Simpósio de Citogenética e Evolução Aplicada a Peixes Neotropicais, Rio de Janeiro, Resumos, p. 32. 1992.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. **Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu.** Hereditas, v. 140, p. 201-209. 2004.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sitemática.** In: Poluição e Piscicultura. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Paraguai ed. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Instituto de Pesca, p. 79-108. 1972.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce.** In: CARVALHO, J.C.M. (Coord.). Atlas da fauna brasileira. Melhoramentos, São Paulo, SP, p. 84-93. 1981.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de Identificacao de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco.** Brasília: CODEVASF, p. 115. 1988.

CALLEJAS, C.; OCHANDO, M.D. **Phylogenetic relationships among Spanish barbus species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers.** Heredity, v. 89, n. 1, p. 36-43. 2002.

CALLEJAS, C.; OCHANDO, M.D. **Recent radiation of Iberian barbel fish (Teleostei, Cyprinidae) inferred from cytochrome *b* genes.** J. Hered. v. 91, p. 283-288. 2000.

CARVALHO, M.R. DE; MAISEY, J.G.; GRANDE, L. **Freshwater stingrays of the Green River Formation of Wyoming (Early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes).** Bulletin of the American Museum of Natural History, v. 284, p. 1-136. 2004.

CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. **Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus***. Braz. Arch. Biol. Technol. v. 50, n. 1. 2007.

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

DERGAM, J.A.; PAIVA, S.R.; SCHAEFFER, C.E.; GODINHO, A.L.; VIEIRA, F. **Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil**. Genetics and Molecular Biology., n. 25, p. 379-387. 2002.

DIAS, A.L.; FORESTI, F. **Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei)**. Brazilian Journal of Genetics, v. 16, p. 585-600. 1993.

DIAS, J.A.; BERTOLLO, L.A.C. **Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei)**. Revista Brasileira de Genética, v. 16, p. 585-600. 1990.

DINIZ, D.; LAUDICINA, A.; BERTOLLO, L.A.C. **Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae)**. Genetics and Molecular Biology, v. 32, n. 1, p. 37-41. 2009.

DOVER, G.A. **Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated**. Trends Genetics, v. 2, p. 159-165. 1986.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. **Supranumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae)**. Genetica, 81, 193 – 198. 1990.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. **Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region**. Cytobios, v. 69, p. 41–46. 1992.

FENOCCHIO, A.S. **Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. 1993.

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

Freshwater Neotropical Fishes. Disponível em <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>. Acesso em: 20 jul 2009.

FROESE, R.; D. PAULY (EDS.), 2002, Fishbase. **World Wide Web eletronic publication:** www.fishbase.org. Acesso em: 31 jul. 2009.

FURNAS. Disponível em: <http://www.furnas.com.br>. Acesso em: 01 ago. 2009.

GALETTI Jr., P.M. **Chromosome complement of induced hybrids of the fish *Prochilodus marggravii* and *Prochilodus affinis* (Prochilodontidae, Characiformes)**. Brazil. J. Genetics, v. 14, n. 1, p. 203-207. 1991.

GALETTI Jr., AGUILAR, C.T. e MOLINA, W. **An overview of marine fish cytogenetics**. Hydrobiologia, v. 420, p. 55-62. 2000.

GARAVELLO, J.C. **Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae)**. Neotropical Ichthyology, v. 3, n. 4, p. 607-623. 2005.

GARCIA C.; O. MOREIRA-FILHO. **Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus**. Neotropical Ichthyology, v. 3, n. 2, p. 285-290. 2005.

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em Populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricaridae)**. São Carlos (SP). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 1998.

GOLD, J.R.; LI, Y.C.; SHIPLEY, N.S.; POWERS, P.K. **Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding**. Journal Fish Biology, v. 37, p. 563-575. 1990.

GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WEITZMAN, S.H.; MYERS, G.S. **Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms**. American Mus. Natural History, v. 131, n. 4, p. 341-455. 1966.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr, P.M. **Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae)**. Genetica, v. 3, p. 239-244. 2004.

HATANAKA, T. **Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus marggravi* (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco**. PhD Tesis, Universidade Federal de São Carlos, Brazil. 2000.

HILSDORF, A.W.; PETRERE Jr, M. **Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul**. Ciência Hoje, v. 30, p. 62-67. 2002.

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

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. **Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes)**. Heredity, v. 94, p. 180-186. 2005.

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Fish communities in tropical freshwaters – Their distribution, ecology and evolution.** London; Longman; p. 337. 1975.

LIMA, F.C.T. **Genera Incertae Sedis in Characidae.** In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, Jr C.J. (Org.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 106-169. 2003.

LIMEIRA, D.M.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. **Allozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí River, upper Paraná River basin, Brazil.** Genetics and Molecular Biology. 2009.

LUDWIG, L.A.M.; GOMES, E.; ARTONI, R.F. **A method of induced reproduction for surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae) of the rio Iguaçu.** Publicatio UEPG: Biological and Health Sciences, v. 11, n. 3/4, p. 23-27. 2005.

