



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELÉIA RUBERT

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES
POPULAÇÕES DO GÊNERO *Hypostomus* (LORICARIIDAE,
HYPOSTOMINAE)”**

Londrina
2007

MARCELÉIA RUBERT

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES
POPULAÇÕES DO GÊNERO *Hypostomus* (LORICARIIDAE,
HYPOSTOMINAE)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Giuliano-
Caetano

Londrina
2007

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R895e Rubert, Marceléia.

Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero
Hypostomus (LORICARIIDAE HYPOSTOMINAE) /
Marceléia Rubert. – Londrina, 2007.
105f. : il.

Orientador : Lucia Giuliano-Caetano.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) –
Universidade Estadual de Londrina, 2007.

Inclui bibliografia .

1. Loricarideo – Genética animal – Teses. 2. Citogenética animal –
Teses. I. Giuliano-Caetano, Lúcia. II.

MARCELÉIA RUBERT

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES
POPULAÇÕES DO GÊNERO *Hypostomus* (LORICARIIDAE,
HYPOSTOMINAE)**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Giuliano-Caetano
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Jr
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 23 de fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me dar forças e possibilitar tantas graças em minha vida.

Aos meus pais, **Olmardiles** e **Nilva**, que sempre me apoiaram em minhas decisões e sempre foram minha base para tudo. Amo vocês!

Ao meu noivo, **Jyann**, pelo seu carinho e compreensão, tornando esta etapa da minha vida mais fácil.

Aos meus irmãos, **Cesar** e **Sílvia**, pelo incentivo.

À minha velha amiga **Ana Maria**, que desde nossa infância sempre foi uma irmãzona, mesmo longe sempre esteve me apoiando e me ajudando em qualquer situação e também as minhas outras velhinhas **tia Rê** e **Deborah**, que sempre me deram muito apoio, amigas que eu nunca esqueço, muitas saudades...

À minha querida amiga **Renata**, que me acolheu e me ensinou muita coisa na citogenética, e com o passar do tempo acabou se tornando minha grande amiga e confidente.

À **Larissa Pires**, que se tornou uma grande amiga e companheira em tudo!!!

Ao pessoal do laboratório que de alguma forma me ajudou neste trabalho desde ensinamentos até os momentos de descontração: **Rafael, Rosiley, Larissa Lacerda, Vitor, Gabriel, Ju Mazucks, Vivian e Treco**.

À minha orientadora, Dr^a **Lucia**, por acreditar em mim, ter toda a paciência do mundo com a minha ansiedade, pelos ensinamentos, por ser uma grande amiga e por não “enlouquecer” comigo. Muito obrigada!

À minha “coorientadora”, Dr^a **Ana Lúcia**, pelos ensinamentos, dicas e pela amizade dentro e fora do laboratório.

Ao professor Dr. **Vladimir Pavan Margarido**, que me deu um voto de confiança e possibilitou com que eu pudesse iniciar e seguir a citogenética.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À **Universidade Estadual de Londrina** e ao **Programa de Pós-Graduação**, pelo apoio e suporte durante a realização deste trabalho.

RUBERT, Marceléia. **Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae)**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2007.

RESUMO

O gênero *Hypostomus*, popularmente conhecido como cascudo, é um dos gêneros mais especiosos na família Loricariidae, tendo aproximadamente 120 espécies, sendo dominante nos rios brasileiros por apresentar uma grande adaptabilidade a mudanças ambientais. Apresentam uma ampla diversidade quanto ao padrão de coloração e morfologia, o que dificulta a identificação de determinadas espécies, principalmente aquelas com ampla distribuição geográfica. Foram analisadas cinco espécies do gênero *Hypostomus*: *H. paulinus*, *H. strigaticeps*, *H. regani* e *H. ancistroides*, coletadas em cinco locais diferentes: ribeirão Três Bocas, rio Água das Pedras, rio Jacutinga, rio Taquari e no rio Água do Pato; e três populações de *H. nigromaculatus*: coletadas no ribeirão Três Bocas, ribeirão dos Apertados e cachoeira de Emas-rio Mogi Guaçu, sendo esta última, a localidade tipo de *H. nigromaculatus*. Os exemplares foram submetidos aos estudos citogenéticos por meio da coloração convencional (Giemsa), impregnação por nitrato de prata, fluorocromos CMA₃ e DAPI e bandamento-C. Na análise por Giemsa para *H. nigromaculatus* foi verificado para as três populações $2n = 76$, no entanto com diferenças quanto às fórmulas cariotípicas. O nitrato de prata detectou RONS múltiplas em todas as populações, porém com diferenças quanto a localização. A coloração com fluorocromo CMA₃ foi correspondente aos cromossomos AgRONS, além de uma banda negativa anteriores às RONS na população do rio Mogi Guaçu. Na coloração com DAPI foram observadas regiões negativas correspondentes as RONS para as três populações; as bandas anteriores as RONS apresentaram-se coradas com DAPI para a população do rio Mogi Guaçu. A heterocromatina está distribuída terminalmente em alguns cromossomos (st-a), pericentromérica em um par (m) e associada às RONS, para a população de *H. nigromaculatus* do ribeirão Três Bocas e ribeirão dos Apertados; e terminal em 2 pares de cromossomos (st-a) anterior à constrição secundária e pericentromérica em 2 cromossomos (m), para a população do rio Mogi Guaçu. *H. paulinus* apresentou $2n = 76: 6m+16sm+54st-a$; *H. strigaticeps* $2n = 72: 10m+16sm+46st-a$; *H. regani* $2n = 72: 10m+18sm+44st-a$; e *H. ancistroides* $2n = 68: 10m+26sm+32st-a$. A impregnação por nitrato de prata detectou RONS múltiplas para a maioria das espécies analisadas, com exceção de *H. paulinus*. A coloração com CMA₃ evidenciou os cromossomos AgRONS, em *H. paulinus* além das RONS um par com heterocromatina segmentada e em *H. strigaticeps* todos os cromossomos apresentaram regiões centroméricas ricas em GC. Com DAPI apenas *H. strigaticeps* apresentou bandas fluorescentes. A heterocromatina está distribuída, com exceção de *H. regani* e *H. paulinus*, nas regiões terminais e pericentroméricas. Para *H. strigaticeps*, foi observado um polimorfismo intra e inter-populacional quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina, a qual está distribuída na região pericentromérica de um par de cromossomos (m) e variando de cinco a oito cromossomos (st-a) com heterocromatina localizada na região terminal do braço longo, apresentando ou não seu homólogo heterocromático. Os resultados obtidos no presente trabalho são importantes para uma melhor caracterização das espécies estudadas e podem auxiliar nos estudos relacionados a evolução cariotípica envolvida na especiação do gênero *Hypostomus* e da família Loricariidae.

Palavras-chave: Loricarideo. Genética animal. Citogenética animal.

RUBERT, Marceléia. **Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae)**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2007.

ABSTRACT

The *Hypostomus* genus, commonly known as “cascudos” in Brazil, is one of the most specious genus in the Loricariidae family, having about 120 species, these fishes dominates the brazilians rivers showing a great adaptability to environmental changes. They show a wide diversity in the morphology and color pattern, wich dificulty the identification of determinated species, especially those with a large geographic distribution. It had been analysed five species of the *Hypostomus* genus: *H. paulinus*, *H. strigaticeps*, *H. regani* and *H. ancistroides*, collected from five different rivers: Três Bocas, Água das Pedras, Jacutinga, Taquari and Água do Pato; and three populations of *H. nigromaculatus* collected from Três Bocas and Apertados streams and cachoeira de Emas-Mogi Guaçu river, being the last one, the *H. nigromaculatus* locality type. The samples were submitted into cytogenetics studies by convencional color (Giemsa), silver nitrate staining, C-banding and CMA₃ and DAPI fluorochromes. The diploid number verified for the three populations of *H. nigromaculatus* was $2n = 76$, with different karyotypic formulae. The silver nitrate evidencing multiple NORs in all populations, however with differences on their location. The CMA₃ fluorochrome showed the same pattern as AgNORs chromosomes. The heterochromatin is distributed terminally in some subtelo-acrocentric chromosomes, pericentromeric on a metacentric pair and NOR associated, for the Três Bocas and Apertados stream populations; terminal on two subtelo-acrocentric chromosomes pairs, anterior to the secondary constriction and pericentromeric on two metacentric chromosomes for the Mogi Guaçu river population. *H. paulinus* showed $2n = 76: 6m+16sm+54st-a$; *H. strigaticeps* $2n = 72: 10m+16sm+46st-a$; *H. regani* $2n = 72: 10m+18sm+44st-a$; and *H. ancistroides* $2n = 68: 10m+26sm+32st-a$. The silver nitrate staining showed multiple NORs, for the most species, with exception for the *H. paulinus*. The CMA₃ evidenced the AgNORs chromosomes and in *H. paulinus* besides the NORs, a segmented heterochromatin on a subtelo-acrocentric pair. The heterochromatin is distribute, with exception for *H. regani* and *H. paulinus*, at telomeric and pericentromeric regions. In *H. strigaticeps*, was observed a polymorphism inter and intra-populational at the heterochromatin pattern distribution, wich is distribute at pericentromeric region of the metacentric chromosome pair, ranging from 4 to 6 (st-a) chromosomes, with heterochromatin located terminal on the long arm region, showing or not its homologue. The results obtained on this work are important to improve the characterization of the species and make possible the studies related to the karyotypic evolution and spetiation of the *Hypostomus* genus and Loricariidae family.

Keywords: Loricarideo. Animal Genetics. Cytogenetics animal.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados citogenéticos para a/Espécie, Local de coleta, número diplóide (2n), fórmula cromossômica, número fundamental (NF) e referência (Ref.).
m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; MT = Mato Grosso; SP = São Paulo; PR = Paraná – Estados Brasileiros;
*** diferentes localidades da bacia do Paranapanema 65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa dos locais de coleta: **A)** ribeirão Três Bocas, **B)** rio Água das Pedras e **C)** ribeirão dos Apertados (Londrina/PR); **D)** rio Jacutinga e **E)** rio Taquari (Jataizinho/PR) na bacia do rio Tibagi; **F)** rio Água do Pato (Iepê/SP) bacia do Paranapanema; **G)** rio Mogi Guaçu/SP na bacia do rio Grande21
- Figura 2** – Fotos dos locais de coleta: **A)** ribeirão Três Bocas, **B)** rio Água das Pedras e **C)** ribeirão dos Apertados (Londrina/PR); **D)** rio Jacutinga e **E)** rio Taquari (Jataizinho/PR); **F)** rio Água do Pato (Iepê/SP); **G)** cachoeira de Emas - rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP).....22
- Figura 3** – Espécies analisadas: **A)** *H. strigaticeps*, **B)** *H. ancistroides*, **C)** *H. nigromaculatus*, **D)** *H. paulinus*, **E)** *H. regani*.....24

ARTIGO I - DIFERENCIAÇÃO CITOGENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Hypostomus nigromaculatus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)

- Figura 1** – Cariótipos de *H. nigromaculatus* corados por Giemsa: **a)** rio Mogi Guaçu e **b)** ribeirão Três Bocas; cromossomos portadores das constrições secundárias e heteromorfismo das RONS: **c)** rio Mogi Guaçu e **d)** ribeirão Três Bocas.....53
- Figura 2** – Metáfases de *H. nigromaculatus* coradas com fluorocromos base-específicos: CMA₃, DAPI e sobreposição de ambos, respectivamente. **a)** **b)** e **c)** rio Mogi Guaçu; **d)** **e)** e **f)** ribeirão Três Bocas. As setas indicam as RONS54
- Figura 3** – Metáfases com Bandamento-C coradas com: Giemsa; CMA₃e DAPI, respectivamente. **a)** **b)** e **c)** rio Mogi Guaçu; e **d)** **e)** e **f)** ribeirão Três Bocas. As setas pretas indicam as RONS; as setas brancas os cromossomos heterocromáticos e as setas vermelhas indicam as bandas negativas.....55

ARTIGO II - CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)

- Figura 1** – Cariótipos corados por Giemsa e RONS: **A)** *H. paulinus*; **B)** *H. strigaticeps*. Os pares portadores das constrições secundárias encontram-se em destaque. No box os cromossomos portadores das RONS67

- Figura 2** – Metáfases de *H. paulinus* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C corada com CMA₃; **F)** banda-C corada com DAPI. As setas brancas à esquerda indicam as regiões GC ricas, à direita os cromossomos heterocromáticos.....68
- Figura 3** – Metáfases de *H. strigaticeps* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C corada com CMA₃; **F)** banda-C corada com DAPI. Em **A)** As setas brancas indicam as RONS, **B)** os blocos ricas em AT, à direita as setas brancas e pretas indicam os cromossomos heterocromáticos69
- Figura 4** – Cariótipos corados por Giemsa e RONS: **A)** *H. regani*; **B)** *H. ancistroides*. Em destaque está o par com heteromorfismo de tamanho. No box os cromossomos portadores das RONS.....70
- Figura 5** – Metáfases de *H. regani* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C com CMA₃; **F)** banda-C com DAPI. As setas brancas à esquerda indicam as RONS, à direita as setas brancas e pretas indicam os cromossomos heterocromáticos71
- Figura 6** – Metáfases de *H. ancistroides* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C com CMA₃; **F)** banda-C com DAPI. As setas brancas à esquerda indicam as regiões ricas em GC, à direita as setas brancas e pretas indicam os cromossomos heterocromáticos72

