



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

SANDRA DOS SANTOS CEREALI

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE LORICARIIDAE
(SILURIFORME) DO PLANALTO DA BODOQUENA -
MATO GROSSO DO SUL**

Londrina
2006

SANDRA DOS SANTOS CEREALI

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE LORICARIIDAE
(SILURIFORME) DO PLANALTO DA BODOQUENA -
MATO GROSSO DO SUL**

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

Orientadora: Profa Dra. Lucia Giuliano-Caetano

Londrina
2006

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C414e Cereali, Sandra dos Santos.
Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriforme) do planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul / Sandra dos Santos Cereali. – Londrina, 2006.
xi, 99f. : il.

Orientador: Lucia Giuliano-Caetano.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Bibliografia: f.95-99.

1. Loricarídeo – Teses. 2. Citogenética animal – Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. 4. Cascudo (Peixe) – Teses. 5. Genética molecular – Teses. I. Giuliano-Caetano, Lucia. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 597.554.4

SANDRA DOS SANTOS CEREALI

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE LORICARIIDAE
(SILURIFORME) DO PLANALTO DA BODOQUENA -
MATO GROSSO DO SUL**

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina

Profa Dra Ana Lucia Dias
Universidade Estadual de Londrina

Profa Dra Isabel Cristina Martins Santos
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 21 de fevereiro de 2006.

À
Valdir, Ana Lúgia e Mariana,
pelo incentivo, dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, sempre.

A Professora **Dra Lucia Giuliano Caetano**, pela orientação, amizade, dedicação, compreensão e convivência. Levo comigo mais que os ensinamentos científicos, mas seu lado humano e sua maneira de priorizar a família, a saúde, sua preocupação com o bem-estar das pessoas com quem convive. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho.

A Professora **Dra Ana Lucia Dias**, por todo auxílio, contribuição ao longo do Mestrado, pela participação na banca examinadora e por sua amizade.

A Professora **Dra Isabel Cristina Martins Santos** pela sua disponibilidade em participar da banca examinadora.

Ao Professor **Dr. Mário Sérgio Mantovani** pela acolhida, amizade e pela participação e contribuições na banca de Qualificação.

Ao Professor **Ms. Otávio Froehlich**, por todo apoio, incentivo, coleta dos peixes, disponibilidade do Laboratório de Zoologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, confecção dos mapas, descrição dos locais de coleta, participação e contribuições na banca de Qualificação, discussão dos resultados, e pela sua amizade e carinho para comigo e minha família.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular por oferecer condições para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço aos **professores** do Programa de Mestrado, pela contribuição dada com sua sabedoria na construção do saber.

Ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo apoio na disponibilidade dos Laboratórios e equipamentos, em especial às Professoras Dra Edna Scremin Dias e **Dra Yvelise Maria Possiede**.

As professoras **Dra Iracelis Laura** e **Dra Elizabeth C. Amaral** por todo apoio e disponibilidade de fotomicroscópios.

Ao Centro de Capacitação em Saúde e Ambiente/CCBS/UFMS, na pessoa de sua coordenadora Bióloga **Ms. Telma Bazzano da S. Carvalho** e todos os **funcionários**, pela amizade e doação de materiais.

A equipe de coleta do **Professor Otávio**, em especial à **Lívia, Marcel** e **Karina**.

Ao Professor **Dr. Cláudio Zawadsk**, da Universidade Estadual de Maringá pela análise dos peixes e elaboração da Chave de Identificação para as espécies novas.

Aos **colegas** da turma de Mestrado.

A querida colega **Renata**, por todo apoio no desenvolvimento da pesquisa e pela amizade que nasceu e cresceu durante o curso.

Aos colegas muito especiais **Tatiana, Rodrigo, Francine, Magda, Nelci** por todos os bons momentos.

Aos queridos colegas calouros **Viviam e Fernando Treco. A Marceléia**, pelo abrigo, pelas horas de discussão dos artigos.

Aos queridos colegas do Laboratório de Citogenética de Peixes e Mutagênese in vivo, em especial a **Andressa** pela hospitalidade, **Helen, Larissa Pires, Kênia, Larissa, Robson**.

Ao colega **Rafael** a primeira pessoa de Londrina que conheci no IX SGCP em Maringá e que muito me incentivou a vir para Londrina.

Aos colegas veteranos **Aline, Marilanda, Leonardo** e aos demais colegas do Laboratório de Mutagênese pela acolhida.

Ao queridos técnicos **Dário e Melissa** por todo auxílio e amizade.

A todos pela amizade, carinho e companheirismo no laboratório e na vida.

A **Emanuele Pomini**, amiga, incentivadora, auxiliar, companheira, coletora e sócia dos peixes, por toda atenção e amizade para comigo e minha família.

A querida amiga e Professora do DBI-UFMS **Ms. Andréa Luiza Cunha Laura** e também ao esposo **Dr. Valdemir Laura**, pelo grande apoio, seja com materiais de laboratório seja com palavras de amizade, incentivo, conforto e reconhecimento.

Aos amigos e compadres **Marcílio e Lia** e as queridas **Thaiana e Bianca**, por todo zelo e cuidado com minha família.

A amiga **Mônica Aratani** pelas horas de conversa por ouvir meus desabafos, por sua amizade.

A amiga **Bertha Frantz**, mais que secretária do DBI-UFMS, uma incentivadora sempre, desde a graduação.

A **Sueli**, por toda atenção e paciência.

A equipe diretiva e corpo docente do Colégio Maria Lago Barcellos, pela atenção dispensada às minhas filhas durante minha ausência, em especial às Professoras **Débora, Lourdes e Raquel** e ao Regente **Rafael**.

Aos meus cunhados **Fátima e Oscar**, sobrinhos **Thiago, Tathy, Andréa e Letícia** e sogra **Dirce** por todo cuidado com minha família.

Ao meu irmão **Gercio**, cunhada **Albertina** e sobrinhas **Cristina, Renata, Allynne e Isabella** pela presença em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, **Manoel e Aparecida**, que sempre me orientaram nos estudos e na vida, com amor e dedicação.

Agradeço de maneira especial ao meu esposo **Valdir** e minhas filhas **Ana Lígia e Mariana**, por suportarem minhas ausências, mesmo quando presente, pelas inúmeras vezes que me acompanharam no laboratório, por toda paciência e todo amor.

Meus agradecimentos à **Ana Lígia** que muito me ajudou no laboratório, com sua presença e efetivo trabalho.

Aos que conviveram comigo antes e durante o Mestrado, meus **familiares, amigos, novos amigos** meu muito obrigada pelo incentivo, amizade e apoio.

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

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

CEREALI, Sandra dos Santos. **Estudos Citogenéticos de Loricariidae (Siluriforme) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul.** 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

O gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803, é composto por peixes de pequeno a grande porte conhecidos popularmente como cascudos. Possui aproximadamente 110 espécies e é considerado como um dos grupos de peixes neotropicais mais diversificados. Foram analisados exemplares de *Hypostomus cochliodon* e *Hypostomus* sp. 3-corrego Salobrinha NUP 4247, coletados no rio Salobra e no córrego Salobrinha e de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido UP 4249, coletados no rio Perdido, Planalto da Bodoquena – MS, Brasil. Existem registros de pelo menos 13 espécies de Loricariidae no Planalto da Bodoquena. Embora a ictiofauna seja peculiar, com muitas espécies endêmicas, não há registros de dados citogenéticos para peixes da região. Em *Hypostomus cochliodon* o cariótipo de todas as fêmeas apresentou número diplóide de 64 cromossomos, 16m+19sm+29st-a, com Número Fundamental (NF) igual a 99, entretanto, o único macho analisado, apresentou 2n=64, 16m+20sm+28st-a, com NF=100. Um par de acrocêntricos possui heteromorfismo de tamanho no macho, mas não nas fêmeas, o que sugere um possível sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY. Todas as fêmeas possuíam um único cromossomo na posição 15 e também um cromossomo acrocêntrico a mais, na posição 22. O padrão de distribuição de heterocromatina detectado por banda C é diferente entre macho e fêmeas. Os acrocêntricos envolvidos no heteromorfismo de tamanho apresentam um bloco bem evidente de heterocromatina na região terminal do braço longo, em ambos os sexos. Nas fêmeas, o acrocêntrico 22 também apresenta um bloco de heterocromatina. A coloração com CMA3 apresentou o padrão de distribuição coincidente com o da banda C, sendo a heterocromatina constituída de regiões GC-ricas. A análise de mais exemplares machos pode confirmar essa hipótese ou mesmo apontar para um polimorfismo de heterocromatina. *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha apresentou dois números modais distintos 2n = 82, 6m + 14sm + 62st-a, NF = 102; 2n = 84, 6m + 14sm + 64st-a, NF = 104. Esse polimorfismo deve-se a presença de dois cromossomos extras não heterocromáticos. Não foi possível definir o número diplóide em quatro exemplares, sendo as linhagens celulares compostas de 2n=83 e 2n=84 cromossomos em um indivíduo, e 2n=82, 2n=83 e 2n=84 cromossomos nos outros. Estes resultados caracterizam a existência de um mosaico genético devido à ocorrência de um a dois cromossomos extras em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247. *Hypostomus* sp. 2- rio Perdido NUP 4249 apresentou número diplóide 2n=84, com cariótipo formado por 6m+16sm+62st-a e NF=106. Tanto em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 quanto em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido o bandamento C evidencia um padrão de distribuição da heterocromatina caracterizado pela presença de poucas bandas na região pericentromérica, além da presença de um bloco bem evidente em posição terminal de braços longos de alguns cromossomos acrocêntricos pequenos. As marcações com CMA3 coincidem com o bandamento C nas duas espécies acima citadas. O maior número diplóide

descrito, até agora, para o gênero era $2n = 80$ cromossomos em *Hypostomus* sp. E, porém *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha NUP 4247 apresentou $2n = 82$ e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 $2n = 84$ cromossomos aumentando a amplitude de variação para este gênero. *H. cochliodon* e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha apresentaram vários cromossomos marcados com $AgNO_3$, porém apenas um par de cromossomos exibiram sítios marcados após a hibridação fluorescente in situ (FISH) com sonda de DNAr 18s. *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 apresentou apenas um par de cromossomos marcados por $AgNO_3$, evidenciando um heteromorfismo de tamanho de RON. A hibridação com a mesma sonda, também revelou apenas um par portador de sítios de rDNA. Nas três espécies as bandas fluorescentes após a coloração com CMA3 apresentam padrão semelhante ao FISH. Os dados citogenéticos caracterizam bem cada espécie estudada, tanto quanto a macroestrutura quanto na microestrutura cariotípica.

Palavras-chave: Hypostominae. Planalto da Bodoquena. Polimorfismo cromossômico. Mosaicismo. Fluorocromos. FISH.

CEREALI, Sandra dos Santos. **Estudos Citogenéticos de Loricariidae (Siluriforme) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul.** 2006. 103f. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

The genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, is composed by fish whose sizes vary from small to large, popularly known as armored catfish. It has 110 species approximately and is considered one of the most diversified groups of neotropical fish. Specimen of *Hypostomus cochliodon* and *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247, collected in the river Salobra and in the stream Salobrinha, as well as of *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249, collected in the river Perdido, Plateau of Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, were analyzed. There are registrations of at least 13 species of Loricariidae throughout the Plateau of Bodoquena – an area of which, despite its peculiar ictiofauna, with many endemic species, there are no registrations of fish cytogenetic data. In *Hypostomus cochliodon* the karyotype of all the females presented the diploid number of 64 chromosomes, 16M+19S+29ST-A, with Fundamental Number (FN) 99, however, the only male analyzed showed $2n=64$, 16M+20SM+28ST-A, with FN=100. An acrocentric pair has size heteromorphism in the male, but not in the females, which suggests a possible system of simple sexual chromosomes the type of XX/XY. All the females had a unique chromosome in the position 15 and also one more acrocentric chromosome in the position 22. The pattern of the distribution of heterochromatin detected in the C-banding is different in the male and the females. The acrocentrics involved in the size heteromorphism exhibit a very evident block of heterochromatin in the terminal area of the long arm, in both sexes. In the females, the acrocentric 22 also shows a heterochromatin block. The staining with CMA3 revealed a distribution pattern coinciding with the one of the C-banding, with CG rich heterochromatin. The analysis of more male specimen may confirm that hypothesis or even incline to a heterochromatin polymorphism. *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 displayed two different modal numbers $2n=82$ 6m+14sm+62st-a and FN=102 and $2n=84$ 6m+14sm+64st-a, FN=104. This polymorphism is due to presence of two extra chromosomes. Four specimen of *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 did not define the diploid number, being the cellular lineages composed of 83 and 84 chromosomes in one individual, and 82, 83 and 84 chromosomes in the other ones, characterizing the existence of a chromosomic mosaicism due to occurrence of a one or two extra chromosomes in that species. *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 presented diploid number $2n=84$, with karyotype formed by 6M+16SM+62ST-A and FN=106. In both *Hypostomus* sp.3-córrego Salobrinha and *Hypostomus* sp.2-rio Perdido NUP 4249 the C-banding evidences a pattern of distribution of heterochromatin characterized by the presence of few bandings in the pericentromeric area, besides the presence of a very evident block in the terminal position of the long arms of some small acrocentric chromosomes. The stainings with CMA3 coincide with the C-banding in the two species above mentioned. The largest described diploid number, for the genus, had been $2n=80$ chromosomes in *Hypostomus* sp. E, however, *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha and *Hypostomus* sp. 2- rio Perdido have

presented $2n=84$ chromosomes, increasing the variation range for this genus. *H. cochliodon* and *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 presented multiple NORs with $AgNO_3$, although only one pair of chromosomes exhibited sites marked after the hybridization fluorescent in situ with probe of rDNA 18S. *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4149 indicated just a pair of chromosomes marked by the impregnation with silver nitrate, evidencing a size heteromorphism of NOR. The hybridization with the same probe, also revealed just a pair with rDNA sites. In the three species the fluorescent bandings with CMA3 display a pattern that is similar to FISH. The cytogenetic data characterize each studied species properly, as well as the macrostructure and the karyotypic microstructure.

Keywords: Hypostominae. Plateau of Bodoquena. Chromosomic polymorphism. Mosaicism. Fluorochromosomes. FISH

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da área de estudo no mapa do Brasil (a) e Localização dos pontos de coleta: córrego Salobrinha (b1), rio Salobra (b2) e rio Perdido (b3).....	31
Figura 2 – a – rio Salobra e b – rio Perdido	32
Figura 3 – Exemplares de <i>Hypostomus cochliodon</i> (a), <i>Hypostomus</i> sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (b) e <i>Hypostomus</i> sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 (c)	33
 Artigo 1	
Figura 1 – Cariótipo com giemsa $2n= 64$ cromossomos em fêmea (a) e macho (b); banda C em macho (c) de <i>Hypostomus cochliodon</i>	45
Figura 2 – Metáfases apresentando o padrão de distribuição de Heterocromatina por banda C (a,c) e marcação com CMA3 (b,d) em <i>H. cochliodon</i> , fêmea (a e b) macho (c e d).....	46
 Artigo 2	
Figura 1 – Histogramas mostrando contagem do número de metáfases em exemplares de <i>Hypostomus</i> sp 3- córrego Salobrinha NUP 4247. M = macho, F = fêmea e J = indivíduo jovem	62
Figura 2 – Citótipos com $2n = 82$ cromossomos (a), $2n = 84$ cromossomos (b) e $2n = 83$ cromossomos(c) de <i>Hypostomus</i> sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247	63
Figura 3 – Cariótipo de <i>Hypostomus</i> sp. 2- rio Perdido NUP 4249 com $2n = 84$ cromossomos (a); constrição secundária observada no par 35: em giemsa (b1), impregnação por AgNO ₃ (b2) e coloração pelo fluorocromo CMA3 (b3)	64
Figura 4 – Metáfases mostrando padrão de distribuição de heterocromatina por bandamento C, coloração com CMA3 e DAPI em <i>Hypostomus</i> sp. 2- rio Perdido NUP 4249 (a, b,c) e <i>Hypostomus</i> sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 (d, e, f), respectivamente	65

Artigo 3

- Figura 1** – (1) Metáfases de *Hypostomus cochliodon*, (2) *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 e (3) *Hypostomus* sp.-2 rio Perdido NUP 4249 (a), após Ag- RON (b) Coloração com CMA3 e (c) hibridação fluorescente in situ com sonda de DNAr 18S.....77
- Figura 2** – Cromossomos portadores de RONs em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 evidenciando o heteromorfismo de tamanho: (a) constrição secundária observada em giemsa; (b) impregnação pelo nitrato de prata e (c) coloração pelo fluorocromo CMA378

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados citogenéticos para Loricariidae. Subfamília/Espécie, Local de coleta, número diplóide ($2n$), cromossomos Bs, cromossomos sexuais, fórmula cromossômica e referência21
- Tabela 2** – Número de cromossomos de macho (M), fêmeas (F) e indivíduos jovens (J) de *Hypostomus cochliodon*. Em negrito o número diplóide modal observado92
- Tabela 3** – Número de cromossomos de macho (M), fêmeas (F) e indivíduos jovens (J) de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247. Em negrito os diferentes números diplóides modais observados93
- Tabela 4** – Citótipos, frequência e quantidade de machos (M), fêmeas (F) e indivíduos jovens (J) de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 424794
- Tabela 5** – Número de cromossomos de machos (M) e fêmea (F) de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 424995

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 PLANALTO DA BODOQUENA.....	16
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LORICARIIDAE	17
1.3 CITOGENÉTICA DE LORICARIIDAE.....	18
1.4 POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS	24
1.5 OBJETIVOS.....	26
1.5.1 Objetivos específicos	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 LOCAIS DE COLETA	27
2.2 ESPÉCIES ESTUDADAS.....	32
2.3 CAPTURA	33
2.4 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS	33
2.4.1 Técnica convencional	33
2.4.2 Técnica alternativa preparações cromossômicas em peixes (KCl)	35
2.4.3 Confeção de lâminas, análises e montagem de cariótipo.....	35
2.4.4 Banda C	36
2.4.5 AgNO ₃	36
2.4.6 CMA3 / DAPI	37
2.4.7 FISH	38
ARTIGO 1	41
3 EVIDÊNCIAS DE POSSÍVEL SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS EM HYPOSTOMUS COCHLIODON (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS	41
ARTIGO 2	54
4 DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE HYPOSTOMUS (PISCES, SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS	54

ARTIGO 3	73
5 DETERMINAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS EM TRÊS ESPÉCIES DE <i>HYPOSTOMUS</i> (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS	73
6 CONCLUSÕES	86
7 PERSPECTIVAS	88
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	95
ANEXO 1 – Chave provisória para os <i>Hypostomus</i> do Planalto da Bodoquena	96
ANEXO 2 – Tabelas de contagens cromossômicas em <i>Hypostomus cochliodon</i> , <i>Hypostomus</i> sp. 2-rio Perdido NUP 4249 e <i>Hypostomus</i> sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANALTO DA BODOQUENA

O Planalto da Bodoquena, ou Serra da Bodoquena como é popularmente conhecido, localiza-se nos municípios de Bonito e Bodoquena e em parte de Jardim e Porto Murtinho em Mato Grosso do Sul. É sustentado por rochas calcárias muito duras e muito puras, que por não apresentarem impurezas como argilas, ao se dissolverem possibilitam que as águas permaneçam límpidas, sem turvamento. Os principais rios do Planalto da Bodoquena são os rios Formoso, da Prata, Perdido e Salobra. Todos têm suas nascentes localizadas no Maciço Calcário do rio Perdido ou do rio Salobra (Boggiani, 1999).

Criado por Decreto Presidencial em 21 de setembro de 2000, o Parque Nacional da Serra da Bodoquena possui 76.400 hectares e a área ainda sofre forte pressão madeireira. A Serra da Bodoquena abriga a maior extensão de florestas naturais do Estado. Desde a década de 80, dezenas de profissionais, pesquisadores, conservacionistas e entidades governamentais e não governamentais, reivindicam a proteção especial desta área. O PARNA da Serra da Bodoquena assegura uma região de alta biodiversidade de importância mundial (SEMA/MS, 2004).