LUNDBERG, J.G.; MAGO-LECIA, F.; NASS, P. ***Exallodontus aguanai*, a new genus and species of pimelodiade (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South América and delimitation of the subfamily pimelodinae.** Proceedings Biological Society of Washington, v. 104, n. 4, p. 840-869. 1991.

LUNDBERG, J.G.; LITTMANN, M.W. **Family Pimelodidae.** In: Reis, Kullander; R. E., S. O.; Ferraris Jr; C. J. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, EdipucRS, p. 432-446. 2003.

MACK, R.N. **Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control.** Ecological Applications, v. 10, p. 689-710. 2000.

MARQUES, E.E. **Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto rio Paraná.** Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 104p. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. 1993.

MARQUES, M.B.A. **Estudos citogenéticos em *Conorhynchos conirostris* e *Lophiosilurus alexandrii* (Pisces, Siluriformes), espécies endêmicas do rio São Francisco.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.

MARTINS, C.; GALETTI Jr, P.M. **Chromosomal location of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes).** Chromosome Research, v. 7, p. 363–367. 1999.

MARTINS, C; GALETTI Jr, P.M. **Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes.** Chromosome Research, v. 8, p. 353-355. 2000.

MARTINS, C; GALETTI Jr, P.M. **Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers.** Genome, v. 44, p. 903-910. 2001.

MARTINS-SANTOS, I.C., JULIO Jr., H.F., BURIN, E.I. **Karyotypic studies of four species of the Sorubiminae subfamily (Pisces, Siluriformes)**. Caryologia, v. 49, p. 73-80. 1996.

MEES, G.F. **Auchenipteridae and Pimelodidae**. Zoologische Verhandelingen, v. 132, p. 115-246. 1974.

MONTOYA-BURGOS, J.I. **Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna**. Molecular Ecology, v. 12, p. 1855-1867. 2003.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. ***Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex**. Brazil. J. Genetics, v. 14, p. 331-357. 1991.

MIRANDA, M.O.T. **Surubim**. Belo Horizonte, IBAMA, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, p. 19. 1997.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. ***Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex**. Brazilian Journal of Genetics, v. 14, p. 331-357. 1991.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. John Wiley e Sons, New York. 600p. 1994.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. **Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae)**. Caryologia, v. 41, p. 227-236. 1988.

OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A.E.A. **Cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes**. Caryologia, v. 53, n. 1, p. 31-37. 2000.

OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F. **Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives**. Netherlands Journal of Zoology, v. 42, n. 2/3, p. 277-290. 1992.

PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. **Multi-chromosoma location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout**. Chromosome Research. v. 1, p. 63-67. 1993.

PETRERE Jr., M. **A pesca de água doce no Brasil**. Ciência Hoje, v. 19, n. 110, p. 28 a 33, junho de 1995.

PINNA, M.C.C. **Phylogenetics relationships of neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypotheses**. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Ed.). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 279-330. 1998.

PINKEL, D.; STRAUME, P.; GRAY, J.W. **Cytogenetics analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization**. Proceedings of National Academic Science USA, v. 83, n. 2934-2938. 1986.

PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B.G. (Org.). **Fish Cytogenetics**. 1 ed. Enfield, New Hampshire 03748: Science Publishers, v. 1. 2006.

PORTO-FORESTI, F.; ANDREATA, A.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. **The Karyotype of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes) from the Rio Paraguay basin**. Chromosome Science, v. 4, n. 99-102. 2000.

PORTO-FORESTI, F. **Pesquisas genéticas em recursos pesqueiros da bacia do Paraguai. I. Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e Piauçu (*Leporinus macrocephalus*)**. Proc. 49o. Congr. Nacional Genética, p. 104. 2003.

PRIOLI, A.J.; SEKINE, E.S.; JÚLIO Jr., H.F.; PRIOLI, S.M.A.P. **Genetics diversity between populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces – Siluriformes) isolated by Guaíra Falls of the Paraná River**. Acta Scientiarum, Maringá - PR, v. 24, n. 2, p. 507–512. 2002.

PRIOLI, A.J.; BIGNOTTO, T.S.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, L.M.; CARRER, H.; JÚLIO Jr, H.F. **Análise genética de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces, Siluriformes) com base em sequências do DNA mitocondrial**. In: 49º Congresso Nacional de Genética, 2003. Anais do 49º Congresso Nacional de Genética. Ribeirão Preto - SP: Sociedade Brasileira de Genética, p. 242-242. 2003.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr. **Check list of the Freshwater Fishes of South América**. Porto Alegre: Edipucrs. 2003.

RENESTO, E.; ZAWADZKI C.H.; REVALDAVES, E. **Genetics evidence for two species of the genus *Pimelodus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) in the Iguaçu River (Brazil)**. Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 4, p. 809-813. 2000.