**ARTIGO III - POLIMORFISMO INTRA E INTERPOPULACIONAL DE
HETEROCROMATINA EM *Hypostomus strigaticeps*
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)**

- Figura 1** – Cariótipo de *H. strigaticeps* corado por Giemsa87
- Figura 2** – Polimorfismo intra e inter-populacional do padrão de distribuição da heterocromatina. **A)** população ribeirão Três Bocas; **B)** população rio Jacutinga.....88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 BIOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO E ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES NEOTROPICAIS.....	12
1.2 ASPECTOS GERAIS DA ORDEM SILURIFORMES E FAMÍLIA LORICARIIDAE	13
1.3 SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA.....	18
3.1.1 A bacia do rio Tibagi.....	18
3.1.2 A bacia do rio Paranapanema.....	199
3.1.3 O rio Mogi Guaçu	20
3.2 ESPÉCIES ESTUDADAS	23
3.3 DETALHAMENTO DAS TÉCNICAS	25
3.3.1 Indução ao aumento do número de mitoses pela técnica de suspensão de levedura (CAVALLINI e BERTOLLO, 1988).....	25
3.3.2 Preparação de cromossomos mitóticos pela técnica de suspensão celular (BERTOLLO et al., 1978).....	25
3.3.3 Cultura de Linfócitos (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1988)	26
3.3.4 Preparo de lâminas e coloração convencional por Giemsa	27
3.3.5 Impregnação por nitrato de prata (HOWELL e BLACK, 1980).....	27
3.3.6 Técnica de coloração com DAPI (SCHWEIZER, 1978)	27
3.3.7 Técnica de coloração com Cromomicina A ₃ (SCHMID, 1980).....	28
3.3.8 Técnica Cromomicina A ₃ / DAPI (CHRISTIAN et al. 1998), com modificações.....	29
3.3.9 Determinação da distribuição da heterocromatina constitutiva (SUMNER, 1972).....	30
3.3.10 Estudos cariotípicos (LEVAN et al., 1964), com modificações.	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ARTIGO I	38

DIFERENCIAÇÃO CITOGENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE <i>Hypostomus nigromaculatus</i> (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)*	39
ARTIGO II	56
CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Hypostomus</i> (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)*	57
ARTIGO III	79
POLIMORFISMO INTRA E INTERPOPULACIONAL DE HETEROCROMATINA EM <i>Hypostomus</i> <i>strigaticeps</i> (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE).....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO E ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES NEOTROPICAIS

Os peixes representam mais da metade do total do número conhecido de espécies de vertebrados, com aproximadamente 28.460 espécies, dentre estes, cerca de 27.400 pertencem ao grupo dos Osteichthyes (LEWINSOHN e PRADO, 2002) e mais de 8.000 espécies deste grupo podem ser encontrados em ambientes de água doce (SCHAEFER, 1998).

A América do Sul possui a mais diversificada fauna de peixes de água doce conhecida. O Brasil é um dos países que possui uma das maiores riquezas em relação à biodiversidade e ao número de espécies de peixes de água doce, segundo Lewinsohn e Prado (2002) são cerca de 3420 espécies, sendo o país que possui a maior rede hidrográfica do mundo (NELSON, 1994).

Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais iniciaram na década de 60 na Europa e no Brasil iniciaram-se no início da década de 70 (ARTONI, 1996). De acordo com Araújo e Morelli (2002) uma das vantagens dos estudos genéticos, citogenéticos e evolutivos, em relação aos peixes, está nas diferentes características biológicas que estes apresentam como possuir uma grande amplitude de variação de cariótipos e grande diversidade no sistema de cromossomos sexuais, também devido ao fato dos peixes constituírem a base da evolução dos vertebrados, como os anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Devido à utilização de novas técnicas, a citogenética contribuiu para estudos taxonômicos, filogenéticos e da estrutura cromossômica de peixes (ANDREATA, 1991).

Em todo o mundo, aproximadamente 2800 espécies de peixes foram analisadas citogeneticamente (KLINKHARDT *et al.*, 1995). Nestes trabalhos observa-se que o número diplóide pode variar de $2n = 12$ em *Gonostoma bathyphylum* (POST, 1974 apud KLINKHARDT *et al.*, 1995) a $2n = 446$ em *Diptychus dipogon* (JIANXUN *et al.*, 1991). Com relação aos estudos citogenéticos em peixes neotropicais, segundo Oliveira *et al.* (2000), mais de 921 espécies de peixes já foram analisadas, as quais estão distribuídas em 252 gêneros e 44 famílias, sendo que os números diplóides variam de $2n = 134$ em *Corydoras aeneus* a $2n = 20$ em *Pterolebias longipinnis*.

1.2 ASPECTOS GERAIS DA ORDEM SILURIFORMES E FAMÍLIA LORICARIIDAE

A ordem Siluriformes é caracterizada por peixes com formas e tamanhos variados, possuem hábitos predominantemente crepusculares e noturnos, os quais geralmente habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e vegetação (PAXTON e ESCHMEYER, 1995). São caracterizados principalmente por possuírem total ausência de escamas sobre o corpo, que pode ser revestido por uma pele espessa popularmente conhecida como couro, ou então, coberto com placas ósseas, total ou parcialmente; e a presença de um acúleo forte e pungente à frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais, sendo que em alguns grupos há a presença de barbilhões (BURGESS, 1989).

A família Loricariidae pertence à ordem Siluriformes, sendo a segunda maior dentre os Teleostei, quando considerado o número de espécies, já foram descritos aproximadamente 70 gêneros e 690 espécies (REIS *et al.*, 2003), sendo todo ano descritas novas espécies. As seis subfamílias reconhecidas por Isbrücker (1980 apud REIS *et al.*, 2003) são: Ancistrinae (217 espécies), Hypoptopomatinae (79 espécies), Hypostominae (169 espécies), Lithogeninae (3 espécies), Loricariinae (209 espécies) e Neoplecostominae (7 espécies); porém, em um estudo posterior analisando-se anatomia externa, osteologia e anatomia do trato digestório, Armbruster (2004) coloca Ancistrinae como uma tribo dentro de Hypostominae (Ancistrini), deixando também as subfamílias Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Loricariinae, e sugerindo uma nova subfamília formada por *Delturus* + *Upsilonodus*.

Os peixes desta família podem ser encontrados em ambientes lóticos e em rios não muito profundos, com fundo arenoso ou sobre rochas. Para sobreviverem em tais ambientes e para suportar fortes correntezas são anatomicamente adaptados, possuindo ventosas bucais, nadadeiras anatomicamente modificadas e corpo de formato achatado, que é típico de animais pertencentes a esses habitats (WEBER in REIS *et al.*, 2003). São resistentes a ferimentos e alguns podem ficar fora da água por um longo período de tempo, devido a grande vascularização das paredes do estômago, as quais auxiliam na respiração além da respiração branquial, isto lhes permite ocupar os mais variados habitats estando distribuídos na maioria da região Neotropical, desde o norte da Costa Rica até o sul da Argentina (FERRARIS Jr in REIS *et al.*, 2003).

Nesta família os peixes são caracterizados por possuírem aparelho de Weber, hábitos bentônicos, o corpo é coberto por várias séries de placas ósseas ao invés de

escamas, apresentam nadadeira adiposa geralmente precedida por um espinho, a boca esta localizada na região ventral, não possui barbilhões e não apresentam acúleo no primeiro raio da nadadeira dorsal, mas sim em forma de raio forte e indiviso, possuem a cabeça, corpo e especialmente pedúnculo caudal achatados (GIULIANO-CAETANO, 1998).

Com relação à organização cariotípica dos Loricariidae, pouco se sabe a respeito das subfamílias Neoplecostominae e Lithogeninae, os estudos realizados estão relacionados às subfamílias Hypostominae (MURAMOTO *et al.* 1968; MICHELLE *et al.* 1977; DELLA-ROSA *et al.* 1980; ARTONI e BERTOLLO, 1992; 1996, 1999, 2001; ARTONI *et al.* 1998, 1999; FENERICH, 1998; TROY *et al.*, 1999; RONCATI *et al.*, 1999; KAVALCO *et al.*, 2005), a tribo Ancistrini (ARTONI, 1996; LARA, 1998; TCHAICKA e MARGARIDO, 1999), Loricariinae (POST, 1965; MICHELLE *et al.* 1977; DELLA-ROSA *et al.* 1980; SCAVONE e JÚLIO Jr, 1994, 1995; GIULIANO-CAETANO, 1998; RONCATI *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2003; CENTOFANTE *et al.*, 2006), Hypoptopomatinae (ANDREATA, 1991; ANDREATA *et al.*, 1992, 1993, 1994, 1999, 2000; CARVALHO *et al.*, 1998; FENERICH, 1998; TAKAKO *et al.*, 2000, CAMILO e MOREIRA-FILHO, 2005).

Estudos citogenéticos relacionados à estrutura cariotípica da família mostraram que esta apresenta uma grande variação quanto ao número diplóide, o qual varia de 36 cromossomos para *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998) a 96 cromossomos em *Upsilonodus* sp. (KAVALCO, 2003), além de populações de várias espécies como *Microlepidogaster leucofrenatus* (ANDREATA *et al.*, 1994) e *Rineloricaria latirostris*

(GIULIANO-CAETANO, 1998) apresentarem também variação estrutural, e em algumas espécies como *Loricaria prolixa* (SCAVONE e JÚLIO-Jr, 1994) e *Neoplecostomus* (ALVES *et al.*, 1999) à presença de cromossomos supranumerários.

Com relação à presença de sistema de cromossomos sexuais, poucas espécies de loricarídeos apresentam cromossomos sexuais citologicamente diferenciados, descritos até hoje, somente nas espécies das subfamílias Hypostominae, Hypoptopomatinae e Loricariinae. Em Hypoptopomatinae foram observados sistemas XX/XY em *Pseudotocinclus tietensis* (ANDREATA *et al.* 1992) e ZZ/ZW em *Microlepidogaster leucofrenatus* (ANDREATA *et al.* 1993); em Loricariinae os sistemas de cromossomos sexuais verificados em *Loricariichthys platymetopon* são do tipo ZZ/ZW (SCAVONE e JULIO JR, 1995) e XX/XY₁Y₂ em *Harttia carvalhoi* (CENTOFANTE *et al.*, 2006); em Hypostominae com *Hypostomus* sp. do rio Araguaia apresentando sistema ZZ/ZW (ARTONI *et al.* 1998) e *Hypostomus macrops* com XX/XY (MICHELE *et al.*, 1977), com sistema ZZ/ZW em *Ancistrus* cf. *dubius* (MARIOTTO *et al.*, 2004) e *Hemiancistrus spilomma* (OLIVEIRA *et al.*,

2006) e sistema XX/X0 em *Ancistrus* n. sp. 1 (ALVES *et al.*, 2006).

Apesar de o grupo constituir uma das maiores famílias de peixes de água doce, possuir uma grande importância econômica e estar amplamente distribuído por toda a região Neotropical, com relação ao número de espécies os estudos citogenéticos ainda são relativamente escassos, das 600 espécies descritas até o ano 2000, apenas 56 possuem dados citogenéticos disponíveis (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000).

1.3 SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE

A subfamília Hypostominae é constituída na maioria por espécies de médio porte, os maiores são *Glyptoperichthys*, *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Pterygoplichthys* e *Squaliforma*. O maior pode chegar a até 50 cm de tamanho, como é o caso da *Isorineloricaria spinosissima*. São raros os casos de dimorfismo sexual, somente em um gênero, como *Aphanotorulus*, machos sexualmente maduros apresentam nadadeiras e corpo mais espinhoso e algumas modificações dos dentes (WEBER in REIS *et al.*, 2003).

Podem ser encontrados nos mais variados habitats e apresentam ampla distribuição. Com exceção de *Hypostomus watwata*, a qual vive em águas estuárias dos rios das Guianas, Hypostominae geralmente parece estar restrito a água doce, são espécies bentônicas que podem ser encontradas em bancos de areia ou rios rochosos. A maioria destes animais possui hábitos crepusculares, e durante o dia ficam embaixo das pedras ou em troncos de árvores mortas. (WEBER in REIS *et al.*, 2003).

De acordo com Isbrücker (1980) a subfamília Hypostominae é caracterizada por possuir numerosas espécies, sendo o gênero *Hypostomus* o mais especioso, com mais de 130 espécies já descritas.

Devido ao limitado conhecimento da distribuição da ictiofauna da região Neotropical, do grande número de espécies e da grande variação intra - específica com relação à morfologia e ao padrão de pigmentação observado no grupo, ocorre uma grande dificuldade na identificação destes peixes ou muitas vezes resultando em uma identificação errada de muitas espécies (REIS *et al.*, 1990 apud ZAWADZKI *et al.*, 1999).

Com relação aos estudos citogenéticos, apenas nove gêneros possuem algum tipo de dado: *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pogonopoma*, *Pterygoplichthys*, *Megalancistrus*, *Panaque*, *Ancistrus* e *Hemiancistrus*, sendo *Hypostomus* o gênero que possui

maior número de espécies cariotipadas (GIULIANO-CAETANO, 1998).