Britski *et al.* (1999), estimam a ocorrência de 263 espécies de peixes para a Bacia do Paraguai, porém, Willink *et al.* (2000) indicam que, pelo menos 325 espécies podem ser encontradas nesta região. Levantamentos mais recentes, entretanto, sugerem que este número pode superar as 350 espécies. Segundo os mesmos autores, a ictiofauna da região do Planalto da Bodoquena como um todo é muito peculiar, apresentando muitas formas endêmicas. Esses autores consideraram que a diversidade é alta quando comparada com outras áreas das cabeceiras nos entornos da Planície Pantaneira.

Em geral, as áreas das cabeceiras foram pouco inventariadas e como resultado a ictiofauna é menos conhecida do que a dos canais principais dos rios (Willink *et al.*, 2000). Os mesmos autores ressaltam que a maior incidência de

espécies endêmicas nestas regiões, comparada com a planície alagada, se deve ao fato de que há uma relativa dificuldade de dispersão de uma cabeceira para outra.

As famílias de peixes com mais espécies representadas na região do Planalto da Bodoquena são Characidae, Pimelodidae e Loricariidae, tendo esta última, pelo menos 13 espécies registradas.

Embora Willink *et al.* (2000), relatem a peculiaridade da ictiofauna, com muitas espécies endêmicas, não há registros de dados citogenéticos para peixes da região.

Froehlich (informação pessoal), coletou no rio Perdido, duas espécies novas pertencentes aos gêneros *Astyanax* e *Oligosarcus*, que estão em processo de descrição de espécie. Também foram coletadas três novas espécies de *Hypostomus*: *Hypostomus* sp. 1-rio Perdido, *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha. Os espécimes foram analisados por Cláudio Zawadisk, Nupélia, Universidade Estadual de Maringá, que elaborou uma Chave provisória para identificar essas espécies de *Hypostomus* (Anexo 1).

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LORICARIIDAE

Os Siluriformes compreendem indivíduos de hábitos geralmente bentônicos e noturnos, mas muitos são ativos durante o dia, principalmente quando em águas turvas. (Britski *et al.*, 1999). Os peixes da família Loricariidae, popularmente conhecidos como cascudos ou acarís, apresentam hábitos tipicamente bentônicos. Permanecem junto ao fundo, alimentando-se de detritos orgânicos, raspando algas do substrato ou caçando invertebrados. Apresentam alguns aspectos morfológicos característicos, como corpo achatado e coberto por 4 ou 5 séries longitudinais de placas ósseas, boca do tipo sugadora e presença de odontóides (Burgess, 1989).

Loricariidae possui o segundo maior número de espécies entre os Teleostei. Foram descritas aproximadamente 600 espécies, pertencente a 70 gêneros. Apresentando uma ampla diversidade fenotípica, que muitas vezes dificulta a sistemática.

Armbruster (2004), propõe algumas alterações em Loricariidae: agrupa Lithogeninae com Astroblepus e não com Loricariidae, embora haja dados morfológicos que parecem sugerir que Litogeninae seja irmão de todos os outros loricariideos; propõe agrupar Ancistrinae em Hypostominae, formando uma nova subtribo: Ancistini; inclui os gêneros *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Hemipsilichthys* e *Pareiorhina*, pertencentes a Hypostominae, em Neoplecostominae; informa ainda, que uma nova subfamília para *Detturus* e *Upsilonodus* será descrita em trabalhos futuros.

As revisões em Loricariidae têm utilizado não apenas dados morfológicos (Armbruster, 2004), mas também moleculares (Montoya-Burgos *et al.*, 2002, entre outros), sobretudo em Hypostominae.

Hypostominae é uma das subfamílias mais numerosa de Loricariidae. O gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803, é composto por peixes de pequeno a grande porte, com padrão muito variável de coloração, podendo ou não apresentar manchas; o abdome pode apresentar desde ausência de placas a completamente coberto pelas mesmas, usualmente com placas; a nadadeira caudal é bifurcada com o maior lóbulo na parte superior; duas ou três placas pré dorsais; cinco fileiras de placas no pedúnculo caudal (exceto *H. dlouhyi* com três); placas laterais em quilha ou não (Armbruster, 2004). Possui aproximadamente 110 espécies e é considerado como um dos grupos de peixes neotropicais mais diversificados (Montoya-Burgos, 2003).

1.3 CITOGENÉTICA DE LORICARIIDAE

Embora, Isbrucker (1980 *apud* Artoni & Bertollo, 2001), considere os Loricariidae como a segunda maior família entre os Teleostei, pouco é conhecido sobre a organização cariotípica deste grupo (Artoni & Bertollo, 2001). Não havendo registros citogenéticos para Lithogeninae. Entretanto, alguns estudos relatam informações citogenéticas nas demais sub-famílias como Loricariinae: Scavone & Julio Jr., 1994; Giuliano-Caetano, 1998; Artoni & Bertollo, 2001; Hypoptopomatinae: Andreatta *et al.*, 1992; Andreatta *et al.*, 1993; Andreatta *et al.*, 1994; Hypostominae: Artoni *et al.*, 1998; Artoni *et al.*, 1999; Artoni & Bertollo, 1996, 1999, 2001; Lara-

Kamei & Julio Jr., 2002; Ancistrini: Lara, 1998; Artoni & Bertollo, 2001; Neoplecostominae: Alves, (2000); Kavalco, *et al.*, (2005).

Apesar do pequeno volume de informações comparado com o número de espécies já descritas de Loricariidae, os dados disponíveis demonstram que este é um grupo de grande interesse para estudos em citogenética, devido tanto a variação no número cromossômico, $2n = 36$ em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998) a $2n = 96$ em *Upsilonodus* sp (Kavalco, *et al.*, 2005), quanto a ocorrência de vários rearranjos cromossômicos, sugerindo, segundo Artoni & Bertollo (2001), uma evolução cariotípica divergente.

A variação no número diplóide, acima citada, também é acompanhada de uma ampla variação na fórmula cariotípica. Em *Hypostomus*, um dos gêneros mais estudados da família, Artoni & Bertollo (2001), relatam que cromossomos do tipo meta e submetacêntricos (M/SM) ocorrem mais frequentemente em espécies com menor número diplóide, enquanto subtelo e acrocêntricos (ST/A) são mais abundantes em espécies com número diplóides maiores.

Existem na literatura, relatos de cromossomos B em algumas espécies de Loricariidae: *Microlepdogaster leucofrenatus* em duas localidades (Andreatta *et al.*, 1993 e Andreatta *et al.* 1994); *Loricaria* sp. e *L. prolixa* (Scavone & Julio Jr., 1994).

Sistemas de cromossomos sexuais também são descritos: XX/XY em *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta *et al.*, 1992) e *Hypostomus macrops* (Michelle *et al.*, 1977); ZZ/ZW em *M. leucofrenatus* (Andreatta *et al.*, 1993), *Loricariichthys platymetopon* (Scavone & Julio Jr., 1995) e *Hypostomus* sp. G (Artoni *et al.*, 1998); XX/XY1Y2 em *Hartia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006).

Variações no número, localização e tipos de cromossomos portadores das RONS, também são relatados para os Loricariidae. Duas espécies de Ancistrini *Pananque* cf. *nigrolineatus* e *Hemiancistrus* sp., estudadas por Artoni & Bertollo (2001), mostram apenas um par de cromossomos portador de RONS, embora distintos entre ambas. Os mesmos autores, relatam para Hypostominae a ocorrência de RONS em apenas um par cromossômico em *Hypostomus emarginatus* e *Rhinelepsis asperai*, e dois pares em *Pogonopoma wertheimeri*. Artoni & Bertollo (1996), analisando espécies de *Hypostomus*, encontraram variações quanto ao número e tamanho das RONS entre homólogos, apresentando de 2 até 6

cromossomos portadores de cístrons ribossômicos. Essa variação também é observada em outros grupos de peixes, como em *Eigenmannia* sp (Almeida-Toledo & Toledo-Filho, 1985), *Serrasalmus spilopleura* (Galetti Jr. *et al.*, 1985), *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2000) e *A. altiparanae* (Pacheco *et al.*, 2001).

Nos Loricariidae, em geral, a distribuição de heterocromatina constitutiva, obtida a partir de bandamento C, apresenta blocos pequenos ou moderados, situados na posição telomérica e/ou centromérica. Em algumas espécies, sobretudo de Hypostominae, também podem ser observados blocos maiores e mais evidentes (Artoni & Bertollo 1996, 2001, Artoni *et al.* 1999), podendo se apresentar heteromórficos entre os homólogos (Artoni & Bertollo 1999) ou ainda estar associado a sistemas de cromossomos sexuais, no caso descrito por Artoni *et al.* (1998), em um sistema do tipo ZZ/ZW em *Hypostomus* sp., onde o cromossomo Z possui um bloco mais evidente.

A tabela 1, que apresenta dados cariotípicos de Loricariidae segundo Artoni & Bertollo (2001) e Kavalco. *et al.*, (2005) com modificações.

Tabela 1 – Dados citogenéticos para Loricariidae. Subfamília/Espécie, Local de coleta, número diplóide (2n), cromossomos Extras (Ex) ou Bs, cromossomos sexuais, fórmula cromossômica e referência (Ref.). M = metacentrico; SM = submetacentrico; ST = subtelo-centrico; A = acrocentrico; AC = Acre; AM = Amazonas; BA = Bahia; MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; MT = Mato Grosso; PA = Pará; PR = Paraná; RJ = Rio de Janeiro; RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo – Estados Brasileiros; ARG = Argentina.

Subfamília Espécies	Local	2n	Ex. ou Bs	Crom. Sexual	fórmula cromossômica	Ref.
Hypoptopomatinae						
<i>Hisonotus gibbosus</i>	Rio Betari (SP)	58	-		—	1
<i>Microlepidogaster depressicauda</i>	Rio Santo Inácio (SP)	54	-		14m 28sm 2st 10a	2
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	Rio Poço Grande (SP)	54	1 a 2	ZZ/ZW	48sm 8st	3
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	Rio Marumbi (PR)	54	1 a 2	ZZ/ZW	22m 24sm 4st 2a	2
<i>Microlepidogaster</i> sp. 1	Rio Alambari (SP)	54	-		30m 20sm 4st	2
<i>Microlepidogaster</i> sp. 2	Córrego Moia (SP)	54	-		22m 28sm 4st	2
<i>Microlepidogaster</i> sp.	Córrego Jacutinga (SP)	54	-		—	4
<i>Microlepidogaster</i> sp.	Córrego Quinta (SP)	54	-		—	5
<i>Otocinclus</i> aff. <i>vestitus</i>	Rio Livramento (PA)	72	-		22m 12sm 4st 34a	2
<i>Otocinclus affinis</i>	Rio Biguá (SP)	54	-		46m 8sm	2
<i>Otocinclus affinis</i>	Rio Bonito (RJ)	54	-		40m 12sm 2st	2
<i>Pseudocinclus maculicauda</i>	Rio Poço Grande (SP)	54	-		20m 32sm 2st	6
<i>Pseudocinclus tietensis</i>	Rio Grande (SP)	54	-	XX/XY	26m 20sm 6st	7
<i>Pseudotothis obtusa</i>	Rio Itanhaém (SP)	54	-		26m 18sm 4st 6a	2
Loricariinae						
<i>Harttia kronei</i>	Rio Betari (SP)	58	-		42m/sm 16st/a	8
<i>Harttia loricariiformis</i>	Córrego Grande (SP)	52	-		32m/sm 20st/a	8
<i>Harttia loricariiformis</i>	Rio Paraitinga (SP)	56	-		16m 22sm 10st 8a	9
<i>Harttia carvalhoi</i>	Rio Paraíba do Sul	52 Fêmea 53 Macho		XX/XY ₁ Y ₂ XX/XY ₁ Y ₂	18m 18sm 8st 8a 17m 18sm 8st 10a	10
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Solimões (AM)	62	-		—	11
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Paraná (PR)	64	1 a 5		10m 6sm 4st 44a	12
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Guaíba (RS)	66	-		2m 2st 62a	8
<i>Loricaria macrodon</i>	—	58	-		18m 2sm 38st/a	13
<i>Loricaria parva</i>	—	48	-		—	14
<i>Loricaria prolixa</i>	Rio Paraná (PR)	62	1 a 5		20m 4sm 38a	12
<i>Loricariichthys</i> sp.	Rio Paraná (ARG)	54	-		6m 26sm 4st 18a	15
<i>Loricariichthys platymetopom</i>	Rio Paraná (PR)	54	-	ZZ/ZW	6m 20sm 4st 24a	16,17
<i>Rineloricaria</i> sp.	Rio Betari (SP)	70	-		2m/sm 68st/a	8
<i>Rineloricaria kronei</i>	Córrego Cavallo (RS)	64	-		6m/sm 58st/a	8
<i>Rineloricaria kronei</i>	Rio Itapocu (SC)	64	-		6m/sm 58st/a	8
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Passa Cinco (SP)	44	-		12m 4sm 28a	18
		44	-		10m 4sm 30a	18
		44	-		13m 2sm 29a	18
		44	-		13m 4sm 27a	18
		44	-		13m 1sm 30a	18
		44	-		10m 4sm 30a	18
		44	-		10m 3sm 31a	18
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Passa Cinco (SP)	46	-		10m 3sm 33a	18

Continuação

Subfamília Espécie	Local	2n	Ex. ou Bs	Crom. Sexual	fórmula cromossômica	Ref.
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	36	-		24m/sm 12st/a	18
		37	-		23m/sm 14st/a	18
		38	-		22m/sm 16st/a	18
		39	-		21m/sm 18st/a	18
		40	-		20m/sm 20st/a	18
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Ribeirão Três Bocas (PR)	43	-		17m/sm 26st/a	18
		44	-		16m/sm 28st/a	18
		46	-		14m/sm 32st/a	18
		47	-		13m/sm 34st/a	18
		48	-		12m/sm 36st/a	18
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Passa Cinco (SP)	44	-		16m/sm 28st/a	18
		45	-		15m/sm 30st/a	18
		46	-		14m/sm 32st/a	18
		47	-		13m/sm 34st/a	18
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Ribeirão Kelle (PR)	56	-		8m/sm 48st/a	18, 19
<i>Sturisoma cf. nigrirostrum</i>	Rio Araguaia (MT)	74	-		20m 18sm 36st/a	20
Hypostominae						
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	Bacia Rio Paraguai (MT)	44	-	ZZ/ZW	18m 10sm 16st/a	21
<i>Ancistrus sp.</i>	Rio Paraná (PR)	48	-		18m 14sm 12st 4a	22
<i>Ancistrus sp.</i>	Rio Betari (SP)	52	-		32m/sm 20st/a	8
<i>Ancistrus sp.</i>	Rio Itapocu (SC)	52	-		28m/sm 24st/a	8
<i>Ancistrus sp.</i>	Córrego São Francisco (AC)	38	-		30m/sm 8st/a	8
<i>Hemiancistrus sp</i>	Rio Araguaia (MT)	52	-		20m 20sm 12st/a	20
<i>Hypostomus affinis</i>	Córrego Jacuí (SP)	66	-		14m 14sm 12st 26a	9
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	74	-		10m 20sm 44st/a	23
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Córrego Monjolinho (SP)	68	-		16m 18sm 34st/a	23
<i>Hypostomus aff. auroguttatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	76	-		8m 30sm 38st/a	23
<i>Hypostomus emarginatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	-		16m 30sm 6st	20
<i>Hypostomus macrops</i>	—	68	-	XX/XY	10m 14sm 44st/a	13
<i>Hypostomus paulinus</i>	—	74	-		10m 20sm 44st/a	13
<i>Hypostomus plecostomus</i>	—	54	-		36m/sm 18st/a	24
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	-		10m 20sm 42st/a	23
<i>Hypostomus sp.</i> 3-córrego Salobrinha NUP 4247	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	82	1 a 2		6m 14sm 62st/a	28
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	64 macho	-	Provável XX/XY	16m 20sm 28st/a	28
		64 fêmea	-	Provável XX/XY	16m 19sm 27st/a	28
<i>Hypostomus sp.</i> 2-rio Perdido NUP 4249	Rio Perdido (MS)	84	-		6m 16sm 62st/a	28

continuação

Subfamily Species	Sample locality	2n	Ex. ou Bs	Sex Chrom.	chromosome formulae	Ref.
<i>Hypostomus</i> sp. A	Córrego Rincão (SP)	70	-		18m 14sm 38st/a	23
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	-		12m 18sm 42st/a	23
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	-		13m 18sm 41st/a	25
<i>Hypostomus</i> sp. D1	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	-		10m 26sm 36st/a	23
<i>Hypostomus</i> sp. D2	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	-		14m 20sm 38st/a	23
<i>Hypostomus</i> sp. E	Rio Mogi-Guaçu (SP)	80	-		8m 16sm 56st/a	23
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	76	-		10m 16sm 50st/a	22
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	75	-		10m 17sm 48st/a	25
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64	-	ZZ/ZW	14m 24sm 26st/a	26
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64	-	ZZ/ZW	15m 24sm 25st/a	
<i>Hypostomus</i> sp. 1	Córrego Quinta (SP)	64	-		—	24
<i>Hypostomus</i> sp. 2	Córrego Alambari (SP)	72	-		—	5
<i>Hypostomus</i> sp. 3	Rio Paranapanema (SP)	68	-		—	5
<i>Hypostomus</i> sp. 4	Córrego Hortelã (SP)	66	-		—	5
<i>Megalancistrus aculeatus</i>	Rio Paraná (PR)	52	-		26m 26sm	22
<i>Rhnielepis aspera</i>	Rio Paraná (PR)	52	-		—	5
<i>Panaque</i> cf. <i>nigrolineatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	-		26m 20sm 6st/a	20
<i>Pogonopoma wertheimeri</i>	Rio Macuri (BA)	54	-		20m 26sm 8st	20
<i>Pterygoplichthys multiradiatus</i>	Rio Solimões (AM)	52	-		20m 36sm 4st	20
<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	Rio Preto (SP)	76	-		—	5
<i>Pterygoplichthys</i> ssp	Rio Tietê (SP)	52	-		16m 24sm 8st 4a	27
<i>Upsilonodus</i> sp.	Rio Paraitinga (SP)	96	-		16m 8sm 72a	9
Neoplecostominae						
<i>Neoplecostomus microps</i>	Córrego Grande (SP)	54	-		42m/sm 12st/a	
<i>Neoplecostomus microps</i>	Pindamonhangaba					11
	Córrego Grande (SP)	54	-		42m/sm 12st/a	
<i>Neoplecostomus microps</i>	Campos do Jordão					8
<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio Paraitinga (SP)	54	-		24m 20sm 10st	9
<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Córrego Hortelã (SP)	54	-		36m/sm 18st/a	8
<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	Rio Betari (SP)	54	-		38m/sm 16st/a	8
<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio Betari (SP)	54	-		50m/sm 4st/a	8
<i>Hemipsilichthys splendens</i>	Rio São João (SC)	54	-		50m/sm 4st/a	8
<i>Hemipsilichthys steindachner</i>	Córrego Cavallo (SC)	54	-		40m/sm 14st/a	8
<i>Pareiorhina rudolphi</i>	Córrego Grande (SP)	54	-		48m/sm 6st/a	8

Referências: 1 – Andreatta *et al.* (2000) in Kavalco *et al.* (2005); 2 – Andreatta *et al.* (1994); 3 – Andreatta *et al.* (1993); 4 – Carvalho *et al.* (1998); 5 – Fenerich (1998) in Kavalco *et al.* (2005); 6 – Andreatta (1991) in Kavalco *et al.* (2005); 7 – Andreatta *et al.* (1992); 8 – Alves (2000); 9 – Kavalco *et al.* (2005); 10 – Centofante *et al.* (2006); 11 – Della-Rosa *et al.* (1980) in Artoni & Bertollo (2001); 12 – Scavone & Júlio Jr (1994); 13 – Michelle *et al.* (1977); 14 – Gyldenholm & Scheel (1971) in Kavalco *et al.* (2005); 15 – Fenocchio (1993); 16 – Scavone (1993); 17 – Scavone & Júlio Jr (1995); 18 – Giuliano-Caetano (1998); 19 – Giuliano-Caetano *et al.* (1999); 20 – Artoni & Bertollo (2001); 21 – Mariotto *et al.* (2004); 22 – Artoni (1996); 23 – Artoni & Bertollo (1996); 24 – Muramoto *et al.* (1968) in Artoni & Bertollo (2001); 25 – Artoni & Bertollo (1999); 26 – Artoni *et al.*, 1998; 27 – Artoni *et al.* (1999); 28 – Presente estudo.