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. **Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification**. Molecular Ecology Notes, v. 5, p. 463-465. 2005.

RIBEIRO, F.R.; LUCENA, C.A.S. **Nova espécie de *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) dos rios Tapajós e Tocantins, Brasil**. Iherigia, Série Zoológica, v. 96, n. 3, p. 321-327. 2006a.

RIBEIRO, F.R.; LUCENA, C.A.S. **A new species of *Pimelodus* La Cépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil**. Neotropical Ichthyology, v. 4, n. 4, p. 411-418. 2006b.

RIBEIRO, L.B.; MATOSO, D.A.; ALMEIDA, M.C.; VICARI, M.R.; MORAES NETO, A.; SVIDNICKI, M.C.; ARTONI, R.F. **Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil)**. Genetics and Molecular Research, v. 7, p. 718-724. 2008.

ROSA, S.R.; LIMA, F.C.T. **Os peixes brasileiros ameaçados de extinção**. In: MACHADO, A.B.; DRUMOND, G.M.; PAGLIA, A.P (Orgs). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, D.F.: Ministério do Meio Ambiente, p. 9-275. 2008.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; SALLUM, W.B.; GODINHO, H.P. **Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma corruscans***. In: Miranda, M.O.T. (org). Surubim. Belo Horizonte: IBAMA. p. 69-79 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19). 1997.

SIVASUNDAR, A.; ELDREGDE, B.; ORTI, G. **Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major south American rivers**. Molecular Ecology, v. 10, p. 407-417. 2001.

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

SOUZA, A.B.; FONSECA, C.G.; RIBEIRO, L.P.; PINHEIRO, L.E. **Análise cromossômica do surubim *Pseudoplatystoma corruscans* das bacias dos rios São Francisco e Paraguai**. In: MIRANDA, M.O.T. Surubim, IBAMA, Belo Horizonte. p. 57-68. 1997.

STERBA, G. **Freshwater fishes of the world**. T.F.H. Publications, USA, v. 1 e 2, p. 887. 1973.

SWARÇA, A.C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. **Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes)**. Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 3, p. 589-593. 2000.

SWARÇA, A.C.; CESTARI, M.M.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. **Cytogenetics characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae)**. Chromosome Science, v. 5, p. 51-55. 2001.

SWARÇA, A.C. **Contribuição à Citogenética dos Pimelodidae de Grande Porte: Estudos Cariotípicos de 4 espécies do “subgrupo” Sorubiminae**. Curitiba (PR). Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. 2003.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M.; DIAS, A.L. **First chromosome data on *Steindachneridion scripta* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) from Brazilian rivers: Giemsa, CBG, G-, and RE banding**. Genetics and Molecular Research, v. 4, p. 734–741. 2003.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M.; DIAS, L.A. **Karyotype divergence among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity**. Ichthyological Exploration Freshwaters, v. 16, n. 4, p. 325-330. 2005.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.; BERTOLLO, L.A.C.; DIAS, A.L. **Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae)** Cytogenetic Genome research, v. 112, p. 325-328. 2006.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; DIAS, A.L. **An update cytogenetics review for species of the families Pseudomelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a cytotaxonomical classification.** Caryologia, v. 60, p. 338-348. 2007.

TRECO, F.R.; MALABARBA, L.R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. **Cytogenetics study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil.** Neotropical Ichthyology, v. 6, p. 87-92. 2008.

TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BERNARDINO, G.; CALCAGNOTTO, D. **Monitoramento de conservação em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui.** Cadernos de ictiogenética, v. 2, p. 1-25. 1994.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. **Neotropical Ichthyology: an overview.** In Phylogeny and Classification of neotropical Fishes (MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S., LUCENA, C.A.S., EDS.). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 1-11. 1998.

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

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. **Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins.** Genetics and Molecular Biology, v. 28, n. 1, p. 103-110. 2005.

VISSOTO, P.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. **Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes).** Chromosome Science, v. 3, p. 1-7. 1999.

WELCOMME, ROBIN L. **River fisheries.** Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, Roma, 330p. (FAO Fisheries Technical Papers, 262). 1985.

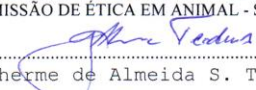
WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, L. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and applications.** Academic Press, Inc. 1990.

ZAWADZKI, C.H.; WEBER, C.; PAVANELLI, C.S.; RENESTO, E. **Morphological and biochemical comparison of two allopatrid populations of *Hypostomus margaritifer* (Regan, 1907) (Osteichthyes, Loricariidae) from the upper Paraná River basin, Brazil.** Acta Scientiarum, Maringá, v. 24, n.2, p. 499-505. 2002.