Os dados citogenéticos até o presente momento relacionado à subfamília mostram que o número diplóide varia de 38 para *Ancistrus* sp. (ALVES, 2000) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido (CEREALI, 2006), sendo que o número diplóide mais comum é de 72 cromossomos (CEREALI, op cit).

Outra característica é que as espécies que possuem menor número cromossômico possuem em sua maioria cromossomos metacêntricos-submetacêntricos (m-sm), enquanto as espécies que apresentam maior número cromossômico prevalecem os subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a) (GIULIANO-CAETANO, 1998). Além disso, este gênero apresenta variação quanto ao número fundamental, como por exemplo, $2n = 68$ cromossomos para *Hypostomus ancistroides* com $NF = 105$ para machos e $NF = 106$ para fêmeas; *Hypostomus paulinus* com número diplóide de 74 cromossomos e $NF = 104$ e assim por diante (MICHELLE *et al.*, 1977).

Esta diversidade cromossômica pode estar relacionada com a presença algumas vezes de cromossomos supranumerários ou rearranjos cromossômicos presentes na evolução cariotípica do grupo (SCAVONE e JÚLIO Jr, 1994; ALVES *et al.*, 1999); ou a uma possível origem polifilética dos Hypostominae, proposto por Schaefer (1987) por meio de estudos de filogenia e morfologia.

Há uma diferença na quantidade, tamanho e localização do padrão e distribuição da heterocromatina e das RONS, possuindo RONS simples a RONS múltiplas, sendo estas últimas as mais freqüentes e alguns cromossomos AgRONS homólogos podendo apresentar polimorfismo de tamanho (ARTONI e BERTOLLO, 1992).

A presença de sistema de cromossomos sexuais foi observada em *Hypostomus macropis* (MICHELE *et al.*, 1977), com sistema XX/XY e heteromorfismo de cromossomos sexuais em fêmeas (ZZ/ZW) em *Hypostomus* sp. (ARTONI, 1996).

Os estudos citogenéticos com relação às espécies do gênero *Hypostomus* neste presente trabalho, têm como finalidade contribuir a estudos futuros relacionados a conservação destas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente as diferentes espécies do gênero *Hypostomus* provenientes do rio Jacutinga, Água das Pedras, Taquari, ribeirão Três Bocas e Apertados (bacia do rio Tibagi/PR), rio Água do Pato (bacia do rio Paranapanema/SP) e rio Mogi Guaçu – Cachoeira de Emas (bacia do rio Grande/SP).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar a macroestrutura cromossômica de algumas espécies do gênero *Hypostomus*.
- 2- Caracterizar as Regiões Organizadoras de Nucléolos.
- 3- Determinar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva.
- 4- Determinar as regiões ricas em GC e AT através de fluorocromos específicos, na busca de marcadores específicos da organização interna dos cromossomos.
- 5- Comparar os resultados obtidos, com os existentes na literatura, com a intenção de compreender a tendência da evolução cromossômica do gênero *Hypostomus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em diferentes locais pertencentes à bacia do rio Tibagi/PR: ribeirão Três Bocas, rio Água das Pedras e ribeirão dos Apertados, localizados na cidade de Londrina, rio Jacutinga, rio Taquari, próximos ao município de Jataizinho; no rio Água do Pato afluente do rio Paranapanema/SP, localizado no município de Iepê e cachoeira de Emas – rio Mogi Guaçu/SP, no município de Pirassununga (Figuras 1 e 2).

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

3.1.1 A bacia do rio Tibagi

A bacia do rio Tibagi é composta por um total de 65 afluentes e centenas de subafluentes compreendendo uma área de aproximadamente 25 000 Km², está localizada na porção leste do estado do Paraná, nascendo ao sul do estado e percorrendo 550 Km em direção norte até o rio Paranapanema, no lago da represa Capivara, apresentando uma diferença de nível desde a nascente até a desembocadura de 792 m (MAACK, 2002), também é caracterizada por apresentar vários saltos e cachoeiras, somadas aos saltos são 91 cachoeiras e corredeiras (DE FRANÇA in MEDRI *et al.*, 2002). Em média, a velocidade máxima das águas em todas as corredeiras é de 3,2 m/s (BENNEMANN *et al.*, 1995).

A bacia é limitada pela bacia do rio Paranapanema ao norte; pela bacia do rio Ivaí a oeste; com as bacias dos rios Cinzas e Itararé ao leste; com a bacia do rio Ribeira a sudeste; com a bacia do rio Pirapó a noroeste; e com a do rio Iguaçu ao sul (DE FRANÇA in MEDRI *et al.*, 2002).

Em um estudo feito por Bennemann *et al.* (1995) em cinco localidades da bacia do Tibagi: Ipiranga (alto Tibagi), Telêmaco Borba e Sapopema (médio Tibagi), Londrina e Sertanópolis (baixo Tibagi), cerca de 94,3% das espécies coletadas pertencem às ordens Characiformes e Siluriformes, e os Perciformes fazendo parte do restante (5,7%). Dentre os Characiformes, a família mais encontrada foi Characidae (34,7%), das sete famílias registradas. Para os Siluriformes foram registradas espécies das famílias Loricariidae (13,1%)

e Pimelodidae (8,6%).

As espécies de grande porte ocorrem em número reduzido, sendo que a bacia do rio Tibagi é predominantemente formada por espécies de pequeno porte; seguidas pelas de tamanho médio (SHIBATTA *et al.* in MEDRI *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Bennemann e Shibatta (in MEDRI *et al.*, 2002) relatam a presença de 17 espécies, dentre estas, as espécies mais abundantes em ordem decrescente foram: *Moenkhausia intermedia*, *Astyanax altiparanae*, *Schizodon intermedius*, *Pimelodus maculatus*, *Plagioscion squamosissimus*, *Acestrorhynchus lacustris* e *Steindachnerina insculpta*. As espécies encontradas em menor abundância foram: *Serrasalmus spilopleura*, *Iheringichthys labrosus*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Hoplias malabaricus*, *Schizodon nasutus*, *Pinirampus pirinampu*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Metynnis maculatus* e *Prochilodus lineatus*.

3.1.2 A bacia do rio Paranapanema

O rio Paranapanema pertence à bacia do Alto Paraná, sendo um de seus maiores afluentes, com aproximadamente 600 Km de extensão, onde cerca de 300 Km fazem a divisa do estado do Paraná com o estado de São Paulo. Sua nascente se localiza em Capão Bonito, na Serra de Paranapiacaba (MAACK, 1981).

Devido ao seu desnível de aproximadamente 500 m, o rio Paranapanema é muito utilizado para geração de energia, possuindo cerca de dez usinas em operação, e devido à presença destas usinas ao longo de sua extensão, o rio tornou-se uma sucessão de reservatórios justapostos, que são classificados de duas maneiras: reservatórios de acumulação e reservatórios fio d'água (DUKE ENERGY, 2003).

No rio Paranapanema foram identificadas até o momento cerca de 155 espécies, distribuídas em nove ordens (DUKE ENERGY, op cit).

3.1.3 O rio Mogi Guaçu

O rio Mogi Guaçu possui cerca de 473 km de extensão, sua nascente localiza-se no município de Cambuí, estado de Minas Gerais a 1650 m de altitude, onde percorre cerca de 95,5 Km até o estado de São Paulo. Da nascente até a foz apresenta um desnível de 1160 m, sendo responsável pelas águas com fortes correntezas na maioria de sua extensão (GODOY, 1975).

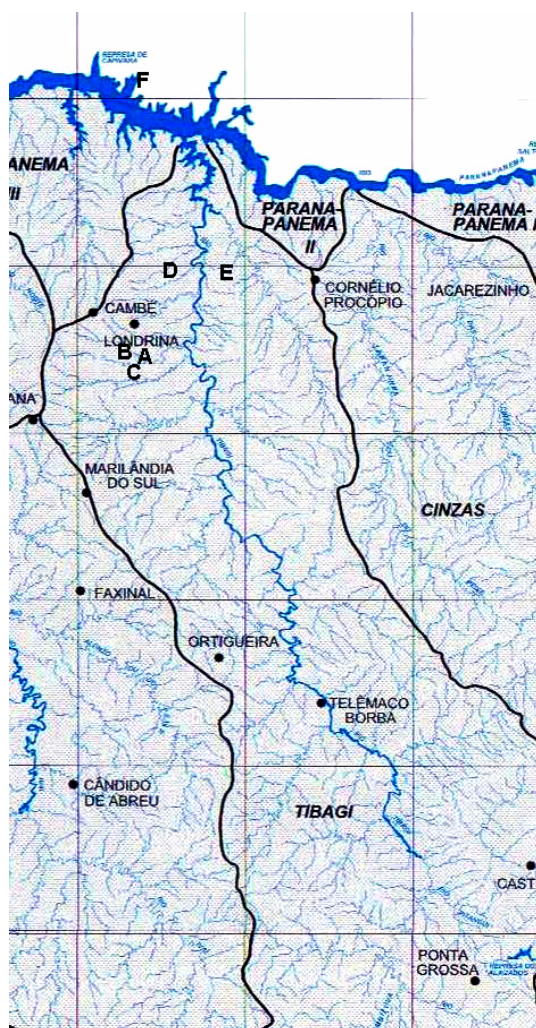


Figura 1 – Mapa dos locais de coleta: **A**) ribeirão Três Bocas, **B**) rio Água das Pedras e **C**) ribeirão dos Apertados (Londrina/PR); **D**) rio Jacutinga e **E**) rio Taquari (Jataizinho/PR) na bacia do rio Tibagi; **F**) rio Água do Pato (Iepê/SP) bacia do Paranapanema; **G**) rio Mogi Guaçu/SP na bacia do rio Grande.



Figura 2 – Fotos dos locais de coleta: **A)** ribeirão Três Bocas, **B)** rio Água das Pedras e **C)** ribeirão dos Apertados (Londrina/PR); **D)** rio Jacutinga e **E)** rio Taquari (Jataizinho/PR); **F)** rio Água do Pato (Iepê/SP); **G)** cachoeira de Emas - rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP).

3.2 ESPÉCIES ESTUDADAS

Este estudo foi fundamentado em exemplares pertencentes ao gênero *Hypostomus*, obtidos por meio de coletas realizadas pela equipe de citogenética de peixes da Universidade Estadual de Londrina.

Foram analisados 62 exemplares de *H. strigaticeps*, coletados no rio Jacutinga, rio Taquari, rio Água do Pato, rio Água das Pedras, ribeirão Três Bocas; 56 exemplares de *H. ancistroides* no rio Taquari, rio Água do Pato, rio Água das Pedras e ribeirão Três Bocas; 14 exemplares de *H. nigromaculatus* no ribeirão Três Bocas, ribeirão dos Apertados e rio Mogi Guaçu; dois exemplares de *H. paulinus* no ribeirão Três Bocas e um exemplar de *H. regani* no rio Jacutinga (Figura 3).

Os exemplares de *H. nigromaculatus* foram identificados pelo sistemata Cláudio H. Zawadzki do Núcleo de Pesquisa em Limnologia Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá e os demais pelo sistemata Fernando Camargo Jerep do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.

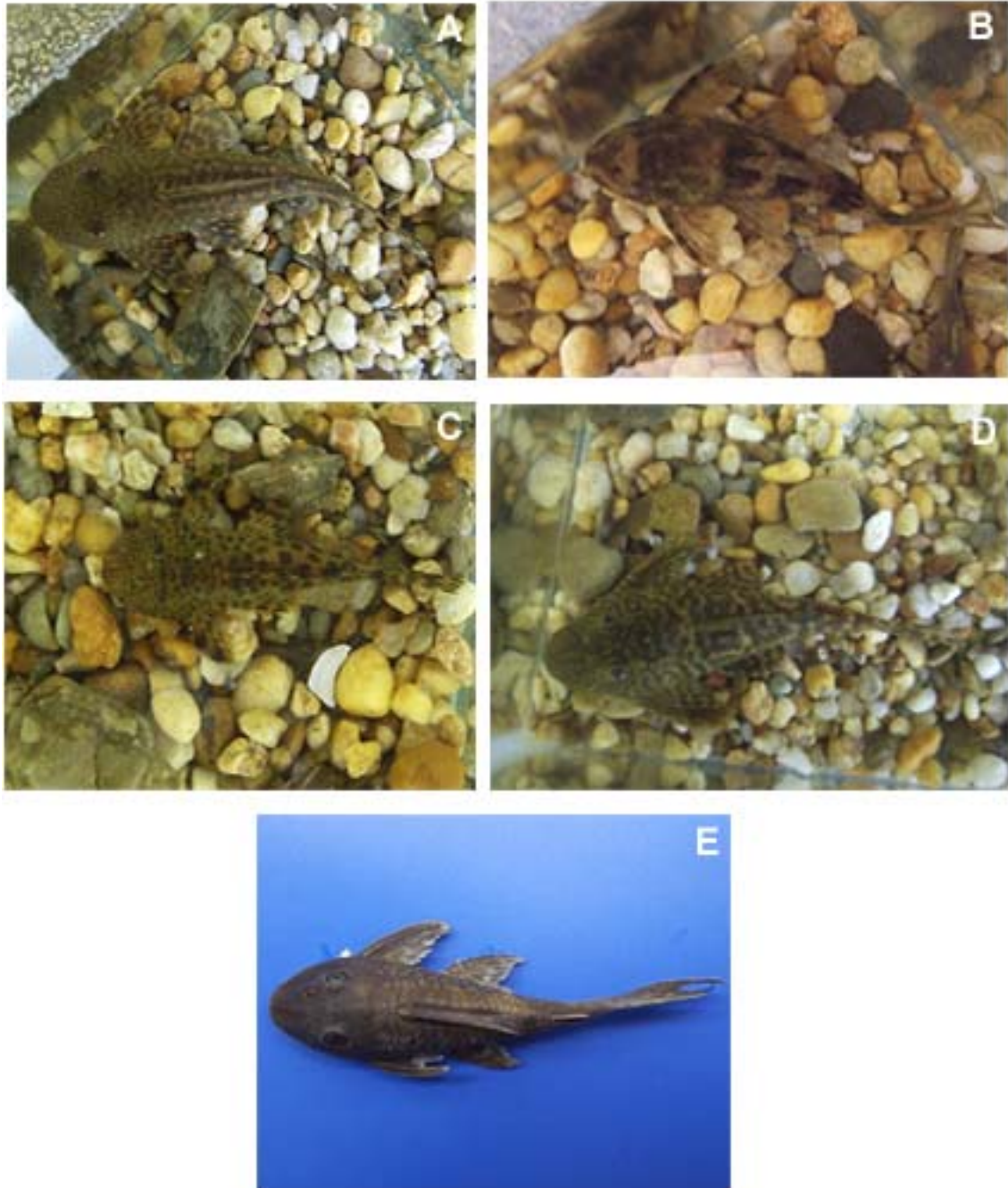


Figura 3 – Espécies analisadas: **A)** *H. strigaticeps*, **B)** *H. ancistroides*, **C)** *H. nigromaculatus*, **D)** *H. paulinus*, **E)** *H. regani*.