1.4 POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS

Variação cromossômica ou cariotípica pode ocorrer entre diferentes células da mesma população ou entre populações diferentes da mesma espécie. Essa variação poderá ser ou não geneticamente programada. No homem o número cromossômico varia de 23, nos gametas, para 46 na maioria das células somáticas e 92, 184 ou mais nos hepatócitos e esta variação faz parte da programação genética da espécie (Guerra, 1988).

As variações não programadas são decorrentes de alterações cromossômicas causadas por agentes mutagênicos ou desequilíbrio na fisiologia normal da célula, como erro meiótico ou mitótico, tumores e infecções, entre outros. Essas variações podem ser associadas a alterações no número ou na estruturas dos cromossomos.

As alterações numéricas podem ocorrer por haploidias, poliploidias, aneuploidias, agmatoploidias e cromossomos B. São mais facilmente detectadas e tem efeito mais drástico para o indivíduo e para a evolução da espécie.

Quanto às alterações estruturais, podem ocorrer por deleções, duplicações, inversões pericêntricas ou paracêntricas, transposições, fissão-fusão cêntricas, translocações simples e recíprocas e isocromossomos. Podem afetar a morfologia e mudar a posição de certos marcadores cromossômicos como o centrômero, a constrição secundária, diversos tipos de bandas. São geralmente melhor toleradas pelo organismo do que as numéricas.

Quando o segmento cromossômico envolvido em uma alteração estrutural é relativamente grande, esta pode ser visualizada em microscópio óptico, em cromossomos gigantes pelas alterações no padrão das faixas dos politênicos ou nas alças dos plumosos; em cromossomos metafásicos mitóticos pela quantidade, tamanho, posição do centrômero e tamanho e posição das bandas; em cromossomos meióticos principalmente na prófase I, observando o pareamento dos homólogos.

Em relação ao cariótipo normal, as variações cromossômicas podem ser vantajosas, desvantajosas ou neutras. As alterações desvantajosas são rapidamente eliminadas das populações e não tem significado evolutivo. Porém quando as alterações neutras ou vantajosas são transmitidas aos descendentes,

contribuem para a variação cariotípica das espécies, denominada polimorfismo cromossômico.

Ainda segundo Guerra (1988), por polimorfismo cromossômico entendese a existência de duas ou mais formas diferentes para o mesmo cromossomo. White (1973), relata que é possível encontrar polimorfismo cromossômico em quase todas as populações naturais.

Dentre os rearranjos cromossômicos as fusões-fissões cêntrica e as inversões têm desempenhado importante papel na evolução de diversos grupos.

No caso da fusão cêntrica, dois cromossomos de um braço podem se reunir no centrômero, originando um cromossomo de dois braços, inversamente, na fissão cêntrica um cromossomo de dois braços pode originar outros dois com um único braço, por segmentação no centrômero. Esses rearranjos modificam a morfologia além de aumentar ou diminuir o número cromossômico ao longo do processo evolutivo. Esses tipos de rearranjos são conhecidos como “robertsonianos” em homenagem a W.R.B. Robertson, que evidenciou pela primeira vez casos de fusões cêntricas, em 1916. A fusão cêntrica também é considerada um tipo especial de translocação, e geralmente é chamada de translocação robertsoniana.

Quanto às inversões, elas podem ser classificadas em dois tipos: a) inversões simples: quando envolvem segmentos do mesmo braço, sem ter relação com o centrômero são chamadas de paracêntricas e quando o centrômero está incluído no segmento invertido são chamadas de pericêntricas; b) inversões complexas: quando se invertem simultaneamente vários segmentos de um mesmo cromossomo.

As inversões pericêntrica são mais facilmente detectáveis, porque estão relacionadas à mudança do tipo cromossômico, geralmente sem que haja alteração do número diplóide, mas envolvendo, quase sempre, alteração no Número Fundamental (NF).

Segundo Guerra (1988), do ponto de vista genético as inversões têm como consequência a restrição ou mesmo o total bloqueio da recombinação gênica na região invertida.

O polimorfismo cromossômico pode ter ao menos 3 efeitos importantes: a) alterar o conjunto gênico em expressão no organismo, devido ao efeito de posição; b) alterar a frequência de recombinação gênica, formando novos grupos de ligação ou bloqueando a recombinação gênica e c) reduzir, ou impedir, o

fluxo gênico dentro de uma população, podendo promover o isolamento reprodutivo, transformando uma população em subpopulações, e contribuindo para o processo de especiação. Além disso o tamanho da população é um fator importante quanto a manutenção ou não de um rearranjo. Normalmente em populações grandes espera-se que o comportamento das mudanças cromossômicas seja influenciado predominantemente pela seleção, embora mecanismos de compensação e acúmulo possam interferir, por outro lado nas populações pequenas, as mudanças cromossômicas podem ser eliminadas ao acaso ou fixadas, como efeito da consangüinidade ou deriva genética (Guerra, 1988).

1.5 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar espécies de peixes da família Loricariidae do Planalto da Bodoquena, MS, contribuindo para a ampliação do conhecimento da citogenética de Loricariidae.

1.5.1 Objetivos específicos

- A. Descrever cromossomicamente espécies de Loricariidae coletadas em pequenos riachos das regiões das bacias dos rios Salobra e Perdido, no Planalto da Bodoquena - MS;
- B. Determinar o padrão de distribuição de heterocromatina nos indivíduos de cada espécie.
- C. Determinar os cromossomos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs).
- D. Determinar as regiões ricas em G-C, marcadas por Cromomocionina A3, fluorocromo G-C específico.
- E. Determinar as regiões ricas em A-T, marcadas por DAPI, fluorocromo AT específico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAIS DE COLETA

As coletas foram realizadas em rios e córregos do Planalto da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil (Figura 1a e b).

O córrego Salobrinha (Figura 1 b) nasce próximo à borda do planalto que delimita a planície do Pantanal, a pouco mais de 600 m de altitude. Corre para leste por cerca de 22 km, atravessando a morraria de calcários na área do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, e deságua no rio Salobra, a cerca de 150 m de altitude. Na sua maior parte, o riacho corre encaixado dentro de um vale estreito e profundo, com relevo acidentado, e está bem preservado. A água apresenta-se muito clara, turvando-se apenas quando chuvas muito fortes causam enxurradas, durante as quais o nível do riacho pode subir mais de dois metros. Por situar-se em região de relevo cárstico, alguns trechos do córrego são intermitentes, correndo em dutos subterrâneos na maior parte do ano (Froehlich, 2003). A vegetação regional é uma mata semidecídua que chega praticamente até as margens do rio, com espécies típicas de mata de galeria ocorrendo junto às margens (Damasceno Jr. *et al.*, 2000).

Os pontos de coleta no córrego Salobrinha (Figura 1 b1) de *Hypostomus cochliodon* estão situados na área de uma fazenda. O fundo é de areia e cascalho, com largura de aproximadamente 8 m e profundidade até 0,7 m. Da vegetação marginal só sobrou uma faixa estreita, nas barrancas do rio, com remanescentes da mata ciliar e bastante bambu. Além disso, pasto. Alguns *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 foram coletados em poções com fundo de pedras.

O rio Salobra (Figura 1 b2 e 2 a) nasce a cerca de 650 m de altitude, atravessa o Parque Nacional da Serra da Bodoquena e deságua no rio Miranda, próximo à cidade de Miranda, a cerca de 120 m de altitude, após percorrer cerca de 170 km. Por cerca de metade do curso corta as morrarias de calcário e apresenta um vale fundo, substrato pedregoso com acúmulo de areia em poções e uma sucessão de corredeiras, pequenas quedas e poções. Na metade inferior do curso, o

rio Salobra apresenta-se meandrante, com uma planície de inundação que vai se alargando em direção à foz. Dentro do PARNA, as margens apresentam matas preservadas, fora dele a mata marginal encontra-se muito degradada, tendo sobrado apenas faixas estreitas de mata marginal, em grande parte substituída por pastos, culturas e bambuzais, havendo matas mais preservadas apenas onde corre junto a penhascos no assentamento Canaã (Otávio Froehlich, informação pessoal).

No local onde foram coletados *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha MUP 4247 e *H. cochliodon*, no trecho em que corta o assentamento Canaã, a largura do rio Salobra (Figura 1 b2) é de cerca de 15 m, profundidade até 2,5 m, fundo de areia, pedras e cascalho. Vegetação marginal – margem esquerda só o que sobrou na barranca, árvores, arbustos e bastante bambu, depois pasto. Na margem direita um pouco melhor porque o rio corre junto a paredões verticais de até 150 m de altura. Mas também alterado e com bastante bambu.

O rio Perdido (Figura 1 b 3 e 2 a) nasce à cerca de 560 m de altitude, corre por cerca de 320 km e deságua no rio Apa, a menos de 100m de altitude. Nos primeiros quase 20 km, corre em terreno plano e é margeado por extensos banhados. A água é muito clara e o substrato é composto por rochas, com acúmulo de sedimentos finos em áreas mais fundas. Após esse trecho, desaparece num sumidouro e vai reaparecer aproximadamente a 2 km depois. Nos próximos 50 km, dentro do PARNA da Serra da Bodoquena, o rio corre encaixado entre dobras abertas da faixa de dobramentos do Paraguai, apresentando uma sucessão de tufas calcárias que formam quedas e separam trechos fundos e de correnteza fraca. Aqui as águas são límpidas, mas a transparência diminui, pois a correnteza muito fraca permite o desenvolvimento de plâncton. Após esse trecho, passa por um desnível de mais de 90 m e vai se tornando mais meandrante até encontrar o Apa, com uma planície de inundação aparecendo no baixo curso. No trecho a jusante do PARNA, ocorreu extensivo processo de assoreamento devido a pastagens mal construídas. Dentro do PARNA, apresenta um trecho onde o vale é estreito e as margens são cobertas por matas ainda bastante preservadas e outro, onde o vale é mais largo e plano, onde há extensos bambuzais e pastagens (Otávio Froehlich, informação pessoal).

Onde foram coletados (Figura 1 b3) *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 o trecho é calmo, com cerca de 10 m de largura e profundidade entre 5 e 11,7 m. Aqui o rio é represado por uma tufa situada cerca de 300 m a jusante da

ponte, onde há cachoeira com pouco fluxo, podendo ser comparado com o lago de uma represa. Margens verticais, com barranco de aproximadamente 3 m e descendo quase verticalmente até o fundo. Água clara, visibilidade de aproximadamente 6 m. Fundo siltooso, com muito acúmulo de paus caídos da mata marginal. Vegetação marginal é mata ainda em bom estado de preservação, apesar exploração de madeira ter acontecido pelo menos nos últimos 40 anos. Presença de *Tilapia rendalli*, aparentemente introduzida há bastante tempo (informações locais). O trecho é peculiar devido a sua fisionomia e por apresentar poucas espécies (apenas nove espécies), mas também porque destas, quatro não foram coletadas em nenhum outro local do planalto da Bodoquena, todas novas para a ciência. Encontra-se dentro da Unidade de Conservação.

Com exceção do rio Perdido, todos os outros rios do Planalto da Bodoquena correm em direção ao rio Miranda, ao Norte. Porém o rio Perdido é o único que corre para o Sul e deságua no rio Apa, formando assim um sistema particular na hidrografia da região.

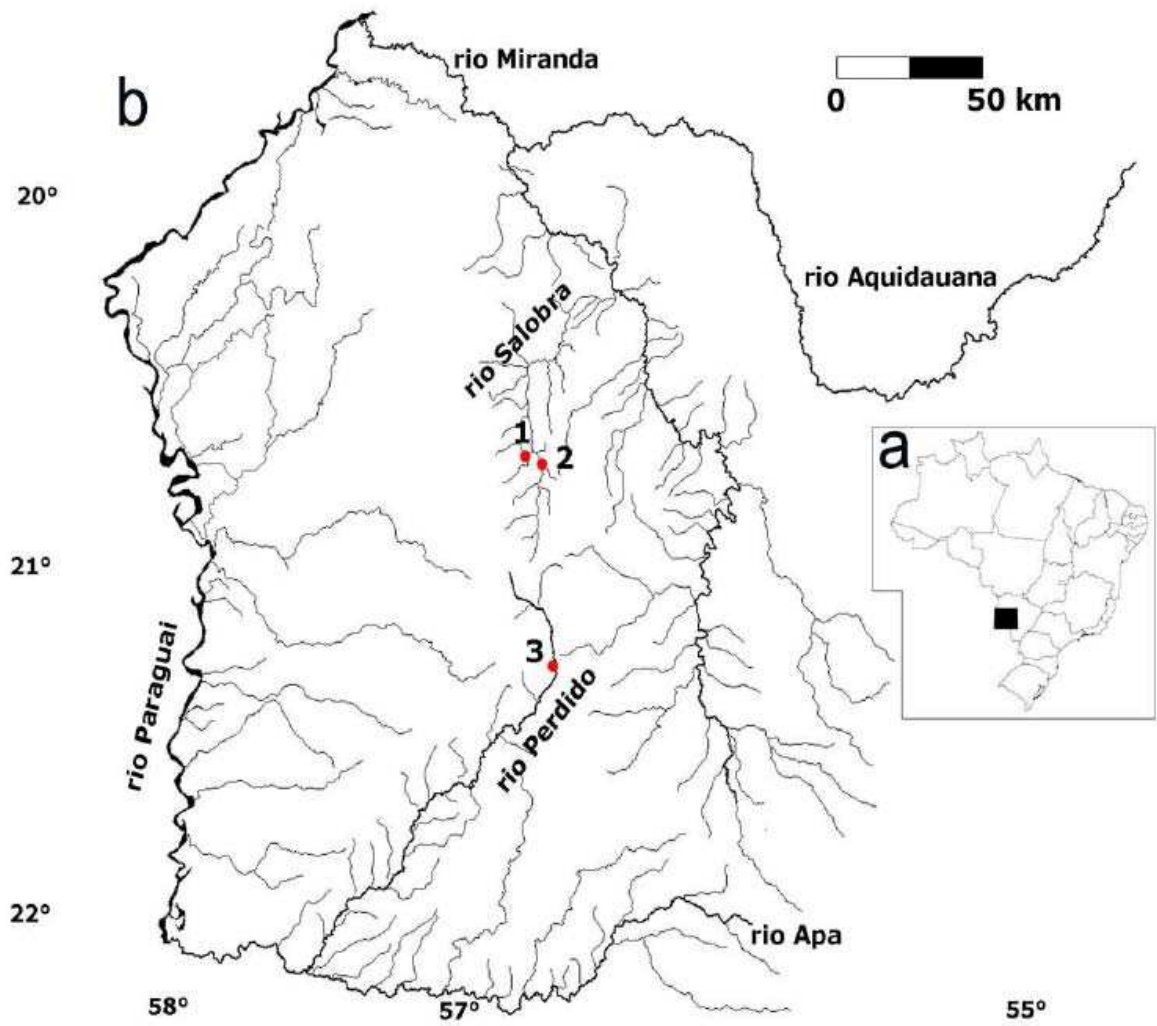


Figura 1 – Localização da área de estudo no mapa do Brasil (a) e Localização dos pontos de coleta: córrego Salobrinha (b1), rio Salobra (b2) e rio Perdido (b3).

a



b



Figura 2 – a – rio Salobra e b – rio Perdido (Boggiani, 1999).

2.2 ESPÉCIES ESTUDADAS

No córrego Salobrinha e no rio Salobra foram coletados 13 exemplares de *H. cochliodon* Kner, 1854, um macho, sete fêmeas e cinco indivíduos jovens (Figura 3 a), 14 exemplares de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247, sendo quatro machos, quatro fêmeas e seis indivíduos jovens (Figura 3c).

No rio Perdido foram coletados cinco exemplares de *Hypostomus* sp. 2- rio Perdido NUP 4249, quatro machos e uma fêmea (Figura 3b).

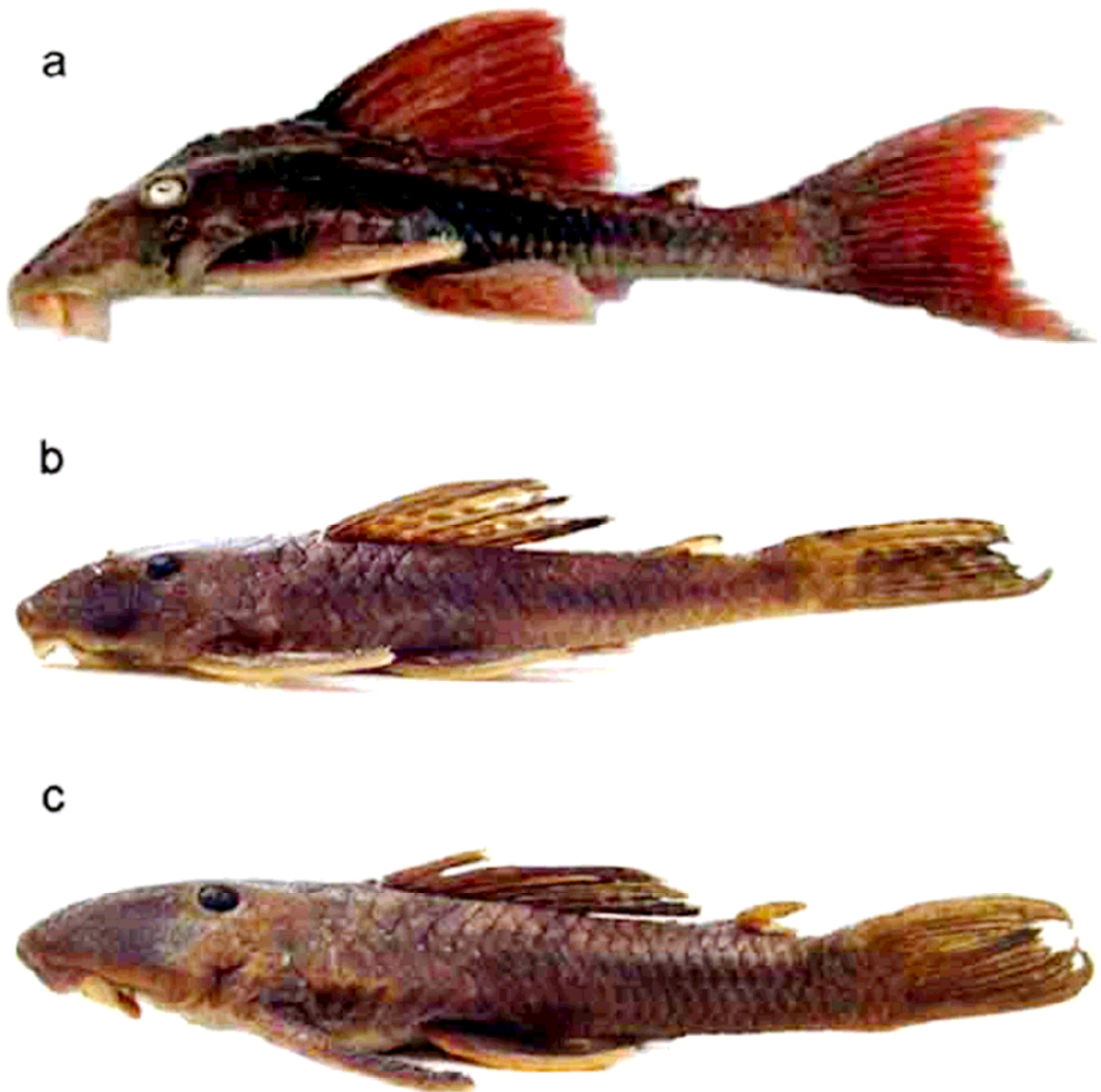


Figura 3 – Exemplares de *Hypostomus cochliodon* (a), *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (b) e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 (c).