7. Anexos

Anexo I

Parecer 02/2008 (protocolo 04509/08) da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 SCEEA SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAIS	
PARECER Nº 02/2008 Protocolo: 04509/08	
Em reunião ordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, <u>APROVOU</u> o protocolo de pesquisa intitulado "Biodiversidade, Citogenética e Preservação dos Peixes dos Campos Gerais II" de responsabilidade do Pesquisador Roberto Ferreira Artoni.	
Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.	
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAL - SCEEA  Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus Coordenador substituto da SCEEA	
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 - Ponta Grossa - PR - BRASIL Bloco M Sala 12 - Campus Universitário em Uvaranas Fone (42) 3220-3108 - Fax: (42) 3220-3102 e-mail: sceea@uepg.br Home page: www.uepg.br	

Anexo II

Licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc. no. 15115-1).



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1	Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
------------------------	--

Dados do titular

Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro, c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior, e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBio

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Antoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBio).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796

Página 2/2

Anexo III

Genetics and Molecular Research (2008), 7(3): 718-724.

Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE) from the Tibagi River basin (Parana state, Brazil)

Running title: Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus*

Leila Braga RIBEIRO¹, Daniele Aparecida Matoso², Mara Cristina de ALMEIDA³, Marcelo Ricardo VICARI³, Américo MORAES-NETO³, Maria Carolina Costa Melo Svidnicki³ & Roberto Ferreira ARTONI^{3*}

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, 69060-001 POBox 478 Manaus, AM, Brazil.

² Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Genética. Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

^{3*} Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus de Uvaranas, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil. FAX: +55-42-220-3102. E-mail address: rfartoni@pesquisador.cnpq.br

Abstract

Cytogenetic analyses were carried out in a populational sample of *Iheringichthys labrosus* from the Guaraúna River (Upper Tibagi River; Paraná state, Brazil) in order to provide a karyotypic comparison with another previously studied population from the Lower Tibagi River, characterized by the presence of 32m + 8sm + 6st + 10a (2n=56,

FN=102) and occurrence of supernumerary chromosomes (80% of individuals). The 17 specimens of *I. labrosus* (6 females, 10 males and 1 of sex unknown) from the Upper Tibagi River showed $2n=56$ chromosomes, a karyotype formula of $14m + 32sm + 4st + 6a$ (FN=106), without evidences of sex chromosome heteromorphism or supernumerary chromosomes. The heterochromatin was detected at telomeric and centromeric positions in several chromosomal pairs. The nucleolar organizer regions (Ag⁺NORs) were heteromorphic and located at terminal position on short arms of the 16th chromosomal pair, suggesting a positive association with heterochromatic regions. The inter-populational karyotypic differentiation reported indicates distinct evolutionary pathways within *I. labrosus* in the Tibagi River basin.

Key words: karyotypic evolution, cytotaxonomy, heterochromatin, Ag⁺NORs.

Introduction

The Tibagi River basin comprises 550 km of the Tibagi River and 65 tributaries. Its ichthyofauna is composed of about 110 species, belonging predominantly to the orders Characiformes and Siluriformes (Shibatta et al., 2002). These species might present either a wide karyotypic variability in heterogeneous groups or a conserved karyotype structure (Artoni et al., 2000).

Amongst Siluriformes, the family Pimelodidae has been characterized by a constant diploid number ($2n=56$) in most cytogenetically studied species (Dias and Foresti, 1993; Swarça et al., 2001). However, lower diploid numbers have been reported in some species, such as *Pimelodella* sp. ($2n=46$ chromosomes), along with some cases of remarkable inter-individual and inter-populational variability regarding $2n$ values and the presence of supernumerary chromosomes (Dias and Foresti, 1993).

The demersal catfish *I. labrosus*, found in the Tibagi River and its major tributaries, ranges from small to medium sized individuals, with a grayish-silver coloration and small spots on the dorsal region (Shibatta et al., 2002). Previous studies have shown a diploid number of $2n=56$ chromosomes for this species, together with the presence of supernumerary chromosomes in 80% of individuals within the sampled population (Carvalho et al., 2004; Carvalho and Dias, 2005; 2007). In the present work, another *I. labrosus* population, collected in the Upper Tibagi River basin, was cytogenetically analyzed in order to compare, under a cytotaxonomic basis, the present results with the available data for the population in the low portion of the Tibagi River.

Material and Methods

Seventeen specimens of *Iheringichthys labrosus* (6 females, 10 males and 1 with sex unknown) were collected in the Guaraúna River, a left- margin tributary from the Upper Tibagi River basin (Ponta Grossa city, Paraná state, Brazil) (Figure 1).

The fish specimens were captured using traps and transported alive, under appropriate oxygen conditions, to the Laboratory of Fish Cytogenetics at Universidade Estadual de Ponta Grossa (PR), in order to obtain mitotic chromosomes. The chromosomal preparation followed the methodology described by Bertollo et al. (1978). Vouched specimens were identified by Dr. O. A. Shibatta and deposited into the Zoology Museum at Universidade Estadual de Londrina (Londrina, PR). Heterochromatin regions were detected according to Sumner (1972) and chromosomes were stained with propidium iodide. The nucleolar organizer regions (Ag^+ NORs) were analyzed after silver nitrate staining (Howell and Black, 1980).