3.3 DETALHAMENTO DAS TÉCNICAS

3.3.1 Indução ao aumento do número de mitoses pela técnica de suspensão de levedura (CAVALLINI e BERTOLLO, 1988).

Injetar intraperitonealmente suspensão de levedura dissolvida em água, na proporção de 1 mL/ 100g de peso animal durante 24 horas, após o qual processa-se o material para a preparação de cromossomos mitóticos.

3.3.2 Preparação de cromossomos mitóticos pela técnica de suspensão celular (BERTOLLO *et al.*, 1978).

1. Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção de 1 mL/100g de peso animal durante 30-40 minutos após o qual sacrifica-se o animal e retira-se 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 0,075M.
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 durante 25-30 minutos.
5. Pingar 5-10 gotas de fixador metanol- ácido acético (3:1), ressuspender o material, e centrifugá-lo durante 10 minutos a 900 rpm.
6. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirar o sobrenadante e acrescentar 7-10 mL de fixador. Ressuspender o material e centrifugá-lo durante 10 minutos.
7. Repetir o passo número 6 mais duas vezes.

8. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1-2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material, e ressuspender o material.
9. Acondicionar o material em tubos de plástico do tipo Eppendorf e guardá-los no refrigerador.

3.3.3 Cultura de Linfócitos (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1988)

Coletar sangue periférico com uma seringa descartável contendo 0,1 mL de heparina. Após a sedimentação transferir 0,5 mL do plasma para um frasco contendo 7,5 mL de meio de cultura RPMI 1640, 2 mL de soro bovino fetal e 0,2 mL de fitohemaglutinina. Manter o frasco em estufa a 30°C por 72 horas.

1. Adicionar a cultura 0,1 mL de colchicina 0,0017%, agitar o frasco e deixar incubando por 3 horas.
2. Transferir o meio de cultura para um tubo de centrífuga, com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar a 900 rpm por 5 minutos.
3. Descartar o sobrenadante e adicionar aproximadamente 8 mL de solução hipotônica de KCl a 0,075 M, ressuspender e incubar 20-30 minutos a 37°C.
4. Adicionar 5 gotas de fixador (metano/ácido acético, 3:1) recém preparado, ressuspender vagarosamente e centrifugar por 10 minutos à 900 rpm.
5. Descartar o sobrenadante e adicionar aproximadamente 8 mL de fixador.
6. Ressuspender e centrifugar novamente por 8 minutos.
7. Repetir os itens 5 e 6 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 o material. Este poderá ser então guardado em freezer,

acondicionado em frascos tipo Eppendorf, ou trabalhado.

3.3.4 Preparo de lâminas e coloração convencional por Giemsa

1. Pingar 1-3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, levemente aquecida em um recipiente contendo água, deixando-a secar ao ar.
2. Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato, pH = 6,8, por 7 minutos, ou tratar a lâmina segundo as técnicas de bandas-C, impregnação por prata, fluorocromos ou hibridação fluorescente in situ.

3.3.5 Impregnação por nitrato de prata (HOWELL e BLACK, 1980)

1. Colocar sobre uma lâmina previamente preparada 2-3 gotas de solução aquosa de gelatina (1g de gelatina incolor + 50 mL de água + 0,5 mL de ácido fórmico).
2. Adicionar sobre cada gota de gelatina 1 gota de água destilada e 2 gotas de AgNO₃ 50%.
3. Cobrir com lamínula e colocar em estufa a 60°C durante 3-6 minutos.
4. Deixar a lamínula escorrer debaixo de água corrente.
5. Secar a lâmina e observar ao microscópio.

3.3.6 Técnica de coloração com DAPI (SCHWEIZER, 1978)

1. Mergulhar a lâmina em solução de DAPI (0,3 µg/mL), recém preparada, por 15 minutos, preferencialmente no escuro.

2. Lavar em água corrente e secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de glicerol.
3. Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 360-390 nm.

3.3.7 Técnica de coloração com Cromomicina A₃ (SCHMID, 1980)

1. Sobre uma lâmina, preparada segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, colocar cerca de 100 µL de solução de Distamicina (0,3 mg/ml).
2. Cobrir com uma lamínula e deixar agindo por uns 15 min. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em água corrente e deixar a lâmina em tampão McIlvaine por alguns minutos. Deixar secar ao ar.
3. Colocar 100 µL da solução de Cromomicina A₃ (dissolver 0,5mg de CMA₃ em 1mL de tampão McIlvaine e adicionar 5 mM de cloreto de magnésio – deixar a CMA₃ dissolver lentamente na geladeira por alguns dias), sobre a lâmina, cobri-la novamente com uma lamínula e deixar corando por 60 min, no escuro.
4. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente um minuto.
5. Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução para montagem.
6. Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação azul).

3.3.8 Técnica Cromomicina A₃ / DAPI (CHRISTIAN *et al.* 1998), com modificações

1. Desnaturar as lâminas em solução de formamida 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 µl 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 µl, cobrir com lamínula de vidro e visualizar em microscópio de fluorescência.
8. Armazenar as lâminas no escuro em geladeira.

3.3.9 Determinação da distribuição da heterocromatina constitutiva (SUMNER, 1972)

1. Tratar a lâmina com HCl 0,2N por 15 minutos à temperatura ambiente.
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar.
3. Colocar a lâmina em solução aquosa de Ba(OH)₂ 5% a 42°C durante um minuto e meio.
4. Mergulhar a lâmina três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar.
5. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C por 30 minutos.
6. Lavar a lâmina em água corrente, deixar secar e corar com Giemsa 6% durante 5 minutos.

3.3.10 Estudos cariotípicos (LEVAN *et al.*, 1964), com modificações

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com o auxílio da lente objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram fotografadas em filme Kodak Imagelink (ou similar), preto e branco, ASA 25. As lâminas de fluorocromos e hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro apropriado (450-490 nm de comprimento), e foram fotografadas com filmes TMAX, preto e branco ASA 100, e colorido, respectivamente.

As fotografias dos cromossomos foram recortadas e, em seguida, os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan *et al.* (1964), com modificações, onde foram adotados os seguintes limites para a relação de braços (RB):

RB = 1,00 – 1,70, metacêntrico (m);

RB = 1,71 – 3,00, submetacêntrico (sm);

RB = 3,01 – 7,00, subtlocêntrico (st);

RB = maior que 7,00, acrocêntrico (a).

Onde RB = braço maior/ braço menor. Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.L. *Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial*. 2000. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Ocorrência de microcromossomos B em *Neoplecostomus paranensis* (Siluriformes, Loricariidae). *Genet. Mol. Biol.*, 22, p. 100. 1999.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamily Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, 56, p. 57-63. 2003.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, 128, p. 1–9. 2006.
- ANDREATA, A.A. *Estudos citogenéticos na subfamília Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae)*. 1991. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANDREATA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, 57, p.369-372. 1992.
- ANDREATA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 63, p.215-220. 1993.
- ANDREATA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. Cytogenetics studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia*, 47, p.27-37. 1994.
- ANDREATA, A.A.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Evidências da ocorrência de um sistema cromossômico de determinação sexual em *Microlepidogaster* sp. (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Genet.Mol.Biol.*, 22, p. 67. 1999.

ANDREATA, A.A.; ALVES, A.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. *Hisonotus gibbosus* (Teleostei, Loricariidae) segundo Hypoptopomatineo com número diplóide diferente de 54 cromossomos. *Genet.Mol.Biol.*, 23, p. 57. 2000.

ARMBRUSTER, J.W. *Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Ancistrinae, Hypostominae and Neoplecostominae*. 1997. Ph.D. Thesis, Urbana, Illinois, USA.

ARTONI, R.F. *Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero Hypostomus Lacépède (1803) (Pisces, Loricariidae, Hypostominae)*. 1996. 162p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Regiões Organizadoras de Nucléolos e Heterocromatina constitutiva em Peixes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 4, 1992, Rio de Janeiro. *Resumos...* Rio de Janeiro: Departamento de Ciências Biológicas, 1992. p. 36.

ARTONI, R. F. ; L. A. C. BERTOLLO. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*, vol. 49 , n. 1,; p.81-90. 1996.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica*, 106, p.209-214. 1999.

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

ARTONI, R.F.; VENERE, P.C.; BERTOLLO, L.A.C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia*, 63, p.421 -425. 1998.

ARTONI, R.F.; MOLINA, W.F.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr, P.M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.*, 22, p.1-6. 1999.

BENNEMANN, S.T.; SHIBATTA, O.A. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (editores). *A bacia do rio Tibagi*. Londrina-PR, 2002.

BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R.A. Composicion ictiofaunistica en cinco localidades de la cuenca del rio Tibagi PR – Brasil. *Interciência*, vol. 20, n. 1, p. 7-13. 1995.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). *Braz. J. Genet.*, I: p.103-120. 1978.

BURGESS, W.E. *An Atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of Siluriformes*. New Jersey: T.F.H. Publications, 1989. 784p.

CAMILO, F.M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic Description of *Corumbataia cuestae* (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Cytologia*, 70, p.47-51. 2005.

CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Nuclear DNA content of thirty species of Neotropical fishes. *Genet. Mol. Biol.*, 21, p.47-54. 1998.

CAVALLINI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C. Indução de mitoses em *Hoplias* cf. *malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 2, 1988, Maringá. *Resumos...* Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1988. p. 32.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY1Y2 sex chromosomes system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 112, p. 320-324. 2006.

CEREALI, S. S. *Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul*. 2006. 99p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CHRISTIAN, A.; E. MCNIEL, J. ROINSON; R. DRABEK, S. LARUE; C. WALDREN ; J. BEDFORD. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetic and Cell Genetic*, 82, p.172-179. 1998.

DE FRANÇA, V. O rio Tibagi no contexto hidrogeográfico paranaense. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (editores). *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: EDUEL. 2002. Cap. 3, p. 45-62.

DELLA-ROSA, V.A.; BERTOLLO, L.A.C; FERRARI, I.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. Estudos citogenéticos em peixes da Amazônia. II. Ordem Siluriformes. *Ciênc. Cult.*, 32, p. 735. 1980.

DUKE ENERGY INTERNATIONAL. *Peixes do rio Paranapanema*. Copyright da edição: Duke Energy International Geração Paranapanema. São Paulo: Ed. Horizonte Geográfico. 2003. 112 p.

FENERICH, P.C. *Estudo de conteúdo de DNA nuclear em células de peixes da ordem Siluriformes (Pisces, Ostaryophysi), da região de Botucatu, SP*. 1998. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Rev. Bras. Genet.*, 11, 847-852. 1988.

GIULIANO-CAETANO, L. *Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de Rineloricaria latirostris (Pisces, Loricariidae)*. 1998. 78 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GODOY, M. P. *Peixes do Brasil. Sub-ordem Characoidei: Bacia do Rio Mogi Guassu*. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. cap.4, p.624 -847.

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

ISBRÜCKER, I.J.H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Versl. Tech. Gegevens*, 22, p.1-181. 1980.

JIANXUN, C.; XIUHAI, R.; QIXING, Y. Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia*, 56, p. 425-429. 1991.

KAVALCO, K. F. *Contribuição citogenética à análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Paraitinga*. 2003. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

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

KLINKHARDT, M.; TESCHE, M.; GREVEN, H. *Database of fish chromosomes*. Magdeburg: Westarp-Wiss, 1995. 237p.