2.3 Captura

Os peixes foram capturados com rede de arrasto, peneira, tarrafa, puçá ou rede de espera. Os animais foram acondicionados em recipientes apropriados e transportados até o Laboratório de Zoologia, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, em Campo Grande, onde foram mantidos em aquários. Após a obtenção de suspensão de células renais, os peixes foram fixados e depositados na Coleção Zoológica de Referência da UFMS.

2.4 Obtenção de Cromossomos Mitóticos e Técnicas Utilizadas

Os exemplares foram anestesiados com solução de Benzocaína a 10%, sacrificados e procedida a verificação das gônadas e quando possível, a determinação do sexo. Foram seguidos os procedimentos descritos a seguir.

Para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foram utilizadas células de rim, de acordo com a, descrita por Bertollo *et al.*, (1978) e pela técnica alternativa descrita por Moreira Filho & Bertollo (1990).

2.4.1 Técnica convencional

1. Injetar intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,0125%) na proporção de 1ml/100g de peso do animal.
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um certo período de tempo (20 minutos a 1 hora), sacrificar em seguida o animal e retirar o rim (anterior e/ou posterior) ou, no caso de animais muito pequenos, retirar todo o conjunto de órgãos, exceto vesícula biliar, sob estereomicroscópio.
3. Lavar rapidamente o material retirado em solução hipotônica de KCl a 0,075 M e transferi-lo para pequenas cubas de vidro contendo solução hipotônica (cerca de 5 ml).
4. Dissociar bem o material, com pinças de dissecação e uma seringa desprovida de agulha, aspirando e expirando suavemente para facilitar a separação das células e para obter uma suspensão celular homogênea.

5. Colocar a suspensão obtida em estufa a 36-37° C, durante cerca de vinte e cinco - trinta minutos.
6. Ressuspender o material com bastante cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferir a suspensão obtida para um tubo de centrifuga. Pedacos de tecido ainda não desfeitos devem ser descartados.
7. Acrescentar algumas gotas de fixador (álcool metílico 3 : ácido acético 1), recém-preparado, ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos, a 900 rpm, descartando o sobrenadante com uma pipeta Pasteur.
8. Adicionar, vagarosamente, 5-7 ml de fixador recém-preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo de centrifuga.
9. Ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur.
10. Repetir os itens 8 e 9 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar cerca de 1 ml de fixador, dependendo da quantidade de material sedimentado, e ressuspender bem o material. Este poderá ser então guardado em *freezer*, acondicionado em pequenos frascos tipo *Eppendorff*, ou trabalhado conforme os seguintes passos:
11. Pingar 3-4 gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e seca que deve estar sobre uma placa aquecida a 38-39° C ou sobre uma lâmina que deve ter sido mergulhada em água fervendo, formando assim uma camada fina de água sobre esta, ou ainda sobre uma lâmina colocada sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60° C.
12. Deixar secar ao ar.
13. Corar com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 7-8 minutos.
14. Lavar a lâmina com água destilada ou água corrente e deixar secar ao ar.

2.4.2 Técnica alternativa para Preparações Cromossômicas em Peixes (KCI)

1. Sacrificar o animal e retirar o rim anterior.
2. Colocar o material, previamente lavado em solução hipotônica, em uma cuba de vidro contendo 7-10 ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M.
3. Dissociar o material com pinças de dissecação para separar as células, completando o processo com o auxílio de uma seringa hipodérmica.
4. Incubar o material em estufa a 37° C. Após passar 10 minutos, pingar 1-2 gotas de solução aquosa de colchicina 0,0125%. Deixar na estufa por mais 15-20 minutos e pingar 5-10 gotas de fixador recém-preparado (álcool metílico 3 : ácido acético 1), ressuspensando o material. Centrifugar durante 10 minutos a 900 rpm.
5. Retirar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur e proceder a fixação segundo a técnica de "air-drying", Bertolo *et al.* 1978.

2.4.3 Confeção de lâminas, análises e montagem de cariótipo.

As lâminas foram coradas com Giemsa, e os cromossomos metafásicos contados para determinação do número diplóide (2n). As melhores metáfases foram fotografadas para montagem do cariótipo e os cromossomos classificados segundo Levan *et al.* (1964), com algumas modificações. Os cromossomos foram dispostos em três grupos: Metacêntricos (m), Submetacêntricos (sm) e Subtelocêntricos-Acrocêntricos (st-a). Para o cálculo do número fundamental ou número de braços (NF), os cromossomos meta e submetacêntricos foram considerados portadores de dois braços, enquanto os subtelo-acrocêntricos portadores de um único braço.

2.4.4 Banda C

Para determinação do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de bandamento C, descrita por Sumner, (1972).

1. Tratar o material preparado, segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2 N à temperatura ambiente durante 15 minutos.
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar.
3. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, por 15 minutos.
4. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar.
5. Colocar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 5%, recém-preparada e filtrada, a 42° C, durante 1 a 2,5 minutos.
6. Para interromper a ação da solução de hidróxido de bário, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2 N, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.
7. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60° C durante 45 minutos.
8. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar.
9. Corar com solução de Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 15 minutos.

2.4.5 AgNO_3

A detecção dos cromossomos portadores das RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolos), foi feita pela impregnação por nitrato de prata (Howell & Black, 1980).

1. Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2%

- (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 ml para cada 100 ml de solução) mantida em frasco escuro e em geladeira. Pode-se utilizar gelatina comercial sem sabor e incolor.
2. Adicionar, sobre a gota anterior, 1 gota de água destilada e 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% mantida em frasco escuro e em geladeira. Misturar bem e cobrir com uma lamínula.
 3. Incubar em estufa a 60° C, sobre um suporte, por um período de aproximadamente 3 minutos, dependendo de um monitoramento da coloração da lâmina e dos cromossomos ao microscópio.
 4. Após o tempo apropriado, quando os cromossomos assumirem uma tonalidade amarelada e as RONS e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água deionizada, possibilitando que a lamínula seja retirada pela própria água. Pode-se corar com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6,8), durante 20 a 30 segundos, e lavar em água corrente.

2.4.6 CMA₃ / DAPI

Para coloração com Cromomicina A₃ / DAPI, Christian *et al.* 1998, com modificações.

1. Desnaturar as lâminas em solução de formaminda 70% / 2xSSC por 2 minutos em banho-maria a 70°C.
2. Colocar as lâminas em solução de 2xSSC a temperatura ambiente, no máximo a 40°C, por 2 minutos.
3. Repetir o passo anterior com outra solução de 2xSSC por 2 minutos.
4. Passar as lâminas por uma bateria de etanol:
 - Etanol 70% rapidamente;
 - Etanol 70% por 2 minutos;
 - Etanol 90% por 1 minuto;

- Etanol 100% por 1 minuto.

Durante esses passos não pode deixar as lâminas secarem.

5. Secar bem as lâminas após o etanol 100% e colocar 40 μ l de CMA₃, cobrir com lamínula e deixar 30 minutos a 4°C (geladeira) no escuro.
6. Colocar as lâminas em solução de PBS 1x por 2 minutos, retirar cuidadosamente as lamínulas. Repetir por mais 2 vezes o banho em PBS 1x.
7. Retirar as lâminas da cubeta e com elas ainda molhadas corar com DAPI (com *antifading*), cerca de 40 a 50 μ l, cobrir com lamínula de vidro e visualizar em microscópio de fluorescência.
8. Armazenar as lâminas no escuro em geladeira.

2.4.7 FISH

Para Hibridação fluorescente "*in situ*" seguiu-se o protocolo de Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado e Jouve (1994) com algumas modificações. Foi utilizada a sonda 18S de *Oriochromis niloticus*, cedida por César Martins do Laboratório de Genética e Citogenética da UNESP-Botucatu/SP. A sonda foi marcada com biotina-14-dATP por nick translation.

1ª Etapa: Tratamento das lâminas e hibridação *in situ*

1. Colocar 50 μ L de RNase em cada lâmina, cobrir com lamínula plástica e levar para a estufa 37°C por 1 hora.
2. Lavar as lâminas em 2xSSC por 10 minutos à temperatura ambiente no agitador.
3. Descartar o 2xSSC na pia e, na mesma cubeta colocar o paraformaldeído 4% à temperatura ambiente, por 10 minutos no agitador.
4. Descartar o paraformaldeído no vidro de descarte apropriado e colocar novamente 2xSSC, por 10 minutos, no agitador.
5. Descartar o 2xSSC e colocar álcool etílico 70% por 5 minutos, no agitador.
6. Descartar o álcool 70% e colocar 100% por 5 minutos, não precisa agitar.

7. Descartar o álcool 100% e deixar as lâminas secando por 1 a 3 horas.
8. Neste intervalo preparar a mistura de hibridação por lâmina: 15 µL de formamida 100% + 6 µL de dextran 50% + 3 µL de 20xSSC + 1 µL de DNA de bloqueio + 1 µL de SDS 10% + até 5 µL da sonda).
9. Denaturar a mistura de hibridação (HIS) a 70°C por 10 minutos em banho-maria.
10. Incubar no gelo pelo menos 5 minutos e no máximo 2 horas.
11. Colocar 30 µL da HIS por lâmina e cobrir com lamínulas de plástico e levar ao termociclador: 90°C por 10 minutos; 48°C por 10 minutos; 38°C por 5 minutos e 37°C até infinito.
12. Colocar as lâminas na câmara úmida à 37°C durante a noite.
13. Colocar as soluções de 2xSSC, 0,1xSSC e 4xSSC 0,2% Tween no banho-maria durante a noite.

2ª Etapa: Banhos pós-hibridação

- Sonda de DNAr 18S

1. Tirar as lâminas da estufa, deixando a câmara úmida lá, e fazer os banhos pós-hibridação.
2. Lavar em 2xSSC a 42°C por 5 minutos no agitador.
3. Descartar o 2xSSC na pia e na mesma cubeta colocar formamida 20% a 42°C, por 10 minutos, no agitador.
4. Descartar a formamida em vidro apropriado e colocar na mesma cubeta 0,1xSSC a 42°C por 5 minutos, no agitador.
5. Descartar o 0,1xSSC na pia e na mesma cubeta colocar o 2xSSC a 42°C por 5 minutos, no agitador.
6. Descartar o 2xSSC na pia e colocar o 4xSSC 0,2% Tween a 42°C por 5 minutos, no agitador.
7. Descartar o 4xSSC 0,2% Tween na pia e colocar o 4xSSC 0,2% Tween por 5 minutos no agitador à temperatura ambiente.

- Sonda de DNAr 5S

1. Tirar as lâminas da estufa, deixando a câmara úmida lá, e fazer os banhos pós-hibridação.
2. Lavar em 6xSSC a temperatura ambiente por 10 (15) minutos no agitador.
3. Descartar o 6xSSC na pia e na mesma cubeta colocar 6xSSC à temperatura ambiente por 10 (15) minutos no agitador.
4. Descartar a solução de 6xSSC na pia e colocar na mesma cubeta 6xSSC a 42°C por 3 minutos, sem agitar.
5. Descartar o 6xSSC na pia e na mesma cubeta colocar o 4xSSC/Tween a temperatura ambiente por 5 minutos, no agitador (optativo).

3ª Etapa: Detecção da hibridação

1. Retirar a lâmina e bater cuidadosamente no papel de filtro, e com elas ainda molhadas pegar 50 µde BSA 5% por 5 minutos, e cobrir com lamvnuilas de plástico.
2. Retirar a lamínula sacolejando a lâmina para baixo, se necessário pode ajudar com a pinça.
3. Colocar a solução de detecção (avidina-FITC/BSA 5%), cobrir com lamínula plástica e incubar à 37°C por 1 hora em câmar úmida, no escuro.
4. Lavar as lâminas em 4xSSC 0,2% Tween por 10 minutos à temperatura ambiente no agitador, no escuro. Retirar as lâminas após alguns minutos.
5. Jogar a solução na pia e repetir a mesma lavagem por mais uma vez (opcional).

4ª Etapa: Coloração

1. Retirar as lâminas do 4xSSC 0,2% Tween, bater cuidadosamente no papel filtro, enxugar embaixo e colocar 25 µL de solução de iodeto de propídeo (25 µL de antifading + 1 µL de iodeto de propvdeo 50µg/mL) e cobrir com lamínula de vidro. Retirar o excesso entre papel filtro.

As fotografias foram tiradas com filme Kodak Proimage color 100 ISO.

ARTIGO 1**3 EVIDÊNCIAS DE POSSÍVEL SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS EM
HYPOSTOMUS COCHLIODON (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO
PLANALTO DA BODOQUENA, MS**

Este artigo será submetido à Genetics and Molecular Biology.

EVIDÊNCIAS DE POSSÍVEL SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS EM *Hypostomus cochliodon* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS

***Sandra dos Santos Cereali*¹, *Emanuele Pomini*², *Renata da Rosa*¹, *Otávio Froehlich*² e *Lucia Giuliano-Caetano*¹**

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone: (43) 3371-4527 (e-mail: giuliano@uel.br)

² Departamento de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Palavras-chave: Hypostominae, cromossomos sexuais, heterocromatina, fluorocromos.

Resumo

Foram analisados citogeneticamente 13 exemplares de *Hypostomus cochliodon*, um macho, sete fêmeas e cinco indivíduos jovens, coletados no rio Salobra e no córrego Salobrinha, Planalto da Bodoquena, MS, Brasil. O cariótipo de todas as fêmeas apresentou $2n=64$, com fórmula cariotípica constituída de $16M + 19SM + 29ST-A$, e $NF=99$. Os indivíduos jovens também apresentaram esta mesma fórmula cariotípica. O único macho apresentou $2n=64$, $16M + 20SM + 28ST-A$, e $NF=100$. Um par de acrocêntricos grande possui heteromorfismo de tamanho no

macho, mas não nas fêmeas, sugerindo um possível sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY. Todas as fêmeas possuíam um único cromossomo na posição 15 e também um cromossomo acrocêntrico a mais, na posição do 22. O padrão de distribuição de heterocromatina detectado por banda C também é diferente entre macho e fêmeas. Os acrocêntricos envolvidos no heteromorfismo de tamanho apresentam um bloco bem evidente de heterocromatina na região terminal do braço longo, em ambos os sexos. Nas fêmeas, o acrocêntrico 22 também apresenta um bloco de heterocromatina. A coloração com CMA₃ apresentou o padrão de distribuição coincidente com o da banda C. A análise de mais exemplares machos pode confirmar essa hipótese ou mesmo apontar para um polimorfismo de heterocromatina.

Introdução

Hypostominae é uma das subfamílias mais numerosa de Loricariidae. O gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803, possui aproximadamente 110 espécies e é considerado como um dos grupos de peixes neotropicais mais diversificados (Montoya-Burgos, 2003).

Dentre os Loricariidae, *Hypostomus* é o gênero mais estudado citogeneticamente, com diversos trabalhos na literatura (Artoni *et al.*, 1998; Artoni *et al.*, 1999; Artoni & Bertollo, 1996, 1999, 2001). A variação no número cromossômico é de $2n = 54$ cromossomos em *H. plecostomus* (Muramoto *et al.*, 1968, *in* Artoni & Bertollo, 2001) a $2n = 80$ cromossomos em *Hypostomus* sp. E (Artoni & Bertollo, 1996).

Em algumas espécies de Hypostominae a distribuição de heterocromatina constitutiva apresenta blocos pequenos ou moderados, situados na

posição telomérica e/ou centromérica, também podem ser observados blocos maiores e mais evidentes (Artoni & Bertollo 1996, 2001, Artoni *et al.*, 1999), podendo se apresentar heteromórficos entre os homólogos (Artoni & Bertollo, 1999) ou ainda estar associado a sistemas de cromossomos sexuais, no caso descrito por Artoni *et al.* (1998), em um sistema do tipo ZZ/ZW em *Hypostomus* sp., onde o cromossomo Z possui um bloco mais evidente.

Sistemas de cromossomos sexuais também são descritos: XX/XY em *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta *et al.*, 1992) e *Hypostomus macrops* (Michelle *et al.*, 1977); ZZ/ZW em *M. leucofrenatus* (Andreatta *et al.*, 1993), *Loricariichthys platymetopon* (Scavone & Julio Jr., 1995) e *Hypostomus* sp. G (Artoni *et al.*, 1998) e *Ancistrus* cf. *dubius* (Mariotto *et al.*, 2004); XX/XY₁Y₂ em *Hartia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006).

Existem registros de pelo menos 13 espécies de Loricariidae no Planalto da Bodoquena. Embora Willink *et al.* (2000), relatem a peculiaridade da ictiofauna, com muitas espécies endêmicas, não há registros de dados citogenéticos para peixes da região.

No presente trabalho foram analisados exemplares de *Hypostomus cochliodon* provenientes do Planalto da Bodoquena, MS.

Materiais e Métodos

Foram analisados 13 exemplares de *Hypostomus cochliodon* Kner, 1854, sendo um macho, sete fêmeas e cinco indivíduos jovens, coletados no rio

Salobra localizado 20 41' 34.56943"S e 56 44' 25.65932"W, e no córrego Salobrinha 20 41' 07.47583"S e 56 46' 44.28812"W.

Para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foram utilizadas a técnica convencional (Bertollo *et al.*, 1978) ou a técnica alternativa (Moreira Filho & Bertollo, 1990). Os cromossomos foram classificados em três grupos: metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtlocêntricos-acrocêntricos (STA), segundo Levan *et al.* (1964), com modificações. Para determinação do padrão de distribuição da heterocromatina, foi utilizado bandamento C (Sumner, 1972). Para coloração com Cromomicina A₃ / DAPI, Christian *et al.* (1998), com modificações.

Resultados

O cariótipo de todas as fêmeas apresentou $2n=64$ sendo $16M + 19 SM + 29ST-A$, com número fundamental (NF) igual a 99 (Figura 1a) Os indivíduos jovens também apresentaram a mesma fórmula cariotípica. Entretanto, o único macho apresentou $16M + 20SM + 28ST-A$, com NF igual a 100 (Figura 1b).

Um par de acrocêntricos grande apresentou heteromorfismo de tamanho no macho, mas não nas fêmeas. Todas as fêmeas analisadas apresentaram um único cromossomo na posição do par 15 e também um cromossomo acrocêntrico a mais, que passa a ocupar a posição 22.

O padrão de distribuição de heterocromatina detectado pelo bandamento C também é diferente entre macho e fêmeas. As fêmeas apresentam o par 20 com um bloco, bem evidente, no braço longo (XX) (Figura 2a), enquanto que o macho apresenta um acrocêntrico grande com um bloco grande no braço longo (X)

e outro acrocêntrico menor, apresenta um bloco de heterocromatina do mesmo tamanho no braço longo (Y), (Figura 1c, 2a e 2d). Tanto macho como fêmeas apresentam pequenos blocos de heterocromatina em alguns cromossomos. Porém, nas fêmeas, o acrocêntrico 22 também apresenta um bloco de heterocromatina, na região telomérica (Figura 2a), não observado nos machos. A coloração com fluorocromo Cromomicina A₃ apresenta o padrão de distribuição coincidente com o padrão de distribuição da heterocromatina (Figura 2b e 2e). Já a coloração com DAPI não apresentou regiões fluorescentes (Figura 2c e 2f).

Discussão

Sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos são descritos em alguns grupos de peixes: Characiformes: ZZ/ZW em *Characidium gomesi*, Maistro *et al.* (2004); X₁X₂Y em *Hoplias malabaricus*, (Bertollo *et al.*, 1997); Gymnotiformes: X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y em *Brachyhyppopomus pinnicaudatus*, (Almeida-Toledo *et al.*, 2000); X₁X₂Y em *Gymnotus* sp., (Sánchez *et al.*, 2004); Siluriformes: XX/XY em *Pseudotocinclus tietensis*, (Andreatta *et al.*, 1992); ZZ/ZW em *M. leucofrenatus* (Andreatta *et al.*, 1993), *Loricariichthys platymetopon* (Scavone & Julio Jr., 1995) e *Ancistrus cf. dubius* (Mariotto *et al.*, 2004); XX/XY₁Y₂ em *Hartia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006).