The karyotypes were organized into pairs in decreasing size order and chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) and acrocentric (a), according to the arm ratio (Levan et al., 1964).

Results

The analysis of mitotic metaphases revealed the presence of $2n=56$ chromosomes in all studied specimens, without evidences of morphologically differentiated sex chromosome systems or supernumerary chromosomes. The karyotype is composed of 7 pairs of metacentric chromosomes, 16 pairs of submetacentric chromosomes, 2 pairs of subtelocentric chromosomes and 3 pairs of acrocentric chromosomes, with a fundamental number equal to 106 (Figure 2a).

The constitutive heterochromatin was faintly detected, in small amounts, over telomeric and centromeric segments of several chromosomes, especially located in the telomeric regions of the 2nd chromosomal pair (Figure 2b). The nucleolar organizer regions were heteromorphic and located at terminal position on short arms of the 16th submetacentric pair, associated with heterochromatic regions (Figure 2c).

Discussion

The diploid number of $2n=56$ chromosomes is the most frequent $2n$ value reported in the family Pimelodidae, including *Iheringichthys labrosus* (Dias and Foresti, 1993; Vissoto et al., 1999; Carvalho et al., 2004). Nevertheless, the karyotype formula ($14m + 32sm + 4st + 6a$) and a fundamental number (FN) of 106, as observed in the present study, for the population of *I. labrosus* from the Upper Tibagi River, differs from that previously reported for another population of this species from the Lower Tibagi River. In the latter, a karyotype formula with $32m + 8sm + 6st + 10a$ and a fundamental number (FN) of 102 was detected (Carvalho et al., 2004; Table 1). The differentiation

in the karyotype formula, showing either an increase or a decrease of chromosome arms without alterations in the diploid number ($2n$), suggests that non-Robertsonian chromosomal rearrangements have taken place, such as pericentric inversions, leading to the karyotypic variability observed in these populations. Although lower fundamental numbers have been regarded as a basal condition for some Siluriforme families, such as Loricariidae (Artoni and Bertollo, 2001; Kavalco et al., 2005), ancestor features among distinct karyotypes can only be reliably defined by comparisons with outgroup comprising taxonomically related species, in order to polarize the transformation sequence in the fundamental number (FN). In this context, it is impossible to define, at the moment, which karyotypic formula of the *I. labrosus* is more conserved or derived.

Another remarkable karyotypic differentiation between the two studied populations of *I. labrosus* can also be pointed out. The Lower Tibagi River population, studied by Carvalho et al. (2004), showed supernumerary chromosomes in 9 out of 11 specimens (frequency=80%). Inversely, in our study comprising 17 specimens from the Upper Tibagi River, no evidences of supernumerary chromosomes were found. The presence of supernumerary chromosomes has been frequently reported in several neotropical fish groups, reflecting a putative condition of both random and parasitic meiotic segregation in relation to the standard complement (Camacho et al., 2000). These extra chromosomes have been considered important indicators of populational differences. For instance, Artoni et al. (2006), analyzing a migratory neotropical fish species (*Prochilodus lineatus*), detected differences in the number and morphology of supernumerary chromosomes between two populations from the Upper Paraná River basin. Although these chromosomes share a common origin, related to the formation of isochromosomes, the selective pressure on distinct populations have, supposedly, led to the outcome of both different types and frequencies of supernumerary

chromosomes in each population of *Prochilodus lineatus*. A similar scenario might be hypothesized for the two populations of *I. labrosus*, or the presence of these distinguishable chromosomes could represent a single and apomorphic feature for *I. labrosus* from the Lower Tibagi River.

The centromeric and telomeric poorly marked heterochromatin has been commonly observed in chromosomes of members of the family Pimelodidae (Fenocchio and Bertollo, 1992; Swarça et al., 2003). Nonetheless, *I. labrosus* from the Upper Tibagi River reveals the presence of conspicuous heterochromatic bands on both short and long arms of the 2nd metacentric pair, which might represent a cytogenetic marker for the population herein analyzed. Such a situation has been frequently reported in some species of pimelodids and heptapterids, suggesting that this chromosome could constitute a shared feature and a marker trait for both families (Garcia and Moreira-Filho, 2005).

Heteromorphisms of nucleolar organizer regions are very common in fish and they are likely determined by unequal cross-over, gene duplication, transposition or other rearrangements involving homologous chromosomal segments (Borin and Martins-Santos, 2000; Vicari et al., 2003; 2006). Such NOR heteromorphic condition has already been formerly reported in a population of *I. labrosus* from the Capivara reservoir, Paraná, Brazil (Carvalho and Dias, 2007). Thus, this polymorphic variability involving activity of ribosomal cistrons is also present in *I. labrosus* from the Upper Tibagi River, although the presence of a single nucleolar organizing chromosomal pair seems to be common and ancestral among the pimelodids.