LARA, M.C.S. *Aspectos citogenéticos de três espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraná*. 1998. 51 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) -Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

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

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. *Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento*. São Paulo: Editora Contexto, 2002.

MAACK, R. *Geografia física do Estado do Paraná*. 2 ed. Curitiba: Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, 1981. 442p.

MAACK, R. *Geografia física do Estado do Paraná*. 3 ed. Curitiba: Imprensa Oficial. 2002. p. 329-361.

MARIOTTO, S.; ARTONI, R.F.; MIYAZAWA, C. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay river basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*, vol. 57, n. 4, p. 327-331. 2004.

MICHELLE, J. L.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42, p. 539-546. 1977.

MURAMOTO, J.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma*, 24, p.59-66. 1968.

NELSON, J.S. *Fishes of the world*. 3 ed. New York: John Wilry Sons. 1994. 600p.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L.F.A.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes Neotropicais de águas continentais. In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 8, 2000, Manaus. *Resumos...*Manaus, 2000. p. 24.

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

OLIVEIRA R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso ; Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*, vol. 4, n.1, p.93-97, 2006.

PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W.N. *Encyclopedia of fishes*. San Diego: Academic Press, 1995.

POST, A. Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Süßwasser Teleosteen. *Z. Zool. Evol. Frosch.*, 3, p.47-93. 1965.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003. 742p.

RONCATI, H.A.; CORIO, C.; MALONE, G.; FENOCHIO, A.S.; PASTORI, M.C. Relevamiento citogenético em pees del río Paraná (Argentina). VII Subfamilias Loricariinae e Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Genet. Mol. Biol.*, 22, p. 82. 1999.

SCAVONE, M. D. P.; JÚLIO Jr., H. F. Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females (Loricariidae – Siluriformes) from the Paraná river basin. *Revista de Ictiologia*, 2/3 (1/2), p.41-47. 1994.

SCAVONE, M.D.P.; JÚLIO Jr, H.F. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). *Brazil. J. Genet.*, 1, p.31-35. 1995.

SCHAEFER, S. A. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the Loricariid subfamilies (Pisces, Siluroidei). Los Angeles County: Cont. Sci. Nat. Hist. Mus. 394, p.1-31. 1987.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S. (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 1998. p. 375-400.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC- and AT- rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77, p.83-103. 1980.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58, p.307-324. 1976.

SHIBATTA, O. A. *et al.* Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (editores). *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: EDUEL. 2002. Cap 22, p.403-424.

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

TAKAKO, A.K.; ANDREATA, A.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Estudos citogenéticos preliminares em *Pseudotocinclus tietensis* do alto rio Juquiá, Vale do Ribeira (SP). *Genet. Mol. Biol.*, 23, p.67. 2000.

TCHAICKA, L; MARGARIDO, V.P. Descrição do cariótipo de *Ancistrus* sp. (Pisces, Loricariidae, Ancistrinae) coletado no rio Alto Alegre, bacia do rio Iguaçu. *Genet. Mol. Biol.* 22, p. 22. 1999.

TROY, W.P.; BRITO-RIBON, R.M.; MIYAZAWA, C.S. Caracterização cariotípica em 4 espécies de Siluroidei *Liposarcus anisitsi* (Loricariidae), *Epapterus* cf. *chaquensis* (Auchenipteridae), *Anadoras* cf. *weddellii* e *Doras* cf. *eigenmanni* (Doradidae), da bacia do Pantanal, MT. *Genet. Mol. Biol.*, 22, p. 72. 1999.

VAZZOLER, A.E.A. de M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem/SBI/CNPq/Nupelia. 1996.

WEBER, C. Subfamily Hypostominae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003. p.351-395.

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; BINI, L. M. Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). *Revue suisse de Zoology*, 106, p. 91-105. 1999.

ARTIGO I

DIFERENCIAÇÃO CITOGENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Hypostomus nigromaculatus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)*

*Este artigo será submetido à publicação na revista Neotropical Ichthyology.

DIFERENCIAÇÃO CITOGENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Hypostomus nigromaculatus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)

Marceléia Rubert*, Cláudio H. Zawadzki** e Lucia Giuliano-Caetano*

*Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB. CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil, fone: (43) 3371-4527 (e-mail: giuliano@uel.br).

**Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá/Nupélia, Av. Colombo 5790, G90, Maringá, PR, Brasil.

O gênero *Hypostomus* é um dos mais especiosos na família Loricariidae, tendo aproximadamente 120 espécies descritas. Apresentam uma ampla diversidade quanto ao padrão de coloração e morfologia, o que dificulta a identificação de determinadas espécies, principalmente aquelas com ampla distribuição geográfica. Para isso os dados citogenéticos podem fornecer subsídios aos estudos taxonômicos e sistemáticos do gênero. Foram analisadas três populações de *Hypostomus nigromaculatus*: ribeirão Três Bocas, ribeirão dos Apertados (afluentes do rio Tibagi/PR) e cachoeira de Emas-rio Mogi Guaçu/SP, sendo esta última, a localidade tipo de *H. nigromaculatus*. Submetidos à coloração convencional (Giemsa), impregnação por nitrato de prata, bandamento-C e fluorocromo CMA₃. Na análise por Giemsa foi verificado para as três populações $2n = 76$, no entanto com diferença quanto às fórmulas cariotípicas. O nitrato de prata detectou RONS múltiplas para as três populações, porém com diferenças quanto à localização. A coloração com fluorocromo CMA₃ foi correspondente aos cromossomos AgRONS, na coloração com DAPI foram observadas bandas negativas correspondentes as RONS. A heterocromatina está distribuída terminalmente em alguns cromossomos (st-a), pericentromérica em um par (m) e associada às RONS, para a população do ribeirão Três Bocas e ribeirão dos Apertados; e terminal em 2 pares de cromossomos (st-a) anterior à constrição secundária e pericentromérica em 2 cromossomos (m), para a população do rio Mogi Guaçu. Por meio destes resultados foi possível observar algumas diferenças no que diz respeito às fórmulas cariotípicas e bandamentos cromossômicos, mas todos os exemplares apresentaram semelhanças quanto à morfologia e padrão de pigmentação; estas diferenças podem estar relacionadas ao processo de especiação dos grupos.

Palavras chave: bandamento cromossômico, especiação, Hypostominae.

Introdução

O gênero *Hypostomus* é um dos mais especiosos dentro da subfamília Hypostominae, com aproximadamente 120 espécies nominais, sendo encontradas nos mais variados habitats e apresentando ampla distribuição (Weber in Reis *et al.*, 2003).

Para a identificação das espécies do grupo, os sistematas encontram muita dificuldade, devido ao grande número de espécies pertencentes ao gênero, e por possuírem uma grande variação intra - específica com relação à morfologia e ao padrão de pigmentação (Reis *et al.*, 1990 apud Zawadzki *et al.*, 1999). Devido a esta grande variação, estudos moleculares com aloenzimas e DNAm_t estão sendo realizados, para auxiliarem na identificação e nas relações filogenéticas de espécies do gênero (Alves, 2000; Zawadzki *et al.*, 2001; Zawadzki, *et al.* 2005).

Com relação ao número diplóide, macroestrutura cariotípica e bandamento cromossômico, estes peixes têm sido caracterizados como não conservados (Artoni & Bertollo, 1996). Os rearranjos cromossômicos desempenham um papel significativo na evolução cariotípica do grupo e este polimorfismo estrutural pode estar relacionado também à presença, algumas vezes, de cromossomos supranumerários (Scavone & Júlio Jr, 1994).

De acordo com estudos de filogenia morfológica, Schaefer (1987) propôs que esta diversidade cromossômica pode estar relacionada com uma possível origem polifilética dos Hypostominae.

Os dados citogenéticos, até o presente momento, relacionados ao gênero *Hypostomus* mostram que o número diplóide varia de 52 para *H. emarginatus* (Artoni & Bertollo, 2001) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (Cereali, 2006), sendo que o número diplóide mais comum nas espécies estudadas, é de 72 cromossomos (Cereali, op. cit.).

As espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus* que possuem dados citogenéticos são:

H. plecostomus (Muramoto *et al.*, 1968); *H. strigaticeps*, *H. macrops*, *H. ancistroides*, *H. paulinus* (Michelle *et al.*, 1977); *H. tietensis* (Oliveira & Foresti, 1993); *H. albopunctatus*, *H. regani*, *H. aff. auroguttatus*, (Artoni & Bertollo, 1996); *H. emarginatus* (Artoni & Bertollo, 2001); *H. affinis* (Kavalco *et al.*, 2005) e *H. cochliodon* (Cereali, 2006), além dos estudos realizados com as mesmas espécies em outras populações e espécies que não possuem ainda nomenclatura sendo identificados como *Hypostomus* sp. Estes estudos estão na maioria resumidos a número diplóide, fórmula cariotípica e RONS.

No presente trabalho foram analisados citogeneticamente exemplares de *Hypostomus nigromaculatus* (Schubart, 1964) de Cachoeira de Emas, a localidade tipo da espécie e de duas diferentes localidades, para caracterização da espécie de possíveis variações geográficas ao longo de sua distribuição. Estes são os primeiros dados citogenéticos para *H. nigromaculatus*.

Material e Métodos

Foram analisados 15 exemplares de *Hypostomus nigromaculatus* coletados em três localidades diferentes: Cachoeira de Emas – rio Mogi Guaçu/SP (NUP 5071, sete exemplares), no município de Pirassununga/SP; ribeirão Três Bocas (NUP 5070, cinco exemplares) e ribeirão dos Apertados (MZUEL 4705, três exemplares), sendo os dois últimos, afluentes do rio Tibagi/PR, localizados no município de Londrina/PR. NUP significa coleção ictiológica do Nupélia (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura, da Universidade Estadual de Maringá). MZUEL significa coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica convencional de

Bertollo *et al.* (1978). Os cromossomos foram classificados em três grupos: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a), segundo Levan *et al.* (1964), com modificações. A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada pela impregnação por nitrato de prata (Howell & Black, 1980). Determinação dos sítios GC e AT-ricos pela técnica de coloração com DAPI/Cromomicina A₃ (CMA₃) (Schweizer, 1976; 1978; Schmid, 1980; Christian *et al.*, 1998, com modificações). Para determinação do padrão de distribuição da heterocromatina, foi utilizado bandamento-C (Sumner, 1972), coradas com Giemsa, CMA₃ e DAPI.

Resultados

A população do rio Mogi Guaçu apresentou número diplóide com 76 cromossomos e fórmula cariotípica: 8m+20sm+48st-a e NF = 104 (Fig. 1a), com a presença, em alguns exemplares, de constrição secundária no braço longo de até dois cromossomos (st-a) não homólogos (Fig. 1c).

Os resultados observados para a população do ribeirão Três Bocas foram idênticos aos exemplares analisados do ribeirão dos Apertados, por esta razão, as figuras apresentadas correspondem à população do ribeirão Três Bocas. O número diplóide encontrado para ambas as populações foi de 76 cromossomos, com fórmula cariotípica: 6m+20sm+50st-a e NF = 102 (Fig. 1b), e em alguns exemplares observou-se a presença de até três cromossomos apresentando constrição secundária, presente no braço curto de um par (st-a) grande e em um cromossomo (st-a) no braço longo (Fig. 1d).

Na impregnação por nitrato de prata, foram observadas RONS múltiplas para a população do rio Mogi Guaçu, variando de dois a três cromossomos (st-a) grandes,

localizadas na posição terminal, braço longo, correspondente aos pares 25 e 28 do complemento, sendo que, o de posição 25 não apresenta seu homólogo marcado; podendo apresentar também, um heteromorfismo de tamanho no par 28, coincidindo com a constrição secundária (Fig. 1c).

Para as populações do ribeirão Três Bocas e Apertados foram observados até três cromossomos marcados com o nitrato de prata, com as RONS localizadas na região terminal do braço longo de um cromossomo st-a, correspondente à posição 27 do complemento e terminal no braço curto de um par st-a (par 16), com a presença de heteromorfismo no par 16 (Fig. 1d).

Na população do rio Mogi Guaçu a coloração com fluorocromo CMA₃ evidenciou até três marcações, correspondentes aos cromossomos AgRONS, os quais também apresentaram um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos, marcações negativas anteriores as RONS e marcações centromérica em alguns cromossomos m-sm (Fig.2a); na coloração com DAPI foram observadas regiões negativas correspondentes as RONS e as regiões anteriores as RONS apresentaram-se coradas com DAPI (Fig.2b e c).

A coloração com CMA₃, evidenciou na população do ribeirão Três Bocas/Apertados marcações correspondentes aos cromossomos AgRONS e também na região centromérica de alguns cromossomos metacêntricos (Fig.2d); na coloração com DAPI foram observadas regiões negativas correspondentes as RONS (Fig.2e e f).

O padrão de distribuição da heterocromatina detectado pelo bandamento C para a população do rio Mogi Guaçu, evidenciou bandas em um par metacêntrico na região pericentromérica, e blocos grandes em dois pares (st-a) na posição terminal do braço longo, sendo um deles portadores das RONS, porém com a heterocromatina anterior à constrição secundária (Fig. 3a). Na banda-C corada pelo DAPI e CMA₃ as marcações foram as mesmas, com a presença de bandas fluorescentes na posição terminal do braço longo de cromossomos

st-a, não podendo separar as RONS da heterocromatina; e pericentromérica em um par metacêntrico (Fig. 3b e c).