Segundo Artoni *et al.* (1998), o sistema XX/XY descrito para *Hypostomus macrops* por Michelle *et al.* (1977) requer confirmação. Por outro lado, os mesmos autores descrevem um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW em *Hypostomus* sp., onde o cromossomo Z apresenta um bloco de heterocromatina intersticial, não observado no cromossomo W.

Um par de acrocêntricos grande apresentou heteromorfismo de tamanho no macho, mas não nas fêmeas e nos indivíduos jovens, sugerindo que estes sejam todos fêmeas, uma vez que seguem o mesmo padrão cariotípico. Os dados acima citados sugerem um possível sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY, onde a fêmea é homogamética.

A análise dos cariótipos de macho e fêmeas de *H. cochliodon*, apoiada na distribuição diferencial de heterocromatina entre os sexos, sugerem fortemente a existência de um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY. Porém, o fato de existir apenas um macho entre os indivíduos analisados impede uma afirmação neste sentido.

No caso dos cromossomos 15 e 22 das fêmeas pode ter ocorrido inversão pericêntrica, pois houve alteração na morfologia cromossômica sem alteração do número diplóide, conseqüentemente há uma alteração do número fundamental (NF), NF=100 nos machos e NF=99 nas fêmeas.

Em Hypostominae os cromossomos meta / submetacêntricos são mais freqüentes em espécies com número diplóide mais baixo em quanto os cromossomos subtelo / acrocêntricos prevalecem em espécies com número diplóide maior (Artoni & Bertollo 2001). Este fato também é observado nas espécies de *Hypostomus* do Planalto da Bodoquena onde *Hypostomus cochliodon* apresenta mais cromossomos meta / submetacêntricos, enquanto *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 (2n = 82 cromossomos) e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (2n = 84), apresentam muitos cromossomos subtelo/acrocêntricos, (Capítulo 2).

Artoni & Bertollo (1999), analisaram espécimes de *Hypostomus* sp. B que apresentaram um par de cromossomos acrocêntricos com grandes bandas conspícua associadas a RON telomérica. Essa região de heterocromatina mostrou

forte fluorescência após a coloração por DAPI, enquanto a RON do mesmo cromossomo foi mitramicina positiva.

A coloração com DAPI não apresentou regiões mais fluorescentes, desta forma as regiões heterocromáticas, incluindo a heterocromatina nos cromossomos heteromórficos do possível par sexual, são constituídas preferencialmente de regiões ricas em bases CG.

Blocos muito evidentes de heterocromatina em posição terminal de cromossomos acrocêntricos também são descritos por Artoni & Bertollo (2001) para mais três espécies: *Hypostomus albopunctatus*, *Hypostomus* sp. A e *Hypostomus* sp. C.

Uma possível explicação para a escassez de machos entre os indivíduos amostrados estaria ligada ao fato de que os machos adultos em fase reprodutiva ficam nas tocas, nas margens dos rios e riachos e cuidam da prole, portanto não estariam na calha dos rios, onde foi feita a captura.

A análise de mais exemplares machos pode confirmar a hipótese da ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY em *H. cochliodon*, ou mesmo apontar para um polimorfismo de heterocromatina, uma vez que existem descrições de cromossomos acrocêntricos portadores de blocos conspícuos de heterocromatina em espécies de *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 2001).

Referências Bibliográficas

Almeida-Toledo, LF, Daniel-Silva, MFZ, Lopes, CE. & Toledo-Filho, SA (2000)

Sex chromosome evolution in fish II. Second occurrence of a X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Res.* 8:335-340.

- Andreato AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C & Toledo-Filho SA (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I1 ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, & constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220.
- Andreato AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira, C. & Toledo-Filho SA (1992) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57: 369-372.
- Artoni RF & Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 8 1-90.
- Artoni RF & Bertollo LAC (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209-214.
- Artoni RF & Bertollo LAC (2001) Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.
- Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC & Galetti Jr. PM (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* 22: 1-6.
- Artoni RF, Venere PC & Bertollo LAC (1998) A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63: 421-425.

- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J (1997) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-C and chromosome replication banding. *Chromosome Res.* 5:493-499.
- Bertollo LAC, Takahashi CS & Moreira-Filho O (1978) Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.* 1:103-120.
- Centofante L, Bertollo LCA & Moreira-Filho O (2006) Cytogenetic characterization and description of a XX₁XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Iharia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet and Genome Res* 112: 320-324.
- Christian A, McNeil E, Roinson J, Drabek R, LaRue S, Waldren C & Bedford J (1998) A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:172-179.
- Levan A, Fredga K & Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O & Foresti F (2004) Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosome of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia.* 69(2):181-186.
- Mariotto S, Artoni RF & Miyazawa CS (2004) Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia.* 57(4): 327-331.

- Michelle J.L., Takahashi C.S. & Ferrari I. 1977. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 42: 539-546.
- Montoya- Burgos JI (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*. 12: 1855-1867.
- Moreira-Filho O & Bertollo LAC (1990) Uma técnica alternativa para preparações cromossômicas de peixes. III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Botucatu, SP.
- Sánchez S, Laudicina A & Jorge LC (2004) A new report of multiple sex chromosome system in the order Gymnotiformes (Pisces). *Cytologia*. 69(2):155-160.
- Scavone M.D. & Julio Jr. H.F. 1995. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichtys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). *Brazil. J. Genet.* 18: 31 -35.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 75: 304-306.
- Willink PW, Froehlich O, Machado-Allison A, Menezes NA, Oyakawa OT, Catella AC, Chernoff B, Lima FCT, Toledo Piza M, Ortega H, Zanata AM & Barriga R (2000) Diversidade, Distribuição, e Habitats Críticos dos Peixes dos Rios: Negro, Negrinho, Taboco, Taquari e Miranda, e sua Importância para Conservação e Desenvolvimento Sustentável do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *In* Willink PW, Chernoff B, Alonso L, Montambault JR & Lourival R Uma Avaliação Biológica dos Ecossistemas Aquáticos do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conservation International, Washington.

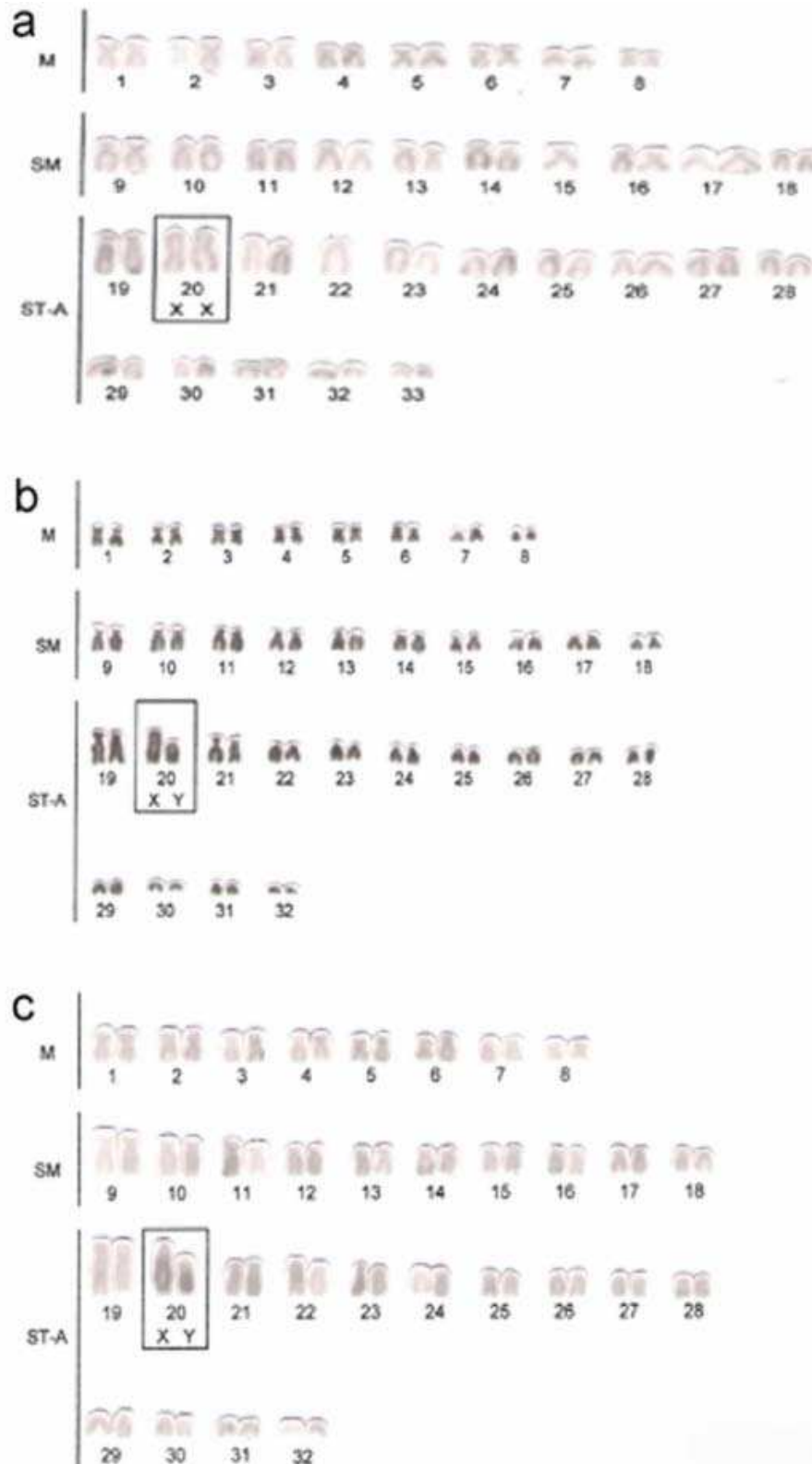


Figura 1 – Cariótipo com giemsa de *Hypostomus cochliodon* $2n=64$ cromossomos em fêmea (a) e macho (b); banda C em macho (c).

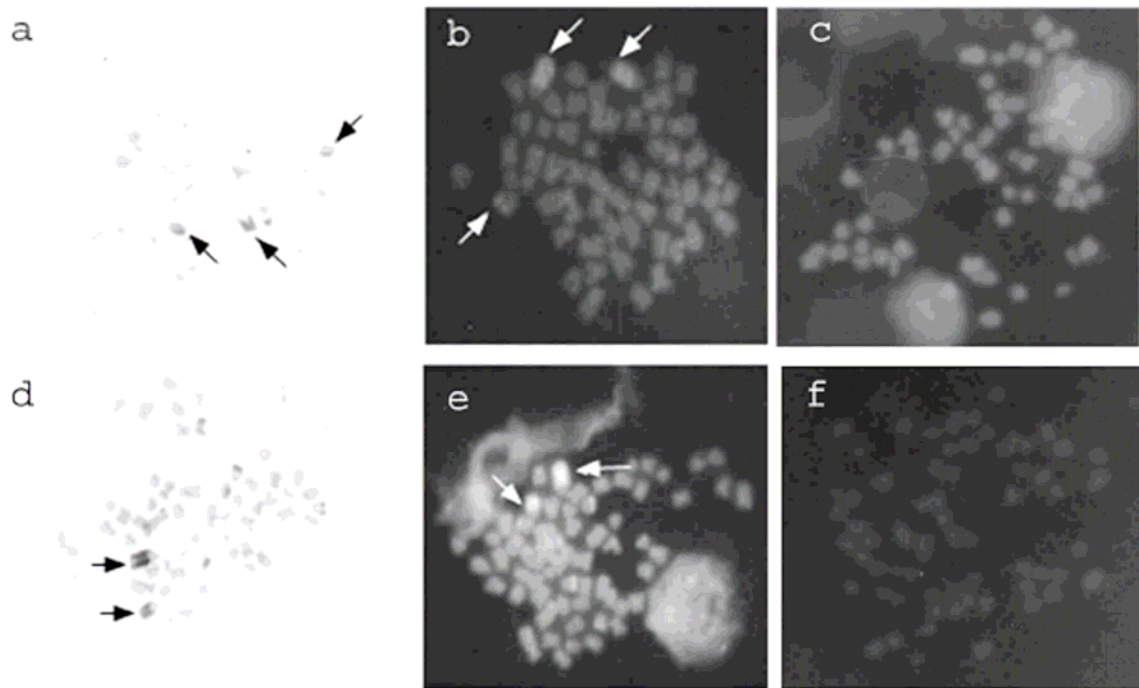


Figura 2 – Metáfases apresentando o padrão de distribuição de heterocromatina por banda C (a, d) e marcação com CMA3 (b, e) em *H. cochliodon*, fêmea (a, b) macho (d, e). Metáfases mostrando coloração com DAPI em fêmea (c) e macho (f).

ARTIGO 2 –**4 DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE *HYPOSTOMUS*
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS.**

Este artigo será submetido á *Environmental Biology of Fishes*.

Descrição cariotípica de duas espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) do Planalto da Bodoquena, MS

Sandra dos Santos Cereali^a Emanuele Pomini^b, Renata da Rosa^a, Otávio Froehlich^b e Lucia Giuliano-Caetano^a

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone: (43) 3371-4527 (e-mail: giuliano@uel.br)

^b Departamento de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Palavras-chave: Hypostominae, citogenética, polimorfismo cromossômico, heterocromatina, fluorocromos.

Resumo

Foram caracterizados citogeneticamente *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 coletados no rio Salobra e no córrego Salobrinha, e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 coletados no rio Perdido, Planalto da Bodoquena, MS, Brasil. *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha apresentou dois números modais distintos $2n = 82$, $6M + 14SM + 62ST-A$, com Número Fundamental (NF) igual a 102; $2n = 84$, $6M + 14SM + 64ST-A$, NF = 104. Esse polimorfismo deve-se a presença de dois cromossomos extras. Não foi possível definir o número diplóide em quatro exemplares, sendo as linhagens celulares compostas de $2n=83$ e $2n=84$ cromossomos em um indivíduo, e $2n=82$, $2n=83$ e $2n=84$ cromossomos nos outros. Estes resultados caracterizam a existência de um mosaico genético devido à

ocorrência de um a dois cromossomos extras em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247. *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 apresentou número diplóide $2n = 84$, $6M + 16SM + 62ST-A$ e $NF = 106$ com heteromorfismo de tamanho em um par de cromossomos marcados por $AgNO_3$. Em ambas as espécies o bandamento C evidencia um padrão de distribuição da heterocromatina caracterizado pela presença de poucas e pequenas bandas na região centromérica e pericentromérica. As marcações com Cromomicina A_3 coincidem com o bandamento C nas duas espécies. O maior número diplóide descrito, até agora, para o gênero era $2n = 80$ cromossomos em *Hypostomus* sp. E, porém *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 apresentou $2n = 82$ e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 $2n = 84$ cromossomos aumentando a amplitude de variação para este gênero.

Introdução

Embora, Isbrucker (1980 apud Artoni & Bertollo 2001), considere os Loricariidae como a segunda maior família entre os Teleostei, pouco é conhecido sobre a organização cariotípica deste grupo (Artoni & Bertollo 2001). Entretanto, alguns estudos relatam informações citogenéticas, em Loricariinae (Scavone & Julio Jr. 1994, Giuliano-Caetano 1998, Artoni & Bertollo 2001); Hypoptopomatinae (Andreatta et al. 1992, Andreatta et al. 1993, Andreatta et al. 1994), Hypostominae (Artoni et al. 1998, Artoni et al. 1999, Artoni & Bertollo 1996 1999 2001), Ancistrini (Lara 1998, Artoni & Bertollo 2001), Neoplecostominae (Alves 2000, Kavalco et al. 2005).

Apesar do pequeno volume de informações comparado com o número de espécies já descritas de Loricariidae, os dados disponíveis demonstram que este é um grupo de grande interesse para estudos em citogenética, devido tanto a variação no número cromossômico, $2n = 36$ em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano 1998) a $2n = 96$ em *Upsilonodus* sp. (Kavalco et al. 2005), quanto à ocorrência de vários rearranjos cromossômicos, sugerindo uma evolução cariotípica divergente (Artoni & Bertollo 2001).

Hypostomus, considerado como um dos grupos de peixes neotropicais mais diversificados (Montoya-Burgos 2003), é também um dos gêneros mais estudados da família, do ponto de vista citogenético, e a variação no número cromossômico é de $2n = 54$ cromossomos em *H. plecostomus* (Muramoto et al. 1968, in Artoni & Bertollo 2001) a $2n = 80$ cromossomos em *Hypostomus* sp. E (Artoni & Bertollo 1999).

O Planalto da Bodoquena localiza-se nos municípios de Bonito e Bodoquena e em parte de Jardim e Porto Murtinho, em Mato Grosso do Sul. Os principais rios são Formoso, da Prata, Perdido e Salobra (Boggiani 1999). Embora Willink et al. (2000), relatem a peculiaridade da ictiofauna, com muitas espécies endêmicas, não havendo registros de dados citogenéticos para peixes da região.

No presente trabalho foram analisadas espécies de *Hypostomus* provenientes do Planalto da Bodoquena, MS, visando informações citogenéticas desta ictiofauna.

Materiais e Métodos

As duas espécies estudadas são novas para a ciência e estão depositadas no museu do NUPÉLIA, na Universidade Estadual de Maringá, sob

número de registro NUP 4247 para *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha e NUP 4249 para *Hypostomus* sp. 2- rio Perdido. Foram analisados 13 exemplares de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247, sendo três machos, quatro fêmeas e seis indivíduos jovens, coletados no Rio Salobra localizado 20 41' 34.56943"S e 56 44' 25.65932"W, e no córrego Salobrinha 20 41' 07.47583"S e 56 46' 44.28812"W. De *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249, analisou-se cinco exemplares, sendo quatro machos e uma fêmea, coletados no rio Perdido 21 17' 09.16825"S e 56 41' 46.90770"W. Os rios e córrego acima citados se localizam no Planalto da Bodoquena, MS.

Para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foram utilizadas a técnica convencional (Bertollo et al. 1978) ou a técnica alternativa (Moreira Filho & Bertollo 1990). Os cromossomos foram classificados em três grupos: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a), segundo Levan et al. (1964), com modificações. Para determinação do padrão de distribuição da heterocromatina, foi utilizado bandamento C (Sumner 1972). Para coloração com Cromomicina A₃ / DAPI, Christian et al. (1998), com modificações.

Resultados

Os espécimes de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 apresentaram dois números modais distintos $2n = 82$ e $2n = 84$ (Figura 1) com mudança na fórmula cromossômica e no número fundamental. Um macho e uma fêmea apresentaram $2n = 82$, sendo $6m + 12sm + 64st-a$, e $NF = 100$ (figura 2a), um macho, uma fêmea e cinco indivíduos jovens com $2n = 84$, com cariótipo constituído de $6m + 12sm + 66st-a$, $NF = 102$ (Figura 2b). Em quatro espécimes (um macho,

duas fêmeas e um indivíduo jovem) não foi possível definir o número diplóide, sendo que duas fêmeas e 1 indivíduo jovem apresentaram $2n = 82$ (Figura 2a), $2n = 84$ (Figura 2b) e $2n = 83$, $6m + 12sm + 65st-a$, NF igual a 101 (Figura 2c). Um macho apresentou variação de $2n = 83$ e $2n = 84$, com fórmula cariotípica e NF iguais às descritas acima.

O polimorfismo encontrado em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 pode ser devido à ocorrência de um a dois cromossomos extras, sendo o citótipo básico da espécie $2n = 82$ cromossomos. Não foram evidenciados cromossomos heterocromáticos, o que sugere que estes cromossomos extras seriam eucromáticos.

Entre os espécimes que não tiveram o número diplóide definido observamos na Figura 1 que no indivíduo macho (12M) tem aproximadamente a mesma quantidade de metáfases com 83 e 84 cromossomos, no exemplar jovem (22J) e nas duas fêmeas (30F e 13F) a quantidade de metáfases tem praticamente o mesmo valor entre 82, 83 e 84 cromossomos, caracterizando um caso de mosaicismo genético devido a cromossomos extras.