In conclusion, the karyotypic differentiation found among the populations of *I. labrosus* indicates that these groups could be restricted in their environmental range related to distinct evolutionary pathways for each population. The behavior of the studied species, a non-migratory demersal fish, would favor the degree of karyotypic

differentiation found, reinforcing the possible occurrence of reproductively isolated populations within the same hydrographic basin.

Acknowledgments

We thank Dr. O. A. Shibatta for identifying the specimens and to Miguel A. Carvalho for the technical support. Financial supported by CNPq and Fundação Araucária.

References

- Artoni RF and Bertollo LAC (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.
- Artoni RF, Vicari MR and Bertollo LAC (2000). Neotropical fish cytogenetics. Methods, results and perspectives. *Publicatio UEPG* 6(1): 41-60.
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277-84.
- Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1:103–120.
- Borin LA and Martins–Santos I C (2000). Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguaçu river basin. *Genetica* 106: 215–221.
- Camacho JPM, Sharbel TF and Beukeboom LW (2000). B chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 355: 163–178.

Carvalho RA, Giuliano–Caetano L and Dias AL (2004). Cytogenetic analysis of A- and B- chromosomes of *Iheringichthys labrosus* from Tibagi River, Paraná, Brazil. *Cytologia* 60(4): 381 – 385.

Carvalho RA and Dias AL (2005). Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genetics and Molecular Research* 4(4): 663–667.

Carvalho RA and Dias AA (2007). Individual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:141-146, 2007.

Dias AL and Foresti F (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Brazilian Journal of Genetics* 16(3): 585-600.

Fenocchio AS and Bertollo LAC (1992). Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69: 41-46.

Garcia C and Moreira-Filho O (2005). Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology* 3(2):285-290.

Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1915.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94: 180-186.

Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Shibatta OA, Orsi ML, Bennemann ST and Silva-Souza A (2002). Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA and Pimenta JA (eds), *A Bacia do Rio Tibagi*, Londrina, Brasil, 403-423.

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

Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res* 75: 304-306.

Vicari MR, Artoni RF and Bertollo LAC (2003). Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenet Genome Res* 101: 24-28.

Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O and Artoni RF (2006). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology* 29: 621-625.

Vissoto PC, Foresti F and Oliveira C (1999). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3: 1-7.

Table 1. Frequency of B chromosomes in somatic cells of *Iheringichthys labrosus* from the Tibagi River basin. (M) = male; (F) = female; (I) = sex unknown; (2n) = diploid number; (FN) = fundamental number; (1) Present work; (2) Carvalho et al. (2004).

Individual number/ sex	2n/FN/Karyotype	Number of B-chromosomes				Total of cells	Ref.
		0	1	2	3		
1 F	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	11	0	0	0	11	1
2 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	32	0	0	0	32	1
3 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	14	0	0	0	14	1
4 F	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	37	0	0	0	37	1
5 I	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	3	0	0	0	3	1
6 F	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	12	0	0	0	12	1
7 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	8	0	0	0	8	1
8 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	5	0	0	0	5	1
9 F	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	4	0	0	0	4	1
10 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	17	0	0	0	17	1
11 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	15	0	0	0	15	1
12 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	11	0	0	0	11	1
13 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	5	0	0	0	5	1
14 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	9	0	0	0	9	1
15 M	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	6	0	0	0	6	1
16 F	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	21	0	0	0	21	1
17 F	56 / 106 / 14m+32sm+4st+6a	4	0	0	0	4	1
18 F	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	23	7	0	0	30	2
19 M	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	28	1	0	0	29	2
20 F	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	31	4	0	0	35	2
21 M	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	34	0	0	0	34	2
22 F	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	37	0	0	0	37	2
23 M	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	22	10	7	8	47	2
24 F	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	13	27	4	4	48	2
25 F	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	9	11	8	4	32	2
26 F	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	48	4	0	0	52	2
27 M	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	52	2	0	0	54	2
28 I	56 / 102 / 32m+8sm+6st+10a	22	6	4	2	54	2