Pela técnica de bandamento-C foi observada a presença de heterocromatina na região terminal no braço longo de dois pares st-a, na região centromérica de vários cromossomos e associada às RONS, as quais também apresentaram um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos, para as populações do ribeirão Três Bocas e Apertados (Fig.3d).

A banda-C corada pelo CMA₃ foram observadas marcações nas regiões terminais de alguns cromossomos st-a, localizadas tanto no braço curto quanto no braço longo sendo um par correspondente aos cromossomos AgRONS (Fig. 3e); na banda-C corada com DAPI foram observadas marcações na região centromérica de dois pares metacêntricos, além dos sítios negativos correspondentes as RONS (Fig.3f).

Discussão

Na análise convencional por coloração com Giemsa as três populações de *H. nigromaculatus* analisadas apresentaram número diplóide com 76 cromossomos; os exemplares coletados no ribeirão Três Bocas e ribeirão dos Apertados apresentaram o mesmo NF (102), mas quando comparados com os exemplares do rio Mogi Guaçu, diferem quanto ao NF, localização da constrição secundária e da heterocromatina relacionada com as RONS.

A população do rio Mogi Guaçu apresenta NF = 104, e as constrições secundárias estão presentes no braço longo de dois cromossomos (st-a) não homólogos grandes, enquanto que as outras populações apresentam a constrição localizada no braço curto de um par (st-a) e no braço longo de um cromossomo st-a relativamente pequeno. De acordo com Falcão & Bertollo (1985) a mudança na fórmula cariotípica e constância no número diplóide podem

estar relacionadas a rearranjos cromossômicos do tipo inversão cêntrica, inferindo na evolução cariotípica do grupo.

Na impregnação por nitrato de prata, as três populações apresentaram RONS múltiplas, e heteromorfismo entre os homólogos, porém, há diferenças quanto à localização destes sítios; na população do rio Mogi Guaçu, as RONS estão situadas terminalmente no braço longo de três cromossomos st-a grandes; e nas populações do ribeirão Três Bocas e Apertados as RONS estão situadas no braço curto de um par st-a grande e braço longo de um cromossomo st-a pequeno, todos na posição terminal.

Com relação ao heteromorfismo dos sítios AgRONS para as populações do ribeirão Três Bocas e Apertados não se sabe se está relacionado aos cístrons ribossômicos ou a uma amplificação de heterocromatina, já que ambas estão associadas, ao contrário da população do rio Mogi Guaçu onde a heterocromatina está localizada anterior as RONS. Este polimorfismo de tamanho das RONS pode ser resultado de um crossing-over desigual. Segundo dados da literatura o heteromorfismo pode ser observado em outros grupos de peixes Neotropicais (Foresti *et al.*, 1981; Almeida-Toledo *et al.*, 2000) e também verificada em outras espécies da família Loricariidae como: Hypoptopomatinae (Andreatta *et al.*, 1994; Alves, 2000); Hypostominae (Artoni & Bertollo, 1996) e Loricariinae (Giuliano-Caetano, 1998).

Nos resultados obtidos pela coloração com fluorocromo CMA₃ foram observadas marcações nos mesmos sítios marcados pela prata, evidenciando que as RONS para as três populações são GC-ricas, as quais foram correspondentes a bandas negativas quando coradas com DAPI; também foram observadas marcações na região centromérica de um a dois pares metacêntricos nas populações analisadas.

O padrão de distribuição de heterocromatina e sua composição, verificadas pela coloração com CMA₃ e DAPI, também diferiram entre as populações. A população do rio Mogi Guaçu apresenta heterocromatina rica em AT e CG intercaladas, com blocos grandes

localizados terminalmente em dois pares st-a, sendo um par correspondente aos portadores das RONS, e na região centromérica de um par metacêntrico. Entretanto, as populações do ribeirão Três Bocas e Apertados apresentam heterocromatina mais amplamente distribuída, nas regiões centroméricas, teloméricas e associadas às RONS, onde a banda-C corada com CMA₃ evidenciou as RONS e quando coradas pelo DAPI evidenciou as regiões centroméricas de dois pares metacêntricos.

Pelo fato das espécies do gênero *Hypostomus* não serem consideradas grandes migradoras e geralmente formarem pequenas populações (Britski *et al.*, 1984), a fixação dos rearranjos cromossômicos nestas populações pode ter sido facilitada. Segundo Oliveira *et al.* (1988) e Almeida-Toledo *et al.* (1993) isto pode influenciar na característica da macroestrutura cariotípica de um grupo, ou seja, quanto maior a mobilidade e tamanho do grupo, mais estável é sua macroestrutura cariotípica, pois o fluxo gênico é maior e a fixação de alguma alteração cromossômica é menor devido à alta quantidade de indivíduos, como os Curimatidae, Anostomidae, Prochilodontidae. Todavia, um grupo com pequena mobilidade e baixa densidade populacional possui seu cariótipo mais variado, a probabilidade de fixação de alguma alteração cromossômica é maior e o fluxo gênico é menor, como é o caso de Erythrinidae, Sternopygidae e o gênero *Astyanax*. Uma das alternativas para as diferenças observadas neste presente trabalho, entre as populações, pode ser devido à baixa densidade populacional em que se encontra *H. nigromaculatus*; sendo um grupo também com pequena mobilidade.

As populações, do rio Mogi-Guaçu e ribeirão Três Bocas-Apertados, analisadas neste trabalho estão relativamente isoladas geograficamente, provavelmente há muito tempo, e como não deve haver fluxo gênico entre elas, logo, modificações tanto na macro quanto na micro-estrutura podem ser fixadas e não compartilhadas entre estas, podendo levar a um estágio de especiação incipiente.

A semelhança cariotípica observada entre as populações do ribeirão Três Bocas e Apertados deve-se ao fato delas pertencerem à mesma bacia, do rio Tibagi, e estarem muito próximas geograficamente.

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho foi possível observar que as populações apresentam uma grande diferença citogenética, tanto macro quanto micro estrutural (NF, localização das RONS e pela composição e distribuição da heterocromatina). Estas diferenças corroboram os dados da literatura, de que este grupo é caracterizado como não conservado (Artoni & Bertollo, 1996); porém, quanto à anatomia, não há diferenças aparentes entre os exemplares analisados das três populações ou, estas diferenças podem ser muito sutis; sendo assim, as populações analisadas podem ser espécies diferentes, mas que morfologicamente são semelhantes, ou podemos ter uma mesma espécie que são morfologicamente idênticas, porém podem apresentar um considerável polimorfismo interpopulacional.

A análise genética de exemplares provenientes da localidade tipo de espécies conhecidamente polimórficas pode ser uma poderosa ferramenta para utilização na taxonomia de peixes Neotropicais. Com este procedimento, amarra-se um padrão genético a um táxon específico e qualquer diferença deste para populações consideradas coespecíficas e distantes geograficamente, abre-se um campo para questionamentos, não somente genético-evolutivos, mas também biogeográficos e taxonômicos.

No presente caso, deve-se considerar que o rio Mogi-Guaçu faz parte da bacia do rio Grande, e este juntamente com o rio Paranaíba apresenta uma ictiofauna relativamente diferenciada dos trechos inferiores da bacia do alto rio Paraná. Diversas espécies como *Hypostomus fluviatilis* (Schubart, 1964) e uma nova espécie de *Hypostomus* (C.H. Zawadzki e F. Langeani, em preparação) para o rio Grande e, *Oligosarcus planaltinae* Menezes & Géry, 1983, *Steindachnerina corumbae* Pavanelli & Britski, 1999, para a bacia do rio Paranaíba, são aparentemente restritas a estas bacias. Por outro lado, a bacia do rio Tibagi também apresenta

endemismos ictiológicos marcantes como a caracterizada pela recente descrição de duas novas espécies de *Isbrueckerichthys* (Jerep *et al.*, 2006). Para espécies de pequeno porte e de gêneros conhecidamente polimórficos é esperado alguma diferenciação genética ou morfológica entre suas populações.

As diferenças citogenéticas encontradas são robustas, porém não seriam suficientes para definí-las categoricamente como espécies biológicas distintas. É necessário ser conservativo e esperar a realização de mais estudos com relação à *Hypostomus nigromaculatus*, como análise molecular (DNAmt), utilização de aloenzimas e um estudo de morfometria mais minucioso, que poderão confirmar se as populações pertencem ou não à mesma espécie.

Referências Bibliográficas

- Almeida-Toledo, L. F., F. Foresti, M. F. Daniel, & S. A. Toledo-Filho. 1993. Nucleolar chromosome variants in *Sternopygus macrurus* (Pisces, Sternopygidae) from three Brazilian river basins. *Caryologia*, 46: 53-61.
- Almeida-Toledo, L. F., F. Foresti & S. A. Toledo-Filho. 2000. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater. *Chromosomes today*, 13: 169-182.
- Alves, A. L. 2000. Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Unpublished Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 129 pp.

- Andreato, A. A., L. F. Almeida-Toledo, C. Oliveira & S. A. Toledo-Filho. 1994. Cytogenetics studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia*, 47: 27-37.
- Artoni, R. F. & L. A. C. Bertollo. 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*, 49 (1): 81-90.
- Artoni, R. F. & L. A. C. Bertollo. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201-210.
- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). *Brazilian Journal of Genetic*, I: 103-120.
- Britski, H.A., Y. Sato & A. B. S. Rosa. 1984. Manual de identificação dos peixes da região de Três Marias, Minas Gerais (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3 ed. Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações-CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca. 143p.
- Cereali, S. S. 2006. Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul. Unpublished Dissertation, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 99 p.
- Christian, A., E. Mcniel, J. Roinson, R. Drabek, S. Larue, C. Waldren & J. Bedford. 1998. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and

- localization of FISH probes. *Cytogenetic and Cell Genetic*, 82: 172-179.
- Falcão, J.N., L.A.C. Bertollo. 1985. Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). *Journal of Fish Biology*, 27: 603-610.
- Foresti, F., L. F. Almeida-Toledo & S. A. Toledo-Filho. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetic and Cell Genetic*, 31: 137-144.
- Giuliano-Caetano, L. 1998. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Unpublished Thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 78 p.
- Howell, W. M. & D. A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a I-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Jerep, F. C., O. A. Shibatta, E. H. L. Pereira & O. T. Oyakawa. 2006. Two new species of *Isbrueckerichthys* Derijst, 1996 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. *Zootaxa*, 1372: 53–68.
- Kavalco, K. F., R. Pazza, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 94: 180-186.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

- Muramoto, J., S. Ohno & N. B. Atkin. 1968. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma*, 24: 59-66.
- Michelle, J. L., C. S. Takahashi & I. Ferrari. 1977. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42: 539-546.
- Oliveira, C., L. F. Almeida-Toledo, L. Mori, F. Foresti, H. A. Britski & S. A. Toledo-Filho. 1988. Chromosome formulae of Neotropical Freshwater Fishes. *Brazilian Journal of Genetic*, 11: 577-624.
- Oliveira, C. & F. Foresti. 1993. Cariótipo, RONS e bandas-C de *Hypostomus tietensis* (Pisces, Loricariidae). X Encontro Brasileiro de Ictiologia. Instituto Oceanográfico, São Paulo, p. 174.
- Scavone, M. D. P. & H. F. Júlio Jr. 1994. Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females (Loricariidae – Siluriformes) from the Paraná river basin. *Revista de Ictiologia*, 2/3 (1/2): 41-47.
- Schaefer, S. A. 1987. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the Loricariid subfamilies (Pisces, Siluroidei) *Cont. Sci. Nat. Hist. Mus. Los Angeles County* 394: 1-31.
- Schmid, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.

Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.

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

Zawadzki, C. H., E. Renesto & L. M. Bini. 1999. Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). *Revue suisse de Zoology*, 106: 91-105.

Zawadzki, C. H., M. F. P. S. Machado & E. Renesto. 2001. Differential expression for tissue-specific isozymes in three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 911-922.

Zawadzki, C. H., E. Renesto, R. E. Reis, M. O. Moura & R. P. Mateus. 2005. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, 123: 271-283.