Todos os espécimes de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 apresentaram número diplóide modal de $2n=84$, com fórmula cariotípica $6m + 16sm + 62st-a$ e NF = 106 (Figura 3a). Em quatro exemplares a constrição secundária em um dos homólogos do par 35 é bem evidente após coloração com giemsa (Figura 3a e 3b1), a impregnação por $AgNO_3$ (Figura 3b2) e a coloração com CMA_3 também evidenciam um heteromorfismo de tamanho no mesmo par (Figura 3b3).

Tanto em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 quanto em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 o bandamento C evidencia-se um padrão de distribuição da heterocromatina caracterizado pela presença de poucas e

pequenas bandas na região pericentromérica, além da presença de um bloco bem evidente em posição terminal nos braços longos de cromossomos acrocêntricos pequenos (Figura 4a e 4d).

A coloração com CMA₃ apresentou em *Hypostomus sp. 3-córrego* Salobrinha NUP 4247 pelo menos duas marcações em cromossomos acrocêntricos pequenos, sendo uma delas mais evidente que a outra (Figura 4b). Em *Hypostomus sp. 2-rio Perdido* NUP 4249 existem marcações bem evidentes na região terminal do braço longo de dois cromossomos acrocêntricos pequenos (Figura 4e). A coloração com DAPI (Figura 4c e 4f) não apresentou bandas fluorescentes em nenhuma das duas espécies estudadas.

Discussão

O maior número diplóide descrito, até agora, para o gênero *Hypostomus* era $2n = 80$ cromossomos, em *Hypostomus sp. E* (Artoni & Bertollo 1996), porém *Hypostomus sp. 3-córrego* Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus sp. 2-rio Perdido* NUP 4249 apresentaram $2n = 82$ e $2n = 84$ cromossomos respectivamente, aumentando a amplitude de variação para este gênero.

Em Hypostominae os cromossomos meta/submetacêntricos são mais freqüentes em espécies com número diplóide mais baixo em quanto os cromossomos subtelo/acrocêntricos prevalecem em espécies com número diplóide maior (Artoni & Bertollo 2001). Este fato também é observado nas espécies de *Hypostomus* do Planalto da Bodoquena onde *Hypostomus sp. 3- córrego* Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus sp. 2-rio Perdido* NUP 4249 apresentam muitos

cromossomos subtelo/acrocêntricos, enquanto *Hypostomus cochliodon* com $2n = 64$ cromossomos apresenta mais meta/submetacêntricos (Capítulo 3).

Em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha foi observado um polimorfismo cromossômico com dois citótipos: $2n = 82$ e $2n = 84$, devido à presença de cromossomos extras, sendo este o primeiro relato no gênero. Entre os citótipos $2n = 82$ e $2n = 84$ cromossomos a diferença se dá na presença de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos em $2n = 84$, sendo que no citótipo $2n = 83$ o cromossomo não pareado é um dos menores acrocêntricos do complemento. Por não serem heterocromáticos e devido ao tamanho semelhante entre os acrocêntricos de menor tamanho, não é possível apontar qual ou quais são os cromossomos extras.

Existem descrições de cromossomos extras não heterocromáticos como encontrado em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha em *Characidium* cf. *zebra* (Venere et al. 1999) e *Steindachnerina insculpta* (Oliveira & Foresti 1993).

Cromossomos extras, supramumerários e cromossomo B são relatados com maior freqüência em Characiformes (Moreira-Filho et al. 2001; Neo et al. 2000; Maistro et al. 2004; Venere et al. 1999, entre outros), porém em Siluriformes são descritos poucos casos (Fenocchio & Bertollo 1990, Dias & Foresti 1993, entre outros). Em Loricariidae são descritos cromossomos B em algumas espécies: *Microlepidogaster leucofrenatus* de 1 a 2 Bs, em duas localidades (Andreatta et al., 1993 e Andreatta et al. 1994); *Loricaria* sp. e *L. prolixa* de 1 a 5 Bs (Scavone & Julio Jr., 1994).

Hypostomus sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 apresentou variação numérica intraindividual devido à presença de cromossomos extras com freqüências muito próximas, podendo ser considerada um caso de mosaicismo

cromossômico. Borin & Martins-Santos (2000), descrevem polimorfismo numérico intraindividual em *Thichomycterus davisii*, onde um indivíduo apresenta três populações de células com número diplóide de $2n = 54$, $2n = 55$ e $2n = 56$ cromossomos. Esta variação foi atribuída a uma provável não disjunção pós-zigótica de um cromossomo metacêntrico de tamanho médio/pequeno, seguido de fissão cêntrica, originando um indivíduo mosaico.

Torres *et al.* (2002), utilizam a expressão “mosaicismo” no título de um trabalho com peixes. Os autores encontraram um indivíduo de *Thichomycterus paolence*, que apresentou cinco diferentes conjuntos cromossômicos: $2n = 54$ número normal da espécie e que aparece em todos os citótipos; $2n = 55$ (+ um microcromossomo - mc); $2n = 55$ (+ subtelocêntrico); $2n = 56$ (+ subtelocêntrico e um mc) e $2n = 57$ (+ um par de subtelocêntrico e um mc). Os autores sugerem a ocorrência de aneuploidias por não-disjunção pós-zigótica durante as primeiras divisões do blastômero.

Segundo Artoni & Bertollo (1999 e 2001) existem dois padrões gerais de distribuição heterocromatina entre os Loricariidae: 1 - pouca heterocromatina localizada nas regiões telomérica e/ou centroméricas, mais associado a espécies com número diplóide menor; 2 – grande número destas regiões, além de segmentos heterocromáticos em regiões intersticiais, está mais associado a espécies com número diplóide maior. A distribuição de heterocromatina em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha é condizente com o segundo grupo, enquanto *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido se aproxima mais da descrição do primeiro grupo.

Heteromorfismo de tamanho entre homólogos de cromossomos marcados por $AgNO_3$ é relatado em espécies de *Hypostomus* por Artoni & Bertollo

(1996), e também observado em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249. Em Loricariidae regiões ricas em GC são descritas em *Hypostomus* (Artoni et al. 1988, Artini & Bertollo 1999, Kavalco et al. 2004); *Rineloricaria* (Giuliano-Caetano 1998) entre outros.

Regiões ricas em AT são raramente descritas em peixes. Embora algumas espécies de *Hypostomus* estudadas por Artoni & Bertollo (1999) apresentem bandas fluorescentes marcadas com DAPI, *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido nup 4249 não apresentaram marcações com DAPI, o que indica que possivelmente regiões AT-ricas são muito pequenas ou não existem. Os polimorfismos cromossômicos geralmente não causam nenhum efeito no fenótipo, sendo normalmente, detectados apenas citogeneticamente. Vários exemplos encontrados na natureza apresentam polimorfismo cromossômico tanto estrutural quanto numérico (Dias & Giuliano Caetano2002). O desenvolvimento de populações polimórficas é importante tanto para a população como para o indivíduo, porque, em ambientes heterogêneos, uma população uniforme só pode explorar eficientemente um dos nichos ecológicos, enquanto que acreditasse que uma população polimórfica poderá utilizar mais habitats, explorando melhor o ambiente de que dispõe (Ford 1980). Entretanto, no caso de peixes, podemos pensar que períodos de cheia e seca dos rios, bem como alterações climáticas e físico-químicas na água, influenciem mais do que a disponibilidade de habitats.

No ponto onde os exemplares de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 foram coletados, o trecho do rio encontra-se praticamente isolado por barreiras físicas naturais sendo muito peculiar devido a sua fisionomia e por apresentar poucas espécies (apenas nove espécies), mas também porque destas, quatro não

foram coletadas em nenhum outro local do planalto da Bodoquena, todas novas para a ciência, incluindo duas espécies de *Hypostomus*. O córrego Salobrinha e o rio Salobra também têm suas peculiaridades, sendo que *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha NUP 4247 apesar de abundante também é uma espécie nova para a ciência.

Estes fatos aliados às características da região tornam estas populações de grande interessante, dando continuidade aos estudos citogenéticos nestas e em outras espécies para conhecermos as tendências evolutivas do gênero *Hypostomus*.

Referências Bibliográficas

Alves, A.L. 2000. Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. MSc Thesis, Universidade Estadual Paulista. 129pp.

Andreato A.A., Almeida-Toledo, L.F., Oliveira, C. & Toledo-Filho, S.A., 1992. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57: 369-372.

Andreato, A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C & Toledo-Filho S.A., 1993. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): 1 ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220.

- Andreato, A.A., Almeida-Toledo, L.F., Oliveira C. & Toledo-Filho, S.A., 1994. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia* 47: 27-37.
- Artoni, R.F & Bertollo, L.A.C, 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 8 1-90.
- Artoni, R.F & Bertollo, L.A.C, 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209-214.
- Artoni, R.F & Bertollo, L.A.C, 2001. Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.
- Artoni, R.F, Molina, W.F, Bertollo, L.A.C & Galetti Jr., P.M, 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* 22: 1-6.
- Artoni, R.F, Venere, P.C & Bertollo, L.A.C, 1998. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63: 421 -425.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. 1978. Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.* 1: 103-120.
- Boggiani, P.C. 1999. Porque Bonito é bonito? In Scremim-Dias, E., Pott, V.J., Hora, R.C. & Souza, P.R. *Nos Jardins Submersos da Bodoquena*. Editora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

- Borin, L.A. & Martins-Santos, I.C. 2000. Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçu River basin in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (3): 605-607.
- Christian, A., McNeil, E., Roinson, J., Drabek, R., LaRue, S., Waldren, C. And Bedford, J. 1998. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:172-179.
- Dias, A.L. & Foresti, F. 1993. Cytogenetics studies on fishes of the family Pimelodidae (Sluroidei). *Rev. Bras. Genét.* 16 585-600.
- Dias, A.L. & Giuliano-Caetano, L. 2002. Citogenética de alguns grupos de peixes da bacia do rio Tibagi *in* Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A. & Pimenta, J.A. (editores) A bacia do rio Tibagi, Londrina.
- Fenocchio, A.S. & Bertollo, L.A.C. 1990. Supranumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81: 193-198.
- Ford, E.B. 1980. *Genética e adaptação*. Ed. Da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Giuliano-Caetano, L., 1998. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 78pp.
- Kavalco, K.F., Pazza, R, Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*. 94: 180-186.
- Kavalco, K.F., Pazza, R, Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2004. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas* 141: 237-242.

Lara M.C.S, 1998. Aspectos citogeneticos de quatro especies de peixes da subfamilia Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do rio Paraná. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 46 pp.

Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromossomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Maistro, E.L., Jesus, C.M., Oliveira, O., Moreira-Filho, O. & Foresti, F. 2004. Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromossomes of *Characidium gomes I* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia* 69: 181-186.

Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish egus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*. 12: 1855-1867.

Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. 1990. Uma técnica alternativa para preparações cromossômicas de peixes. III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Botucatu, SP.

Neo, D. M., Moreira-Filho, O. & Camacho, J.P.M. 2000. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85: 136-141.

Oliveira, C. & Foresti, F. 1993. Occurence of supranumerary microchromosome in *Steindachinerina insculpita* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76: 183-186.

Scavone M.D. & Julio Jr., H.F. 1994. Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females (Loricariidae-Siluriformes) from the Parana river basin. *Rev. Ictiol.* 213: 41-47.

- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Experimental Cell Research*. 75: 304-306.
- Torres, R., Foresti, F. & Oliveira, C. 2002. Occurrence of karyotypical mosaicism in *Trichomycterus paolence* (Teleostei, Trichomycteridae). *Caryologia*. 55: 283-287.
- Venere, P.C., Miyazawa, C.S., Galetti Junior, P.M. 1999. New case of supranumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genet. Mol. Biol.* 22: 345-349.
- Willink, P.W., Froehlich, O., Machado-Allison, A., Menezes, N.A., Oyakawa, O.T., Catella, A.C., Chernoff, B., Lima, F.C.T., Toledo Piza, M., Ortega, H., Zanata, A.M. & Barriga, R. 2000. Diversidade, Distribuição, e Habitats Críticos dos Peixes dos Rios: Negro, Negrinho, Taboco, Taquari e Miranda, e sua Importância para Conservação e Desenvolvimento Sustentável do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *In* Willink, P.W., Chernoff, B., Alonso, L., Montambault, J.R. & Lourival, R. Uma Avaliação Biológica dos Ecossistemas Aquáticos do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conservation International, Washington.

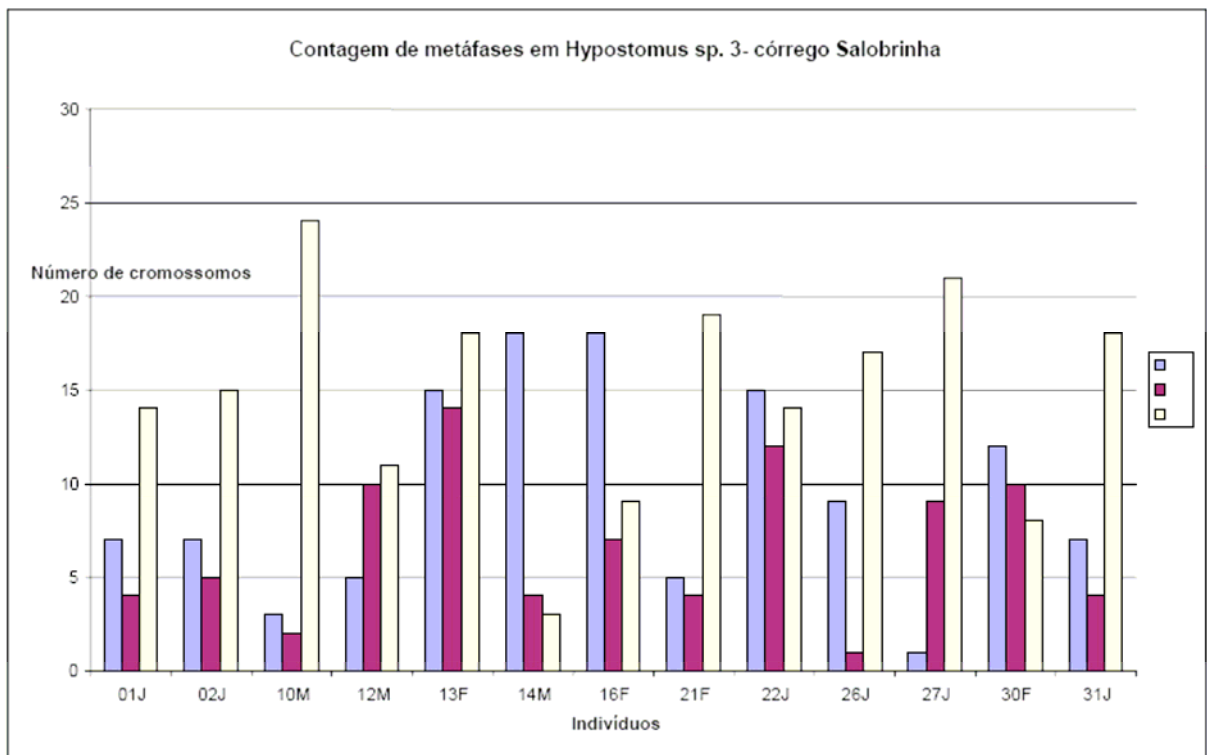


Figura 1 – Histogramas mostrando contagem do número de metáfases em exemplares de *Hypostomus* sp 3-córrego Salobrinha NUP 4247. M = macho, F = fêmea e J = indivíduo jovem.

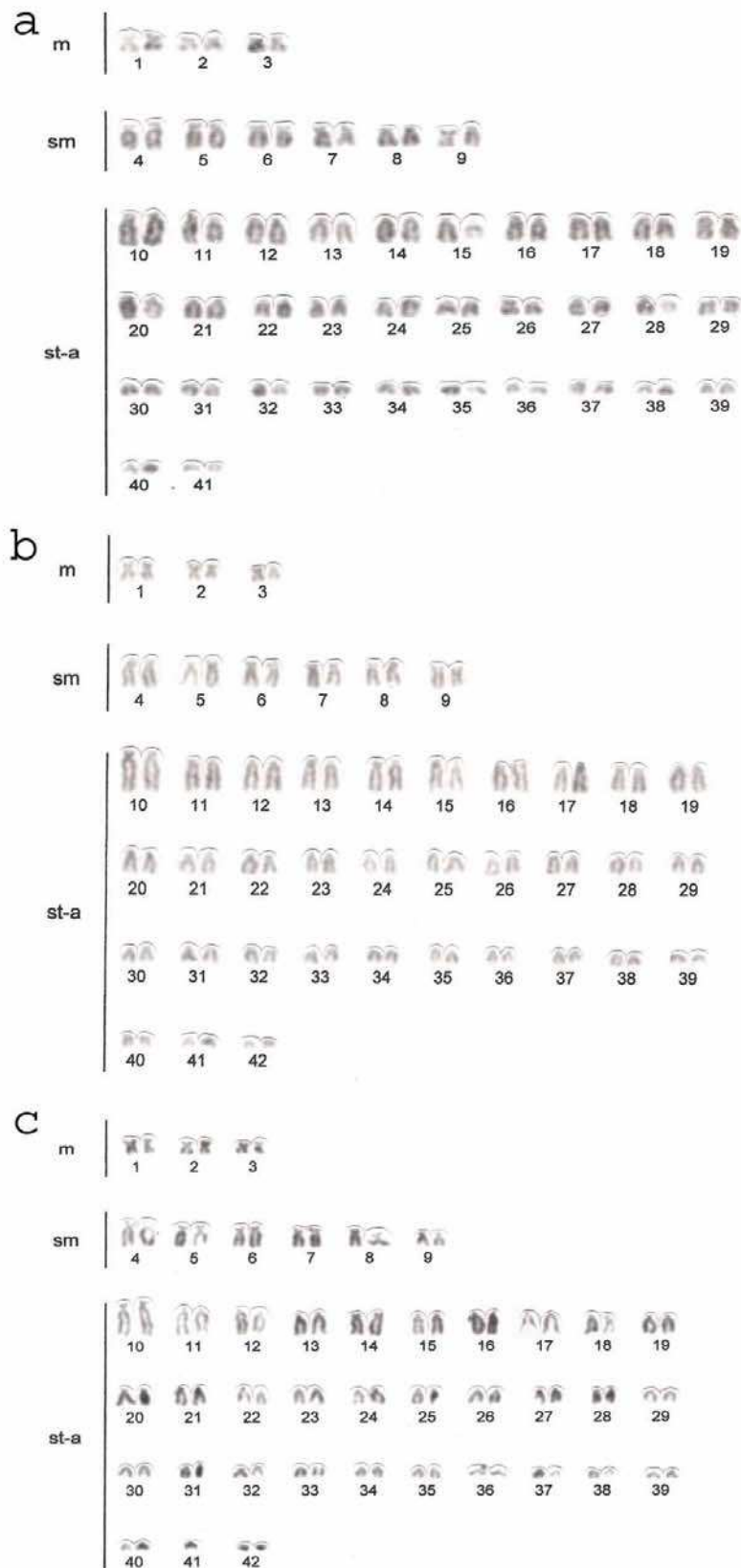


Figura 2 – Citótipos com $2n = 82$ cromossomos (a), $2n = 84$ cromossomos (b) e $2n = 83$ cromossomos (c) de *Hypostomus sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247*.