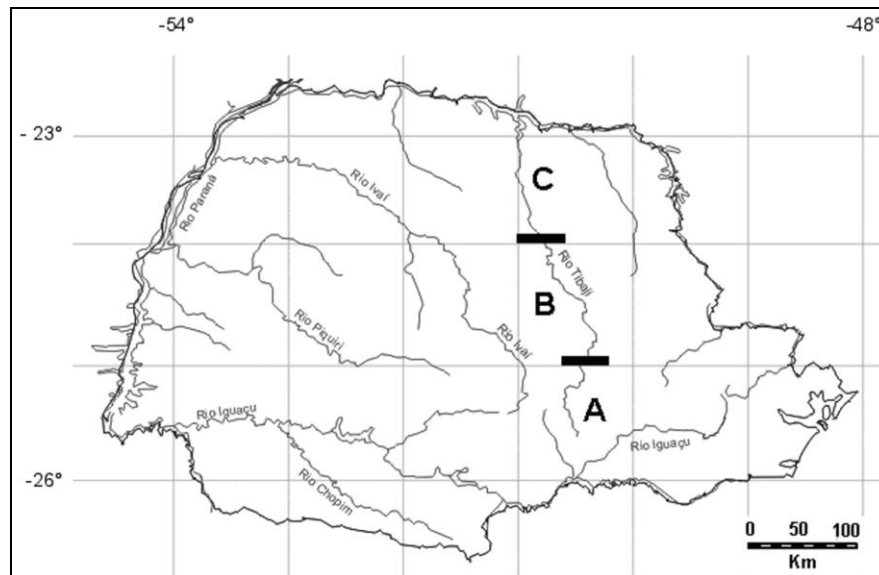


Figure 1: Map of Paraná state, Brazil, focusing on the Tibagi River basin. (A) Upper Tibagi River, (B) Middle Tibagi River and (C) Lower Tibagi River.

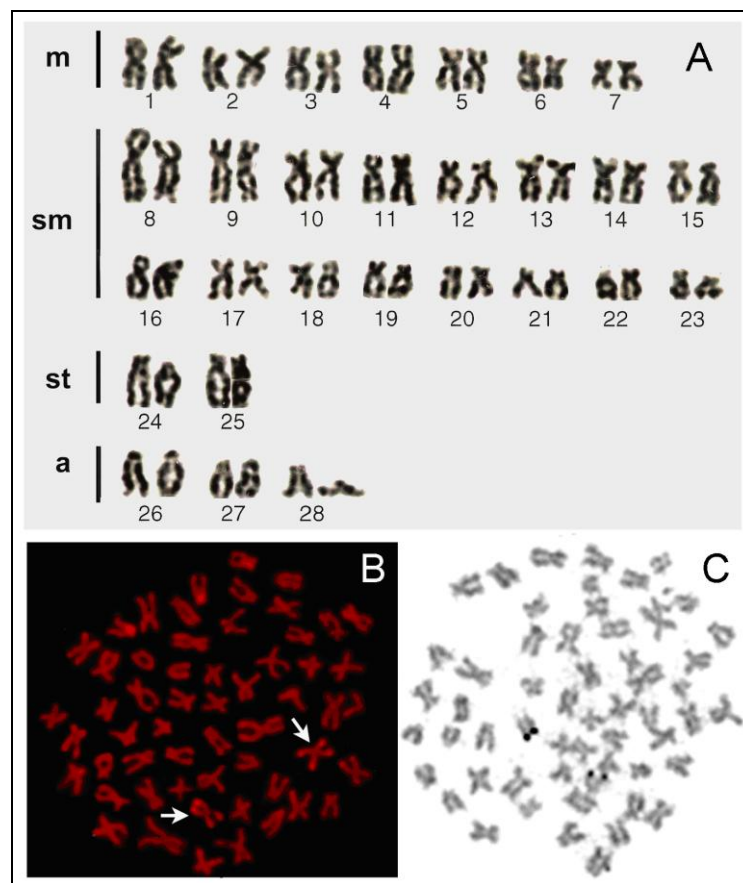


Figure 2: Karyotype and mitotic metaphase chromosomes of *Iheringichthys labrosus* from Upper Tibagi River after Giemsa staining (a), C-banding stain with propidium iodide (b) and impregnation with silver nitrate (c), respectively. The arrows indicate a metacentric chromosomal pair with bitelomeric heterochromatin segments in (b) and the chromosomes bearing Ag⁺NORs in (c).

Anexo IV

Protocolo de Estimulação de Mitoses (OLIVEIRA et al.,1988)

- 1) Preparar uma solução de fermento biológico na seguinte proporção: 05 g de fermento, 1,5 g de açúcar e 6 ml de água destilada;
- 2) Incubar a solução em estufa a 37°C por cerca de 10 min;
- 3) Injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100g de peso do animal;
- 4) Manter o animal em aquário bem aerado no período de 48h antes do sacrifício.

Anexo V

Preparação Direta para Obtenção de Cromossomos Mitóticos de Peixes (BERTOLLO et al., 1978)

- 1) Injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
- 2) Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 40 a 50 min;
- 3) Sacrificar o animal, após anestesia por imersão em solução aquosa por benzocaína 1%, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 10 ml de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4) Dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de seringas, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5) Transferir 15 ml da solução obtida para um tubo de centrífuga e incubar este no interior de uma estufa a 37°C por 30 a 40 min;
- 6) Retirar o tubo da estufa e adicionar 600 µl de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); misturar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar em repouso por 1 min à temperatura ambiente;
- 7) Levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;

- 8) Retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em cerca de 10 ml de fixador; centrifugar por 10 min a 900 ± 100 rpm;
- 9) Repetir o item 8 por três ou quatro vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 10) Pingar o material sobre lâminas aquecidas em água a 59°C ou estocar em microtubos do tipo Eppendorf em freezer a -20°C ;

* Deixar secar ao ar caso opte por pingar o material na lâmina. As lâminas podem ser guardadas após em congelador por período longo variável.