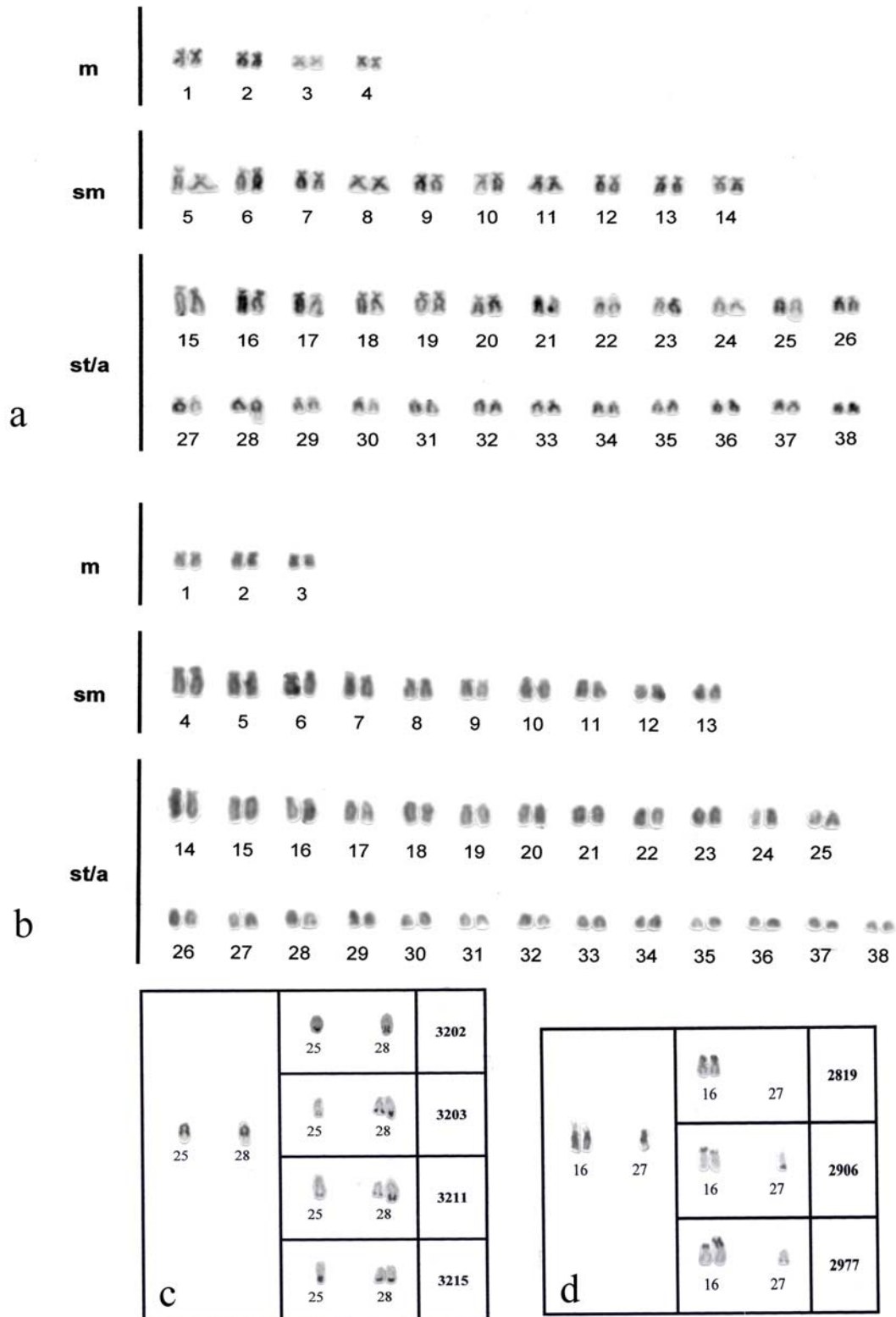


Fig. 1: Cariótipos de *H. nigromaculatus* corados por Giemsa: **a)** rio Mogi Guaçu e **b)** ribeirão Três Bocas; cromossomos portadores das constrições secundárias e heteromorfismo das RONS: **c)** rio Mogi Guaçu e **d)** ribeirão Três Bocas.

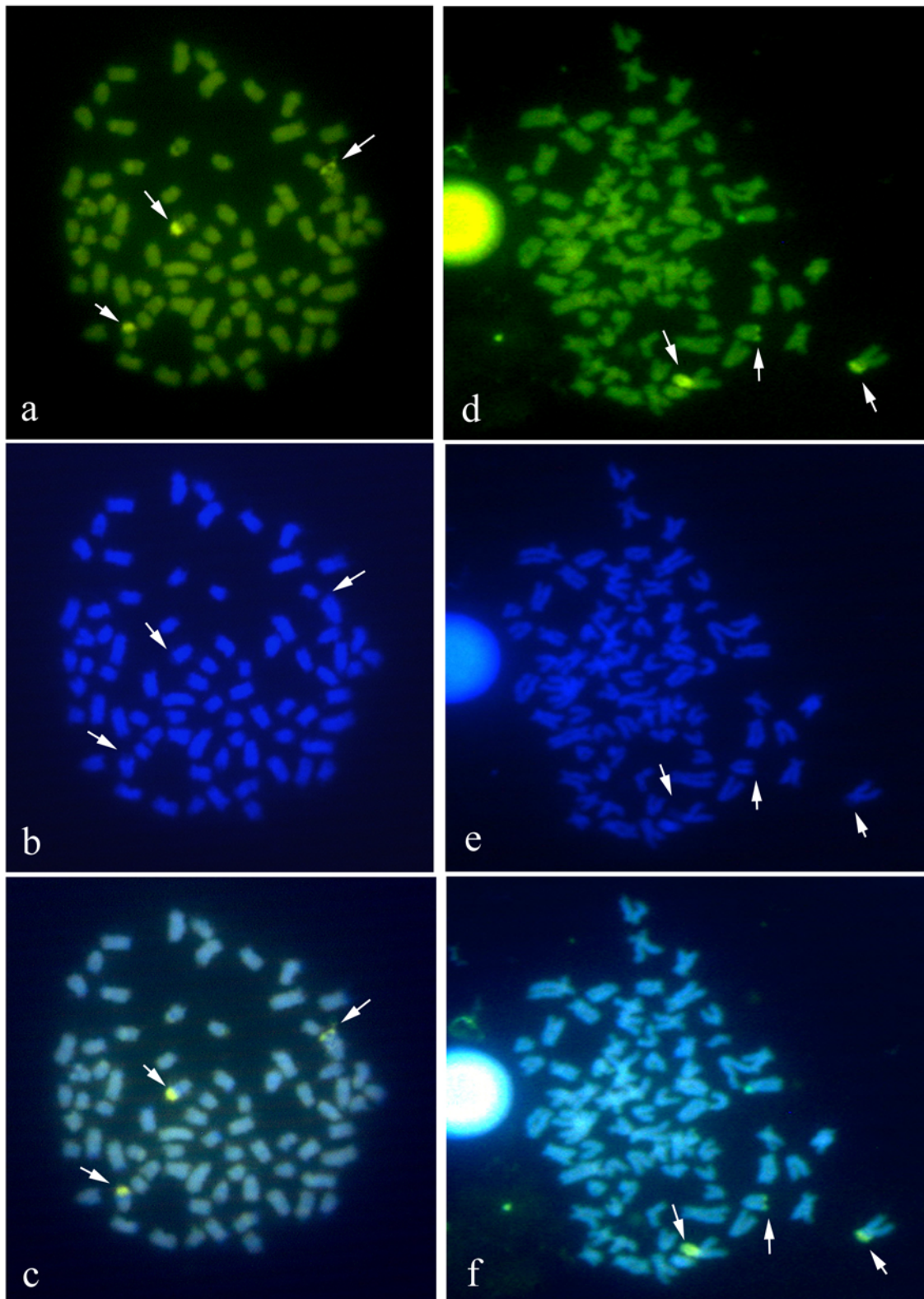


Fig. 2: Metáfases de *H. nigromaculatus* coradas com fluorocromos base-específicos: CMA₃, DAPI e sobreposição de ambos, respectivamente. **a) b) e c)** rio Mogi Guaçu; **d) e) e f)** ribeirão Três Bocas. As setas indicam as RONS.

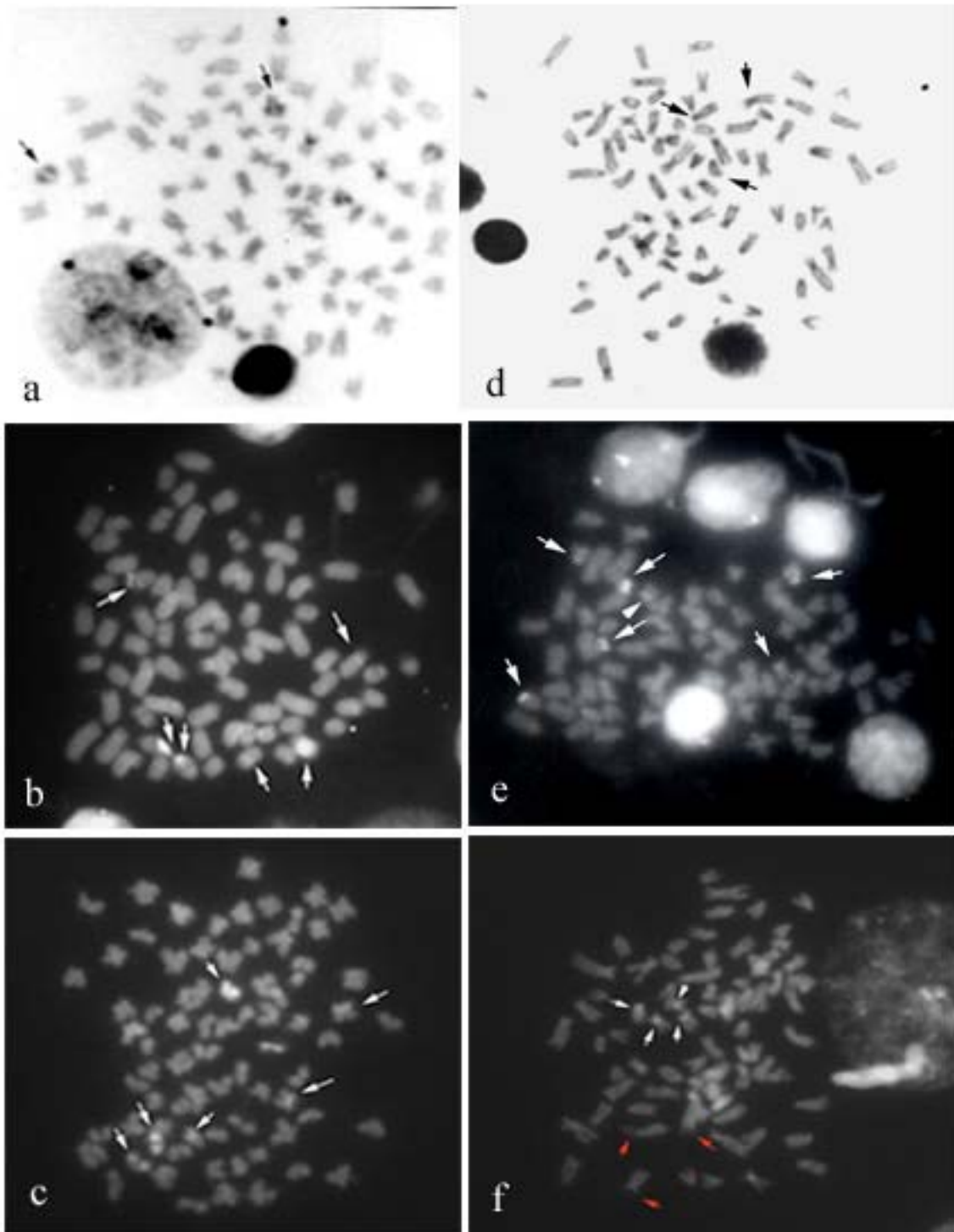


Fig. 3: Metáfases com Bandamento-C coradas com: Giemsa; CMA₃e DAPI, respectivamente. **a) b) e c)** rio Mogi Guaçu; e **d) e) e f)** ribeirão Três Bocas. As setas pretas indicam as RONS; as setas brancas os cromossomos heterocromáticos e as setas vermelhas indicam as bandas negativas.

ARTIGO II

**CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO ESPÉCIES DO
GÊNERO *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE,
HYPOSTOMINAE)***

*Este artigo será submetido à publicação na revista Genetics and Molecular Biology.

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO

Hypostomus (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)

Marceléia Rubert¹, Fernando Camargo Jerep² e Lucia Giuliano-Caetano¹

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 Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina.

Resumo

Dentre os siluriformes, Hypostominae é um dos grupos mais recentes da América do Sul. O gênero *Hypostomus* é um dos gêneros mais especiosos nesta subfamília, sendo dominante nos rios brasileiros por apresentar uma grande adaptabilidade a mudanças ambientais. Foram analisadas quatro espécies do gênero *Hypostomus*: *H. paulinus*, *H. strigaticeps*, *H. regani* e *H. ancistroides*, coletados em cinco locais diferentes; submetidos aos estudos citogenéticos por meio da coloração convencional (Giemsa), impregnação por nitrato de prata, fluorocromos CMA₃ e DAPI e bandamento-C. Na análise por Giemsa *H. paulinus* apresentou 2n = 76: 6m+16sm+54st-a; *H. strigaticeps* 2n = 72: 10m+16sm+46st-a; *H. regani* 2n = 72: 10m+18sm+44st-a; e *H. ancistroides* 2n = 68: 10m+26sm+32st-a. A impregnação por nitrato de prata detectou RONS múltiplas para a maioria das espécies analisadas, com exceção de *H. paulinus*. A coloração com CMA₃ evidenciou os cromossomos AgRONS e em *H. paulinus* além das RONS um par com heterocromatina segmentada. Com exceção de *H. regani* e *H. paulinus*, a heterocromatina está distribuída nas regiões teloméricas e pericentroméricas. Os resultados obtidos no presente trabalho são importantes para uma melhor caracterização das espécies estudadas e podem auxiliar na determinação da possível evolução cariotípica envolvida na especiação do gênero *Hypostomus*.

Palavras-chave: Hypostominae, RONS, fluorocromos.