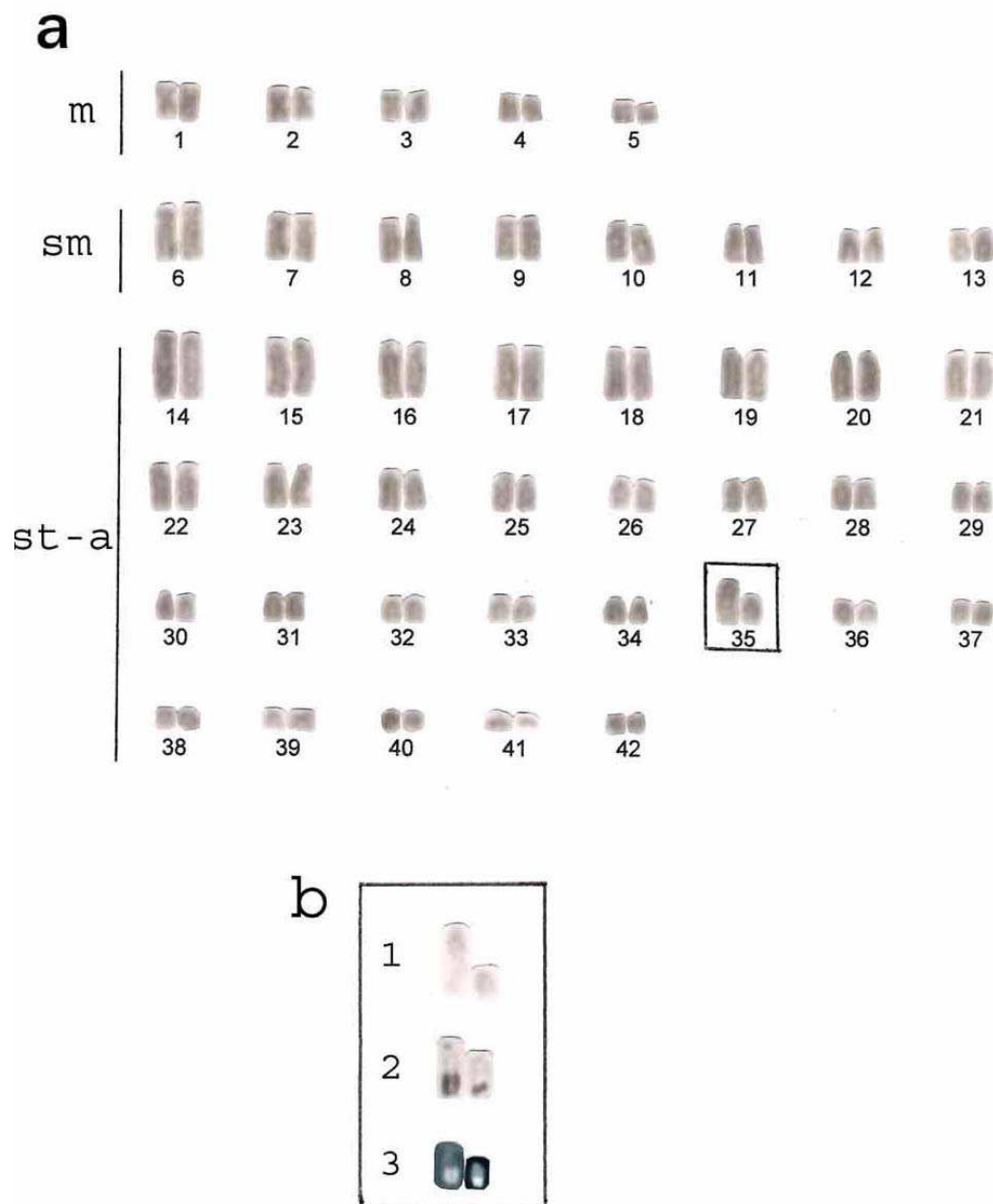


Figura 3 – Cariótipo de *Hypostomus* sp. 2- rio Perdido NUP 4249 com $2n = 84$ cromossomos (a); constrição secundária observada no par 35: em giemsa (b1), impregnação por $AgNO_3$ (b2) e coloração pelo fluorocromo CMA3 (b3).

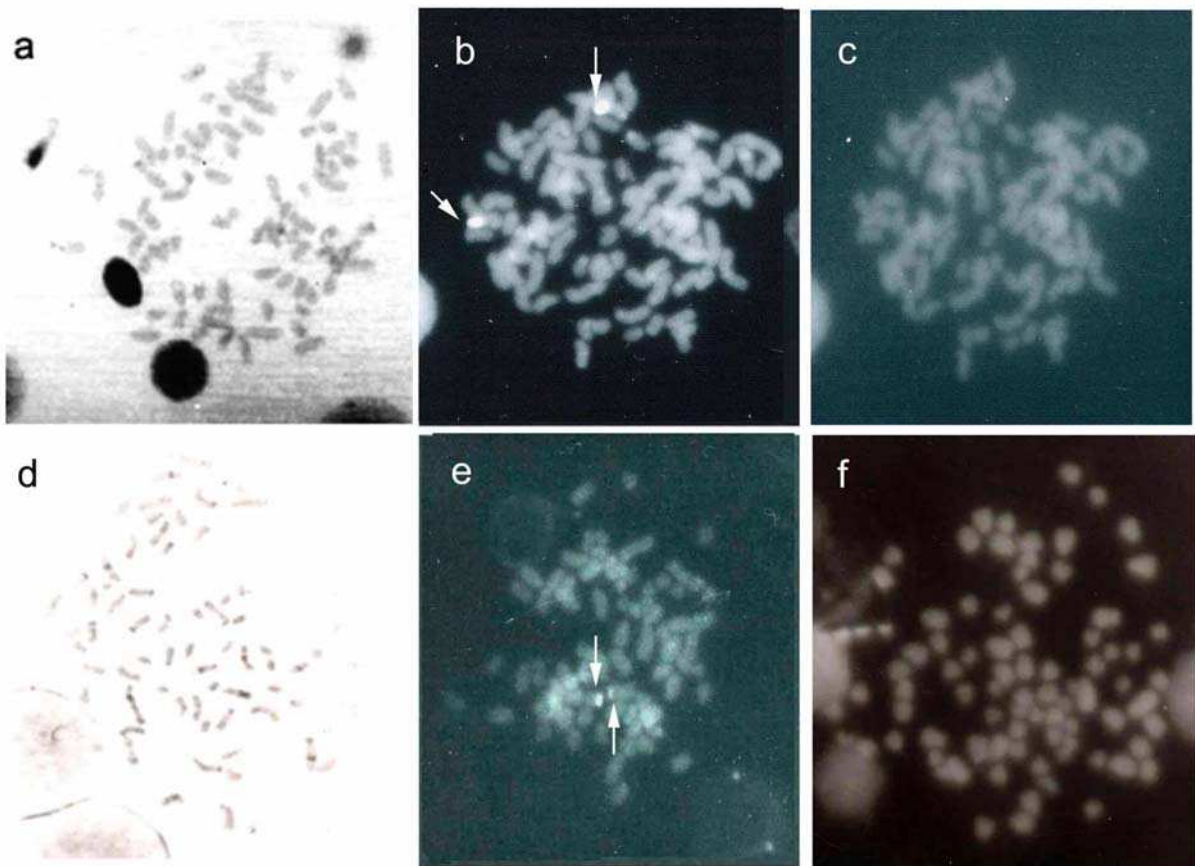


Figura 4 – Metáfases mostrando padrão de distribuição de heterocromatina por bandamento C, coloração com CMA₃ e DAPI em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (a, b,c) e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 (d, e, f), respectivamente.

ARTIGO 3 –**5 DETERMINAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS EM TRÊS ESPÉCIES DE *HYPOSTOMUS* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS**

Este artigo será submetido à Environmental Biology of Fishes.

DETERMINAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS EM TRÊS ESPÉCIES DE *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DO PLANALTO DA BODOQUENA, MS.

***Sandra dos Santos Cerealia*, *Renata da Rosa*^a, *Emanuele Pomini*^b,
Otávio Froehlich^b e *Lucia Giuliano-Caetano*^a**

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone: (43) 3371-4527 (e-mail: giuliano@uel.br)

^b Departamento de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Palavras-chave: *Hypostomus*, RON, CMA₃, FISH.

Resumo

Regiões Organizadoras de Nucléolos foram determinadas em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus cochliodon* coletados no Rio Salobra e no córrego Salobrinha, e coletados no rio Perdido, Planalto da Bodoquena – MS, Brasil. *H. cochliodon* e *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha NUP 4247 apresentaram vários cromossomos marcados com AgNO₃, porém apenas um par de cromossomos exibiram sítios marcados após a hibridação fluorescente in situ (FISH) com sonda de DNAr 18s. *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 apresentou apenas um par de cromossomos marcados por Ag-NO₃,

evidenciando um heteromorfismo de tamanho de RON. A hibridação com a mesma sonda também revelou apenas um par portador de sítios de DNAr 18S. Nas três espécies as bandas fluorescentes observadas com cromomicina A₃ apresentam padrão semelhante ao FISH.

Introdução

Variações no número, localização e tipos de cromossomos portadores das RONS são relatados para os Loricariidae. Duas espécies de Ancistrinae (*Pananque* cf. *nigrolineatus* e *Hemiancistrus* sp.) estudadas por Artoni & Bertollo (2001), mostram apenas um par de cromossomos portador de RONS, embora distintos entre ambas. Os mesmos autores relatam para Hypostominae, a ocorrência de RONS em apenas um par cromossômico em *Hypostomus emarginatus* e *Rhinelepsis asperai*, e dois pares em *Pogonopoma wertheimeri*. Artoni & Bertollo (1996), analisando espécies de *Hypostomus*, encontraram variações quanto ao número e tamanho das RONS entre homólogos, apresentando de dois até seis cromossomos portadores de cístrons ribossômicos.

Essa variação também é observada em outros grupos de peixes, como em *Eigenmannia* sp (Almeida-Toledo & Toledo-Filho 1985), *Serrasalmus spilopleura* (Galetti Jr. et al. 1985), *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al. 2000) e *A. altiparanae* (Pacheco et al. 2001).

Os dados sobre localização de genes ribossômicos 18s são poucos em Loricariidae, sobretudo quando comparado com a diversidade do grupo. Entretanto, Kavalco et al. (2005) detectaram as RONS em quatro espécies:

Neoplecostomus microps, *Harttia loricariformis* e *Upsilonodus* sp., todos com RONS simples; *Hypostomus affinis* com cinco sítios de DNAr.

No presente trabalho foram analisados, para detecção das RONS, exemplares de três espécies de *Hypostomus* provenientes do Planalto da Bodoquena, MS: *Hypostomus cochliodon*, *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido.

Materiais e Métodos

Foram analisados 13 exemplares de *Hypostomus cochliodon* Kner (1854), sendo um macho, sete fêmeas e cinco indivíduos jovens. Duas espécies aqui estudadas são novas para a ciência e estão depositadas no museu do NUPÉLIA, na Universidade Estadual de Maringá, sob número de registro NUP 4247 para *Hypostomus* sp. 3- córrego Salobrinha e NUP 4249 para *Hypostomus* sp. 2- rio Perdido. De *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 foram analisados 13 exemplares, sendo três machos, quatro fêmeas e seis indivíduos jovens, ambas as espécies foram coletadas no rio Salobra localizado 20 41' 34.56943"S e 56 44' 25.65932"W, e no córrego Salobrinha 20 41' 07.47583"S e 56 46' 44.28812"W. De *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 analisou-se cinco exemplares, sendo quatro machos e uma fêmea, coletados no rio Perdido 21 17' 09.16825"S e 56 41' 46.90770"W. Os rios e córrego acima citados se localizam no Planalto da Bodoquena, MS.

Para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foram utilizadas a técnica convencional (Bertollo et al. 1978) ou a técnica alternativa (Moreira Filho & Bertollo 1990). Os cromossomos foram classificados em três

grupos: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a), segundo Levan et al. (1964), com modificações. A detecção dos cromossomos portadores das RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolos), foi feita através impregnação por nitrato de prata (Howell & Black 1980) e por Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 18s, cedida por Martins, C. do Laboratório de Genética e Citogenética de Peixes da UNESP-Botucatu, segundo Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado & Jouve (1994). Para coloração com CMA₃/DAPI, Christian et al. (1998), com modificações.

Resultados

Em *Hypostomus cochliodon* as regiões organizadoras de nucléolos (RONS) marcadas pela prata (AgNO₃) evidenciaram até quatro cromossomos (Figura 1- 1a). Não foi observado heteromorfismo de RONS nestes espécimes. As metáfases apresentaram dois cromossomos com bandas fluorescentes, através da coloração com CMA₃ em região terminal, provavelmente correspondendo a um par portador da RON (Figura 1-1b). A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S mostrou apenas dois sítios marcados, em posição terminal (Figura 1-1c).

Hypostomus sp 3-córrego Salobrinha NUP 4247 apresentou marcações pela prata em até três cromossomos e estas se localizam na parte terminal do braço longo (Figura 1-2a). As RONS apresentam heteromorfismo de tamanho, em um par de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio. Com CMA₃ apenas dois cromossomos estavam marcados, provavelmente correspondendo a RON, com heteromorfismo (Figura 1-2b). FISH com sonda de DNAr 18S apresentou marcação em apenas um par (Figura 1-2c), não observando o heteromorfismo.

Em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249, através da impregnação pelo nitrato de prata, foi detectado um par marcado, na parte terminal do braço longo (Figura 1-3a), a hibridação “in situ” com sonda de DNAr 18S apresentou um par de cromossomos marcados, o mesmo resultando observou-se com a coloração com CMA₃ (Figura 1-3a, 3b e 3c, respectivamente). Foi observado heteromorfismo de tamanho de RONS em quatro exemplares dos cinco analisados de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido 4249, na coloração com giemsa a constrição secundária em um dos homólogos é bem evidente (Figura 2a), a impregnação por AgNO₃ e coloração com CMA₃ também evidencia esse heteromorfismo (Figura 2b e 2c, respectivamente).

Discussão

Algumas espécies de peixes apresentam mais de um par de cromossomos portadores de RONS, podendo ser denominadas RONS múltiplas, como observado em *H. cochliodon* e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247.

Em Loricariidae ocorre variabilidade no número, tipo cromossômico e localização das RONS, como pode ser verificado em Artoni & Bertollo (2001), que apresentam espécies com apenas um par portador de RONS: *Pananque* cf. *nigrolineatus*, *Hypostomus* aff. *auroguttatus*; dois pares: *Hypostomus albopunctatus*, *Pogonopoma wertheimeri*; três pares: *Hypostomus* sp. A *Hypostomus ancistroides*, entre outros. As RONS podem estar em diferentes tipos de cromossomos, associadas ou não à heterocromatina e localizadas, na maioria das espécies, na posição terminal do braço curto ou longo.

Mantovani et al. (2000), cita que essa variabilidade de RONS é bem descrita para peixes. Esses autores encontraram variações numéricas interindividual em duas populações de *Astyanax scabripinnis*, de um a cinco cromossomos portadores de RONS em uma população e de um a quatro em outra. Segundo os mesmos autores, eventos de transposição têm sido indicados como responsável pela maioria dos casos de variabilidade de RONS em peixes. Garcia et al. (1995), encontraram três cromossomos portadores de RONS em *Cynolebias duraznensis*, em dois deles estas se encontravam na posição terminal e a outra em região pericentromérica. Os autores sugerem que neste caso tenha ocorrido inversão.

A impregnação por AgNO₃ é considerada um método indireto para localização das RONS, pois o nitrato de prata se associa a proteínas nucleolares envolvidas com a atividade transcricional dos genes ribossomais e não diretamente com o DNAr (Miller et al. 1976 in Galetti Jr. e Martins 2004), sendo necessário para determinar os cromossomos portadores de genes ribossomais, e sua posição, o emprego da hibridação in situ.

Entre os Loricariidae existem alguns registros de regiões ricas em GC coradas por fluorocromos, coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolo como em: *Hypostomus* (Artoni et al. 1998, Artini & Bertollo 1999, Kavalco et al. 2004) e *Rineloricaria* (Giuliano-Caetano 1998), entre outros.

Heteromorfismo de tamanho de RONS entre os homólogos, como foi observado em *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249, também é relatado em outras espécies de *Hypostomus* por Artoni & Bertollo (1996).

Swarça et al. (1999), observou heteromorfismo de tamanho, entre os cromossomos portadores das RONS, em exemplares de *Pirinampus pirinampu*

sendo esta região ricas em bases CG. Embora Pendás et al. (1993) considere que a coloração com Nitrato de Prata não seja adequada para localização de genes ribossômicos e sim para o estudo de expressão de RONS, Swarça et al. (2001) confirmam os resultados acima citados utilizando hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S, sendo este heteromorfismo causado provavelmente por crossing over desigual.

Kavalco et al. (2005) estudando espécies de Loricariidae encontraram RONS simples, detectadas tanto por impregnação por Nitrato de Prata como por FISH em: *Neoplecostomus microps*, em posição intersticial no braço longo de um cromossomo submetacêntrico; *Harttia loricariformis* em posição terminal do braço longo do maior cromossomo acrocêntrico; *Ursilodus* sp. Região terminal do braço longo de um cromossomo metacêntrico de tamanho médio. Por outro lado em *Hypostomus affinis*, os mesmos autores, encontraram quatro marcações com Nitrato de Prata e cinco sítios de DNAr 18S, localizada na região terminal do braço longo de: 2 cromossomos metacêntrico; 2 acrocêntricos de tamanho médio e 1 cromossomo acrocêntrico grande, nesta espécie também observou-se heteromorfismo de tamanho de RONS em dois indivíduos.

Pelos resultados obtidos, as espécies analisadas no presente trabalho apresentam apenas um par portador da região organizadora de nucléolo, através da hibridação *in situ*, sendo este resultado apenas coincidente com a impregnação de prata em *Hypostomus* sp2-rio Perdido, nas demais espécies a técnica de impregnação pela prata apresentou outros cromossomos que possuem proteínas acídicas, não relacionadas à genes ribossomais.

Referências Bibliográficas

- Almeida-Toledo, L.F. & Toledo-Filho, S.A., 1985. Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica* 66: 85-88.
- Artoni, R.F & Bertollo L.A.C, 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 8 1-90.
- Artoni, R.F & Bertollo L.A.C, 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209-214.
- Artoni, R.F & Bertollo L.A.C, 2001. Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.
- Artoni, R.F, Venere P.C & Bertollo L.A.C, 1998. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63: 421 -425.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. 1978. Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.* 1: 103-120.
- Christian, A., McNeil, E., Roinson, J., Drabek, R., LaRue, S., Waldren, C. And Bedford, J. 1998. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:172-179.
- Cuadrado, A. & Jouve, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticales. *Chromo. Res.*, 2: 331-338.
- Galetti Jr., P.M, Silva E.B & Cerminaro R.T, 1985. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Brazil. J. Genet.* 8: 479-484.

- Galetti Jr., P.M. & Rasch, E. 1993. Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A₃ (Teleostei:Poeciliidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*. 4(3):269-227.
- Garcia, G. Scvortzoff, E. & Hernández, A. 1995. Karyotypic heterogeneity in south american annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Pisces, Cyprinodontiformes Rivulidae). *Cytologia*. 60:103-110.
- Giuliano-Caetano, L., 1998. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T., Anamthaw-Jónsson, K., Leitch, A.R., Shi, M. & Leitch, I.J. 1991. In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique- J. Meth. Cell. Mol. Biol.*, 3: 109-116.
- Howell, W.M. & Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kavalco, K.F., Pazza, R, Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*. 94: 180-186.
- Kavalco, K.F., Pazza, R, Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2004. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas* 141: 237-242.
- Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Mantovani, M., Abel, L.D.S., Mestriner, C.A. & Moreira-Filho, O. 2000. Acentuated polymorphism of heterochromatin and nuclear organizer regions in *Astianax*

scabripinnis (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109: 161-168.

Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. 1990. Uma técnica alternativa para preparações cromossômicas de peixes. III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Botucatu, SP.

Pacheco, R.B., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. 2001. Cytotypes and Multiple NORs in *Astyanax altiparanae* Population (Pisces, Tetragonopiterinae). *Chromosome Science* 5: 109-114.

Pendás, A. M., Morám, P. and Garcia-Vasquez, E. 1993. Milti-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brow trout. *Chrom. Res.* 1:63-67.

Schweizer, D., 1980. Simultaneous, fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, **27**: 190-193.

Sola, L., Rossi, A. R., Iaselli, V. et al. 1992. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* . II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3 and silver staining. *Cytogenet. Cell. Genet.* 60: 229-235.

Swarça, A.C. Giuliano-Caetano, L., Dias, A. L. 1999. Cytogenetic characterization through chromosomic banding of *Pirinampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin PR/Brazil. *Caryologia* 1-2:31- 35.