Anexo VI

Deteccção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO_3). (HOWELL e BLACK,1980)

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por HOWELL & BLACK (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C .

O procedimento para a coloração das Ag^+ NORs foi o seguinte:

- 1) Pingar 150 μl da solução A e 300 μl da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 2) Deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria ou dentro de uma estufa a 60°C . Em aproximadamente 3 minutos, a mistura das soluções se

torna marrom dourada, e após isso, lavar a lâmina em água corrente, retirando a lamínula e deixar secar em temperatura ambiente;

3) Corar as lâminas com Giemsa, diluída 5% em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 3 minutos e deixar em temperatura ambiente (aproximadamente 37°C).

Anexo VII

Bandamento C (SUMNER, 1972)

Para coloração diferencial de regiões cromossômicas heterocromáticas seguiu-se o método de SUMNER (1972), com adaptações como segue:

1) Hidrolisar uma lâmina com preparações cromossômicas previamente preparada em HCl 0.2N a 42°C por 6 minutos e lavar em água destilada;

2) Colocar a lâmina em uma solução saturada de Ba(OH)₂ por cerca de 1 minuto;

3) Lavar a lâmina rapidamente em HCl 0.2N para retirar o excesso da base e em seguida lavar em água destilada;

4) Incubar a lâmina em estufa a 60°C em um recipiente contendo 2xSSC por cerca de 60 minutos e após esse procedimento lavar em água destilada;

5) Corar a lâmina com Giemsa 10% em tampão fosfato pH=6,7 por aproximadamente 10 minutos;

6) Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar a temperatura ambiente.

Anexo VIII

Localização Cromossômica de Sondas de DNA_r 5S e 18S por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH). (PINKEL et al.,1986; HATANAKA e GALETTI Jr., 2004; MARTINS e GALETTI Jr., 1999)

Marcação da sonda por nick translation (Kit Nick Translation Biotin ou digoxigenin - ROCHE)

1. pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo:

2. x μ l água qsp;
3. x μ l sonda (1 μ g);
4. 4 μ l mix de nick;
5. completar para o volume total de 20 μ l;
6. interromper com 1 μ l de EDTA 0,5 M pH 8,0;
7. aquecer por 10 min à 65 C.

Tamanho dos fragmentos em gel

1. 2 μ l da reação de nick translation
2. 1 μ l de azul de bromofenol
3. aplicar em gel de agarose 0,8% mais brometo de etídeo (1 μ l);
4. correr a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos.

Fluorescent in situ hybridization – Protocolo p/ 10 lâminas

Tratamento com RNase

1. Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente (shaker);
2. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar);
3. Incubar as lâminas em 100 μ l de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
4. Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
5. Lavar durante 5 min em PBS 1x.

OBS. Durante a incubação na RNase preparar o mix de hibridação, a formamida a 70% a 70°C e o formaldeído;

Tratamento com Pepsina (opcional – pular para passo 8)

6. Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37 C;
7. Lavar em PBS 1x durante 5 min (shaker) a temperatura ambiente;

Fixação

8. Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM $MgCl_2$ durante 10 min a temperatura ambiente;

9. Lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker);
10. Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 min cada;

Pré-hibridação

11. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
12. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min;
13. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.
Obs. A série alcoólica deverá estar a -20°C;

Hibridação

14. Preparar a câmara úmida a 37°C (IMPORTANTE);
15. Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C;

Solução de Hibridação: (estringência 77%) sonda única

- 200 µl Formamida (50% de Formamida);
- 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40 µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 72 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda seca.
- Volume final 400 µl.

Solução de Hibridação: (estringência 77%) duas sondas (DOUBLE FISH)

- 200 µl Formamida (50% de Formamida);
- 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40 µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 36 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda A
- 36 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda B
- Volume final 400 µl.

Lavagens – Segundo dia

16. Lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10min cada (Shaker);
17. Lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 min cada (Shaker);
18. Lavar durante 5min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

Bloqueio

19. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos;

OBS. Antes de incubar alicotar 5 tubos com 1000 µl cada do tampão 5% NFDM/4xSSC

20. Lavar 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

Deteção de duas sondas DOUBLE FISH (continuar do passo 20)

OBS. montar o mix de anticorpos respeitando as concentrações do fabricante.

- 21c. montar um mix contendo 994 µl NFDM + 1 µl de avidina FITC conjugada + 5 µl de anti digoxigenina rodamina conjugada.
- 22c. Incubar as lâminas com 100 µl cada do mix de anticorpos durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- 23b. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);
- 24b. Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar);

Montagem das lâminas com DAPI

21. Misturar 400 µl de antifading mais 1 µl de dapi (0,2 mg/mL);
22. Colocar 50 µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.