Swarça, A.C. Giuliano-Caetano, L., Vanzela, A. L.L. and Dias, A. L. 2001. Heteromorfism of rDNA size in *Pirinampus pirinampu* (Pisces: Pimelodidae) detected by *in situ* Hybridization. *Cytologia* 66: 275-278.

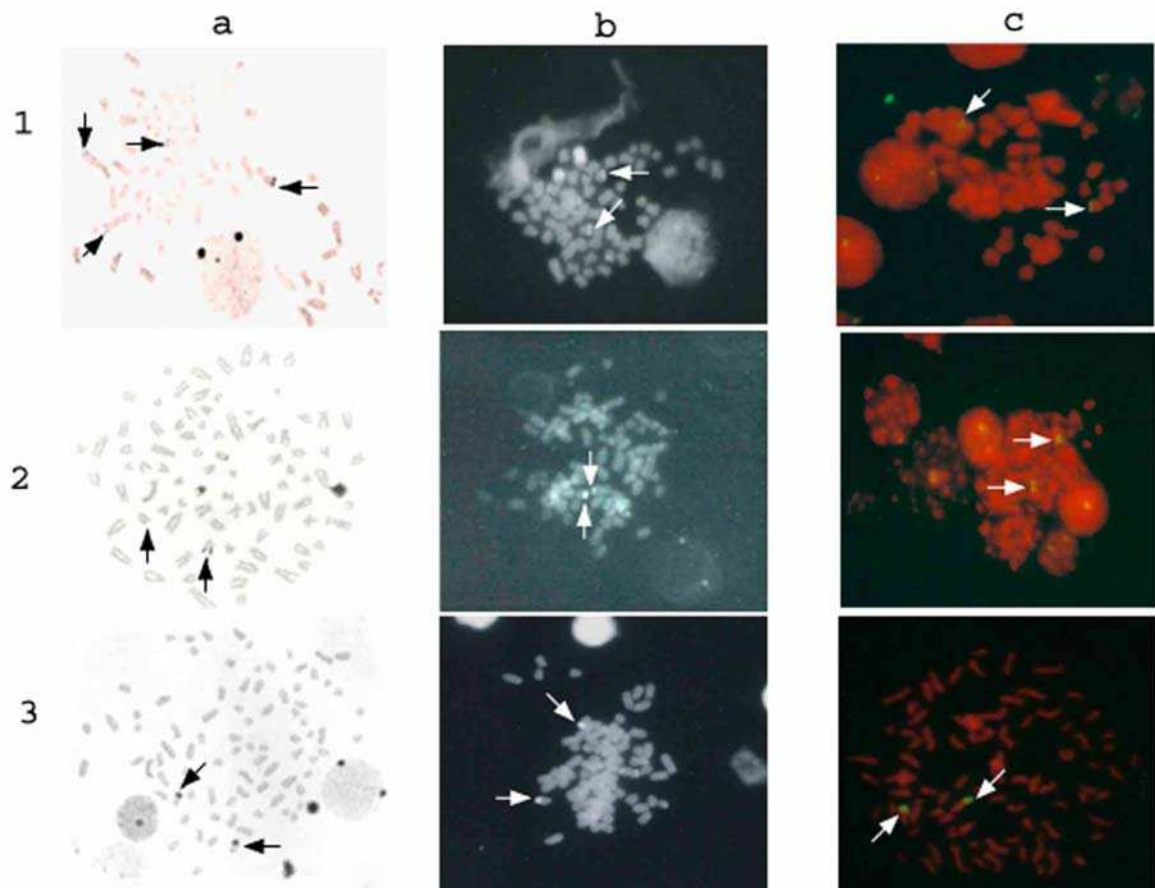


Figura 1 – (1) Metáfases de *Hypostomus cochliodon*, (2) *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247 e (3) *Hypostomus* sp.-2 rio Perdido NUP 4249 (a), após Ag-
RON (b) Coloração com CMA3 e (c) hibridação fluorescente in situ com sonda de
DNAr 18S.



Figura 2 – Cromossomos portadores de RONS em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 evidenciando o heteromorfismo de tamanho: (a) constrição secundária observada em giemsa; (b) impregnação pelo nitrato de prata e (c) coloração pelo fluorocromo CMA₃.

6 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que:

- 1 *Hypostomus cochliodon*, apesar do número diplóide $2n=64$ cromossomos em ambos os sexos, a análise dos cariótipos de macho e fêmeas, bem como a distribuição diferencial de heterocromatina entre os sexos, sugere a existência de um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY.
- 2 Pode ter ocorrido inversão pericêntrica nas fêmeas de *Hypostomus cochliodon*, envolvendo os cromossomos 15 e 22, uma vez que houve alteração na morfologia cromossômica, sem alteração do número diplóide, conseqüentemente há uma alteração do número fundamental (NF), $NF=100$ nos machos e $NF=99$ nas fêmeas.
- 3 *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha apresentou polimorfismo cromossômico numérico, com dois números modais distintos $2n = 82$ e $2n = 84$ com mudança na fórmula cromossômica e no número fundamental, esse polimorfismo deve-se a presença de dois cromossomos extras.
- 4 Em quatro exemplares de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha não foi possível definir o número diplóide, com linhagens celulares compostas de $2n=83$ (25,6%) e $2n=84$ (28,2%) cromossomos em um indivíduo, e $2n=82$ (30,4%), $2n=83$ (26,2%) e $2n=84$ (32,6%) cromossomos nos outros três, caracterizando um mosaico genético devido a presença de um a dois cromossomos extras.
- 5 *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido apresentou número diplóide $2n=84$ em todos os exemplares analisados com fórmula cariotípica de $6M + 16SM + 62ST-A$ e número fundamental igual a 106.
- 6 Nas três espécies estudadas as regiões heterocromáticas detectadas por banda C apresentam marcações fluorescentes com CMA₃, o que evidencia que estas são regiões GC-ricas.
- 7 Nenhuma das três espécies apresentou marcações com DAPI, o que indica que possivelmente regiões AT-ricas são muito pequenas ou não existem.

- 8 *H. cochliodon* e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha apresentaram até quatro marcações com AgNO_3 , porém apenas um par de cromossomos exibiram sítios marcados após a hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S.
- 9 *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido apresentou apenas um par de cromossomos marcados pela impregnação com nitrato de prata, evidenciando um heteromorfismo de tamanho de RON. A hibridação com a mesma sonda, também revelou apenas um par portador de sítios de rDNA.
- 10 Nas três espécies as bandas fluorescentes após a coloração com CMA_3 apresentam padrão semelhante ao FISH.
- 11 Ocorreu o aumento na amplitude de variação para o gênero *Hypostomus*, uma vez que o maior número diplóide até agora descrito era $2n = 80$ cromossomos, em *Hypostomus* sp. E (Artoni & Bertollo 1996), porém *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha apresentou $2n = 82$ cromossomos e *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido $2n = 84$ cromossomos.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados em *Hypostomus cochliodon*, apontando para um possível sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY, porém não é conclusivo devido ao fato de haver apenas um exemplar macho. Portanto, futuras coletas de exemplares desta espécie podem ampliar a amostra, dando condições para que se confirme a existência de cromossomos sexuais ou a ocorrência de polimorfismo de heterocromatina.

Como *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha são espécies novas para a ciência, outros exemplares serão coletados para uma descrição segura das mesmas, expandindo os locais de coleta, possibilitando assim a ampliação da amostra, bem como o estudo de outras populações das referidas espécies.

Durante as coletas de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido foi capturado um exemplar de *Hypostomus* sp. 1-rio Perdido, também novo para a ciência, e foi citogeneticamente analisado. Este indivíduo apresentou $2n = 68$ cromossomos, o padrão de distribuição de heterocromatina é semelhante a *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha, com pequenas bandas centroméricas e teloméricas. Regiões teloméricas de vários cromossomos acrocêntricos mostram marcas fluorescentes após coloração com CMA₃, sendo três delas mais brilhantes. Assim como nas outras espécies estudadas neste trabalho, o DAPI não apresentou regiões brilhantes. A impregnação pelo Nitrato de Prata mostrou a presença de Ag-RONs múltiplas, porém o FISH apresenta três marcações. Poucos exemplares foram analisados, desta forma novas coletas deverão ser realizadas neste ponto e em outros para descrição e caracterização citogenética de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido.

Também foram coletados quatro exemplares de *Ancistrus* spp. No córrego Salobrinha e no rio Salobra. Não foi possível uma correta identificação dos exemplares. Um indivíduo apresentou metáfases não sendo possível determinar com segurança o número diplóide, que variou entre $2n = 55$ e $2n = 56$, não sendo possível estabelecer um cariótipo padrão, pois haviam variações na fórmula cariotípica em cada metáfase montada. No outro indivíduo, o número diplóide permaneceu constante $2n = 56$ cromossomos, porém também havia variações na

fórmula cromossômica nas diferentes metáfases. Existe uma forte evidência de que ocorra pelo menos duas espécies de *Ancistrus* nos rios amostrados. Uma identificação adequada dos exemplares coletados na região já está em andamento e novas coletas serão realizadas, permitindo que as análises citogenéticas sejam feitas em um número maior de exemplares. Mariotto *et al.* (2004) descreve a ocorrência de cromossomos sexuais em *Ancistrus* cf. *dubius* coletados em riachos da bacia do Paraguai, em Mato Grosso, somente com uma amostragem maior poderemos comparar os sexos e observar se cromossomos sexuais podem estar relacionados também na variação observada.

Considerando as características peculiares da região do Planalto da Bodoquena, com espécies endêmicas e outras ainda não descritas, os estudos citogenéticos em peixes tornam-se muito interessantes, tanto para a ampliação do conhecimento das características cromossômicas quanto para uma discussão sobre o caráter evolutivo nos Loricariidae desta região.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Toledo, L.F. & Toledo-Filho, S.A., 1985. Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica* 66: 85-88.
- Alves, A.L. 2000. Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. MSc Thesis, Universidade Estadual Paulista. 129pp.
- Andreatta A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C & Toledo-Filho S.A., 1993. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I1 ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220.
- Andreatta A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C. & Toledo-Filho S.A., 1994. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia* 47: 27-37.
- Andreatta A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira, C. & Toledo-Filho S.A., 1992. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57: 369-372.
- Armbruster, J.W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 141: 1-80.
- Artoni R.F & Bertollo L.A.C, 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 8 1-90.
- Artoni R.F & Bertollo L.A.C, 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209-214.
- Artoni R.F & Bertollo L.A.C, 2001. Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.

Artoni R.F, Molina W.F, Bertollo L.A.C & Galetti Jr. P.M, 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* 22: 1-6.

Artoni, R.F, Venere P.C & Bertollo L.A.C, 1998. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63: 421 -425.

Bertollo, L.A.C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. 1978. Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae) . *Brazil. J. Genet.* 1: 103-120.

Boggiani, P.C. 1999. Porque Bonito é bonito? *In* Scremim-Dias, E., Pott, V.J., Hora, R.C. & Souza, P.R. *Nos Jardins Submersos da Bodoquena*. Editora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

Britski, H.A., Silimon, K.Z.S., Lopes, B.S. 1999. *Peixes do Pantanal. Manual de Identificação*. Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP.

Burgess, W.E. 1989. *An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes*. TFH Publications. 784p.

Carvalho, M.L., Oliveira, C., Foresti, F. 1998. Nuclear content of thirty species of Neotropical fishes. *Genet Mol Biol* 21: 47–54.

Centofante, L., Bertollo, L.C.A. & Moreira-Filho, O. 2006. Cytogenetic characterization and description of na XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Hartia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet and Genome Res* 112: 320-324.

Christian, A., McNeil, E., Roinson, J., Drabek, R., LaRue, S., Waldren, C. And Bedford, J. 1998. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:172-179.

Cuadrado, A. & Jouve, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticeale. *Chromo. Res.*, 2: 331-338.

Damasceno Jr., G.A.; Nakajima, J.N. & Rezende, U.M. 2000. Levantamento florístico das cabeceiras dos rios Negro, Aquidauana, Taquari, Miranda no Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Pp. 152-162 In Willink, P.W.; Chernoff, B.; Alonso, L.; Montambault, J.R. & Lourival, R., Eds. RAP Bulletin of Biological Assessment, 18: Uma Avaliação Biológica dos Ecossistemas Aquáticos do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conservation International, Washington.

Fenocchio, A.S. 1993. Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei. PhD Thesis, Universidade de São Paulo. 122pp.

Froehlich, O. 2003 Padrões de variação da riqueza de espécies e composição de comunidades de peixes em poções de um riacho da serra da bodoquena, MS. Tese de Mestrado Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 27pp.

Galetti Jr., P.M, Silva E.B & Cerminaro R.T, 1985. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). Brazil. J. Genet. 8: 479-484.

Giuliano-Caetano, L., 1998. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Guerra, M. (1988). Introdução à Citogenética Geral. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ. 142p.

Heslop-Harrison, J.S.; Schwarzacher, T.; Anamthaw-Jónsson, K.; Leitch, A.R.; Shi, M. & Leitch, I.J. 1991. In situ hybridization with automates chromosome denaturation. Technique- J. Meth. Cell. Mol. Biol., 3: 109-116.

Howell, W.M. & Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experimentia 36: 1014-1015.

Kavalco, K.F., Pazza, R, Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Heredity. 94: 180-186.

Lara M.C.S, 1998. Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do rio Paraná. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 46 pp.

Lara-Kamei, M.C.S. & Júlio Jr., H.F. 2002. Diversidade cromossômica em espécies do gênero *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae) de um riacho da bacia do Rio Paraná. Anais do IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá-PR, Brasil, p. 63.

Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Mantovani, M., Abel, L.D.S., Mestriner, C.A. & Moreira-Filho, O. 2000. Acentuated polymorphism of heterochromatin and nuclear organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109: 161-168.

Mariotto S., Artoni, R.F. & Miyazawa, C.S. 2004. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*. 57(4): 327-331.

Michelle J.L., Takahashi C.S. & Ferrari I. 1977. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 42: 539-546.

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

Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. 1990. Uma técnica alternativa para preparações cromossômicas de peixes. III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicals, Botucatu, SP.

Pacheco, R.B., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. 2001. Cytotypes and Multiple NORs in *Astyanax altiparanae* Population (Pisces, Tetragonopterinae). *Chromosome Science* 5: 109-114.

Scavone M.D. & Julio Jr. H.F. 1995. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichtys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). *Brazil. J. Genet.* 18: 31 -35.

Scavone M.D. & Julio Jr., H.F. 1994. Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. females (Loricariidae-Siluriformes) from the Parana river basin. *Rev. Ictiol.* 213: 41-47.

Scavone, M.D.P. 1993. Análise citogenética de espécies dos gêneros *Loricaria* e *Loricariichthys* (Loricariidae, Siluriformes) da bacia do rio Paraná . MSc Thesis, Universidade Estadual de Maringá. 82pp.

SEMA/MS - Secretaria de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul
http://www.sema.ms.gov.br/parque_nacional_da_serra_da_bodo.htm

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

White, M.J.D. 1973. The evolution of sex determination. I. Simple systems. *Animal cytology and evolution*. The University Press, Cambridge, pp.573-626.

Willink, P.W., Froehlich, O., Machado-Allison, A., Menezes, N.A., Oyakawa, O.T., Catella, A.C., Chernoff, B., Lima, F.C.T., Toledo Piza, M., Ortega, H., Zanata, A.M. & Barriga, R. 2000. Diversidade, Distribuição, e Habitats Críticos dos Peixes dos Rios: Negro, Negrinho, Taboco, Taquari e Miranda, e sua Importância para Conservação e Desenvolvimento Sustentável do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *In* Willink, P.W., Chernoff, B., Alonso, L., Montambault, J.R. & Lourival, R. Uma Avaliação Biológica dos Ecossistemas Aquáticos do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conservation International, Washington.

ANEXOS

ANEXO 1

Chave provisória para os *Hypostomus* do Planalto da Bodoquena, elaborada pelo Profº Drº Cláudio Zawadski, da Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Anexo 1 – Chave provisória para os *Hypostomus* do Planalto da Bodoquena, elaborada pelo Profº Drº Cláudio Zawadski, da Universidade Estadual de Maringá - UEM

1. Pintas escuras pequenas, conspícuas e próximas umas das outras; comprimento da adiposa igual ou maior do que a altura mínima do pedúnculo caudal nos adultos; dorsal não alcançando duas placas antes da adiposa; região inferior da cabeça totalmente coberta por placas, com exceção da região coberta pelo lábio inferior; dentes delgados e compridos; quilha no pterótico-supracleitro (veja Armbruster, 2003).....*Hypostomus* sp. 1 rio Perdido (NUP 4248)

- 1'. Sem estas características.....2

2. Pintas escuras relativamente grandes e relativamente conspícuas; sem quilhas evidentes nas séries dorsal e dorsal-média; aproximadamente 10 dentes no dentário ou prémaxilar; nadadeiras ventrais quase ou apenas alcançando a origem da anal; diâmetro do olho aproximadamente 6,8 vezes no comprimento da cabeça*Hypostomus* sp. 2 rio Perdido (NUP 4249).

- 2' . Pintas escuras conspícuas apenas sobre as nadadeiras, inconspícuas sobre o corpo; quilhas evidentes nas séries dorsal e dorsal-média; aproximadamente 20 dentes no dentária ou prémaxilar; nadadeiras ventrais nitidamente ultrapassando a origem da anal; diâmetro do olho aproximadamente 5,6 vezes no comprimento da cabeça *Hypostomus* sp. 3 córrego Salobrinha (NUP 4247)

ANEXO 2

Tabelas de contagens cromossômicas em *Hypostomus cochliodon*,
Hypostomus sp. 2-rio Perdido NUP 4249 e *Hypostomus* sp. 3-córrego
Salobrinha NUP 4247.

Anexo 2 – Tabelas de contagens cromossômicas em *Hypostomus cochliodon*, *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 e *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247

Tabela 2 – Número de cromossomos de macho (M), fêmeas (F) e indivíduos jovens (J) de *Hypostomus cochliodon*. Em negrito o número diplóide modal observado.

Número e sexo	Número de cromossomos						Total de células
	60	61	62	63	64	65	
03J	1	1	5	5	18		30
04F		1	4	7	20	1	32
05F	1		3	8	22		34
06F			6	5	19		30
07F	1	1	6	3	21		32
08J	1		4	5	20		30
09J	2	1	5	5	21	1	35
11M	2	1	6	2	25	1	37
17F		1	7	8	17		33
19J	1	2	6	4	23		36
20J			5	6	19		30
28F	1		4	6	22		33
29F	1	1	9	5	16	1	33
Total							425

Tabela 3 – Número de cromossomos de macho (M), fêmeas (F) e indivíduos jovens (J) de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247. Em negrito os diferentes números diplóides modais observados.

Número e sexo	Número de cromossomos						Total de células
	80	81	82	83	84	85	
01J	2	3	7	4	14		30
02J	2	2	7	5	15	1	32
10M	1		3	2	24		30
12M	6	4	5	10	11	1	39
13F	4		15	14	18	2	53
14M	8	6	18	4	3		39
16F	4	5	18	7	9	1	45
21F	2	1	5	4	19	1	32
22J	2	1	15	12	14		44
26J	2	2	9	1	17		31
27J	1		1	9	21		32
30F	8	5	12	10	8	1	44
31J	3	4	7	4	18	1	37
1T32total							526

Tabela 4 – Citótipos, frequência e quantidade de machos (M), fêmeas (F) e indivíduos jovens (J) de *Hypostomus* sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247.

Citótipo	Frequência %	Quantidade/Sexo
2n=82	14,28	1M 1F
2n=84	50,00	1M 1F 5J
2n=83/2n=84	7,15	1M
2n=82/2n=83/2n=84	28,57	2F 1J
Total	100	3M 4F 6J

Tabela 5 – Número de cromossomos de machos (M) e fêmea (F) de *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249.

Número e sexo	Número de cromossomos				Total de células
	82	83	84	85	
36F	3	2	23	2	30
37M	2	7	25		34
38M	6	5	21	1	33
40M	6	4	18	2	30
41M	7	3	19	2	31
Total					158