Introdução

A família Loricariidae pertence à ordem Siluriformes, sendo a segunda maior dentre os Teleostei, quando considerado o número de espécies (Nelson, 1994), com aproximadamente 70 gêneros e mais de 600 espécies descritas (Isbrücker, 1980; Burgess, 1989; Armbruster, 1997).

A maioria das espécies que compõem esta família tem ampla distribuição, podem ser encontrados na América Central e América do Sul, vivem nos mais variados habitats, geralmente de corredeiras, no entanto, são encontradas algumas espécies que ocupam áreas restritas, não toleram ambientes com alta salinidade nem salobras (Weber in Reis *et al.*, 2003).

É uma das poucas famílias desta ordem cuja filogenia não foi bem estabelecida. A sistemática da família vem sendo constantemente revisada, tanto com estudos de osteologia, morfometria (Armbruster, 2004) quanto molecular com a utilização de DNA mitocondrial (Montoya-Burgos, 2003), ou isoenzimas (Zawadzki *et al.*, 2001).

De acordo com Armbruster (2004) a família é dividida em quatro subfamílias: Neoplecostominae, Loricariinae, Hypostominae, Hypoptopomatinae e uma nova subfamília formada pelos gêneros *Upsilonodus* e *Delturus*.

Os estudos citogenéticos da família ainda são escassos e a maioria baseados no número diplóide, fórmula cariotípica e RONS pela impregnação pelo nitrato de prata. Das aproximadamente 600 espécies que compõem a família, apenas 56 possuem algum dado citogenético.

A subfamília Hypostominae é caracterizada por possuir numerosas espécies, sendo o gênero *Hypostomus* o mais especioso, e por serem constituídos na maioria por espécies de médio porte (Weber in Reis *et al.*, 2003).

Os Hypostominae são restritos a água doce, com exceção de *Hypostomus watwata*,

que vive em águas estuárias; são espécies bentônicas que podem ser encontradas em bancos de areia ou rios rochosos. A maioria destes animais possui hábitos crepusculares e durante o dia ficam embaixo das pedras ou em troncos de árvores mortas (Weber in Reis *et al.*, 2003).

De acordo com Isbrücker (1980) a subfamília Hypostominae é constituída por 45 gêneros, e com relação aos estudos citogenéticos, apenas nove gêneros possuem algum tipo de trabalho: *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pogonopoma*, *Pterygoplichthys*, *Megalancistrus*, *Panaque*, *Ancistrus* e *Hemiancistrus*, sendo *Hypostomus* o gênero que possui maior número de espécies cariotipadas (Giuliano-Caetano, 1998).

Nosso trabalho analisou citogeneticamente quatro espécies do gênero *Hypostomus* de diferentes localidades, visando contribuir para uma melhor caracterização citogenética do gênero e uma melhor compreensão da evolução tanto do grupo quanto da família Loricariidae.

Material e Métodos

Foram analisadas quatro espécies do gênero *Hypostomus*: dois exemplares de *H. paulinus* (Ihering, 1905) coletados no ribeirão Três Bocas, um exemplar de *H. regani* (Ihering, 1905) coletado no rio Jacutinga, 56 exemplares de *H. ancistroides* (Ihering, 1911) coletados no ribeirão Três Bocas, rio Taquari, rio Água das Pedras (afluentes do rio Tibagi/PR) e rio Água do Pato (afluente do rio Paranapanema/SP) e 62 exemplares de *H. strigaticeps* (Regan, 1908) coletados no ribeirão Três Bocas, rio Taquari, rio Jacutinga, rio Água das Pedras e rio Água do Pato.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica convencional de Bertollo *et al.* (1978). Os cromossomos foram classificados em três grupos: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a), segundo Levan *et al.* (1964), com modificações. A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada pela impregnação por nitrato de prata (Howell & Black, 1980). Para determinação dos sítios GC e

AT-ricos foram utilizadas as técnicas de coloração com Cromomicina A₃ / DAPI, (Schmid, 1980; Schweizer, 1976; Christian *et al.*, 1998, com modificações). Para determinação do padrão de distribuição da heterocromatina, foi utilizado bandamento-C (Sumner, 1972), coradas com Giemsa e com fluorocromos CMA₃ e DAPI.

Resultados

Por meio da coloração convencional com Giemsa *H. paulinus* apresentou $2n = 76$, com fórmula cariotípica: $6m+16sm+54st-a$ e $NF = 98$, com a presença de constrição secundária em um cromossomo do par 16 do complemento. Pela impregnação por nitrato de prata foram evidenciadas RONS simples, em dois cromossomos *st-a* (par 16) localizadas na posição terminal do braço longo, apresentando heteromorfismo de tamanho entre os homólogos (Fig. 1A). A coloração com CMA₃ evidenciou quatro cromossomos *st-a* marcados, sendo um par correspondentes aos cromossomos AgRONS e um par *st-a* com um bloco segmentado no braço longo (Fig. 2A). Na coloração com DAPI foram observadas bandas negativas correspondentes as RONS (Fig. 2B).

A heterocromatina está distribuída na região pericentromérica do 1º par (*m*) do complemento, nas regiões terminais do braço longo de sete cromossomos *st-a*, sendo um par destes portadores das RONS, porém, com a heterocromatina anterior a constrição secundária e em um par *st-a* ela apresenta-se segmentada, ocupando quase todo o braço longo (Fig. 2D). Na banda-C corada com CMA₃ foram observadas marcações nas regiões teloméricas e no par com aspecto segmentado (Fig. 2E), a banda-C/DAPI apresentou marcações nas regiões teloméricas e na região pericentromérica do par metacêntrico (Fig. 2F).

H. strigiceps apresentou $2n = 72$, com $10m+16sm+46st-a$ e $NF = 98$, com a presença em alguns exemplares de constrição secundária em um cromossomo do par 28. Por meio da impregnação por nitrato de prata foram evidenciadas RONS múltiplas, variando de dois a

quatro cromossomos (st-a) marcados, localizadas terminal no braço longo dos pares 28 e 31 do complemento (Fig. 1B). A coloração com CMA₃ evidenciou quatro cromossomos (st-a) marcados na região terminal do braço longo, correspondentes aos cromossomos AgRONS e centromérica na maioria dos cromossomos st-a (Fig. 3A). O DAPI evidenciou blocos grandes na região terminal de até seis cromossomos st-a (Fig. 3B).

O padrão de distribuição da heterocromatina foi observado na região pericentromérica do 3º par (m) e terminal no braço longo de até oito cromossomos st-a, sendo que a maioria apresenta blocos grandes, em alguns exemplares foram observadas marcações intersticiais em um par (st-a) correspondente ao 33º par do complemento (Fig. 3D). Pela coloração da banda-C com o fluorocromo CMA₃ não foi observada nenhuma marcação (Fig. 3E), porém quando corada com DAPI, foram verificadas marcações nos cromossomos evidenciados pela BC/Giemsa (Fig. 3F).

H. regani apresentou $2n = 72$, com fórmula cariotípica: $10m+18sm+44st-a$ e $NF =$ Pela impregnação por nitrato de prata foram evidenciados quatro cromossomos st-a marcados, com as RONS localizadas na posição terminal do braço curto, apresentando heteromorfismo entre os homólogos (Fig. 4A). A coloração com CMA₃ evidenciou quatro cromossomos (st-a) com marcações terminais no braço curto, correspondentes aos cromossomos AgRONS e bandas intersticiais negativas (Fig. 5A). No DAPI estas regiões negativas apresentaram-se coradas (Fig. 5B).

A heterocromatina está distribuída na região intersticial da maioria dos cromossomos st-a e centromérica em um par metacêntrico (Fig. 5D). Na banda-C corada com CMA₃ foram observadas algumas marcações nas regiões centroméricas, nas RONS e bandas intersticiais negativas (Fig. 5E); na banda-C/DAPI marcações nas regiões centroméricas e na região intersticial da maioria dos cromossomos st-a (Fig. 5F).

O número diplóide de *H. ancistroides* é de 68, com fórmula cariotípica:

10m+26sm+32st-a, sendo que um par apresentou um heteromorfismo de tamanho com relação ao seu homólogo (par 26), apresentou um NF = 104, com a presença de constrição secundária no primeiro par st-a, em alguns exemplares analisados. Pela impregnação por nitrato de prata foram evidenciadas RONS múltiplas, variando de dois a oito cromossomos (st-a) marcados, localizadas na região terminal do braço curto (Fig. 4B). A coloração com fluorocromo GC-específico (CMA₃) evidenciou os cromossomos AgRONS, um par st-a na região terminal do braço longo com heteromorfismo de tamanho e na região pericentromérica de um par metacêntrico (Fig. 6A). No DAPI foi evidenciado apenas ausência de marcação nas RONS (Fig. 6B).

A heterocromatina está distribuída na região pericentromérica do 2º par (m) do complemento e terminal no braço longo do par 26, sendo que este par apresenta um heteromorfismo com relação ao tamanho da heterocromatina (Fig. 6D). Na banda-C corada com CMA₃ os cromossomos marcados foram os portadores das RONS e a heterocromatina (Fig. 6E); na banda-C/DAPI foi evidenciado o par metacêntrico e o par st-a que apresenta heteromorfismo de tamanho e não foram observadas marcações nos cromossomos portadores das RONS (Fig. 6F).

Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho pela coloração convencional com Giemsa, mostraram uma variação do número diplóide de $2n = 68$ (*H. ancistroides*) a $2n = 76$ (*H. paulinus*) e NF de 96 a 104, sendo que o número diplóide mais comum observado no gênero está entre 72 e 76 (Tabela 1). Segundo Artoni & Bertollo (1996) entre os rearranjos cromossômicos, as fissões e fusões cêntricas seriam as mais importantes durante a evolução desse grupo, pois de acordo com dados da literatura o gênero *Hypostomus* possui uma grande variação quanto ao número diplóide, de $2n = 52$ para *H. emarginatus* (Artoni & Bertollo,

2001) a $2n = 84$ em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido (Cereali, 2006). A estrutura cariotípica de *Hypostomus* pode variar entre as espécies com o mesmo número diplóide, com a ocorrência de diferentes fórmulas cariotípicas, caracterizando-o como um grupo não conservado no que diz respeito ao número e fórmula cromossômica (Artoni & Bertollo, 1996).

Com relação à fórmula cariotípica pode-se perceber que os indivíduos que apresentam maior número diplóide possuem também maior quantidade de cromossomos st-a, e vice-versa (Tabela 1). De acordo com Oliveira & Gosztanyi (2000) os cariótipos com menor número diplóide são considerados basais em Siluriformes e os cariótipos com número diplóide maior os mais derivados. A maioria das subfamílias de Loricariidae apresenta uma predominância do número diplóide entre 54 e 52 cromossomos, Hypostominae é a que possui maior número diplóide, portanto alguns autores sugerem que esta é a mais derivada dentre os Siluriformes (Alves, 2000).

Quando comparados os resultados obtidos neste trabalho com os presentes na literatura para algumas destas espécies de Hypostominae, pode-se perceber algumas diferenças, como no trabalho realizado por Michele *et al.* (1977) onde estes descrevem um número diplóide para *H. ancistroides* de 68 cromossomos ($10m+27sm+31st-a$, para machos e $10m+28sm+30st-a$, para fêmeas, com diferença no NF) sendo semelhante à fórmula cariotípica observada no presente trabalho. Posteriormente em um estudo realizado no rio Mogi Guaçu por Artoni & Bertollo (1996) foi observada para *H. ancistroides* $2n = 68$ ($16m+18sm+34st-a$) sem diferença de NF entre machos e fêmeas, esta diferença também não foi observada neste presente trabalho, porém não houve concordância na fórmula cariotípica e $NF = 102$; outra espécie analisada pelos mesmos autores foi *H. regani* com $2n = 72$ cromossomos ($10m+20sm+42st-a$), a análise desta espécie no presente trabalho apresentou uma diferença sutil na fórmula cariotípica ($10m+18sm+44st-a$) e consequentemente no NF (100). Michele *et al.* (1977) analisaram também *H. strigaticeps* e *H. paulinus*, o número

diplóide observado foi de 74 cromossomos com $NF = 86$ e 104 respectivamente; comparando com os resultados do presente trabalho, ocorreram diferenças tanto no número diplóide ($2n = 72$ e 76 , respectivamente) quanto na fórmula cariotípica entre as duas espécies analisadas.

As diferenças observadas entre os resultados apresentados neste trabalho e os da literatura podem ser resultados de dificuldades no pareamento ou classificação cromossômica, devido ao valor da relação de braços (RB) muitas vezes estar próxima aos limites estabelecidos, ou ainda pode estar relacionado à diferença na condensação relativa entre alguns cromossomos, como citado por Feldberg & Bertollo (1985) e Margarido (1995); podem ser resultados de rearranjos ocorridos entre as populações, ou até mesmo erro na identificação das espécies. Segundo Reis *et al.* (1990) apud Zawadzki *et al.* (1999) o gênero *Hypostomus* além de apresentar um grande número de espécies, possui uma grande variação intra-específica com relação à morfologia e ao padrão de pigmentação, e muitas vezes devido ao limitado conhecimento da distribuição da ictiofauna da região Neotropical, pode resultar na identificação errada de muitas espécies.

Foram observados na maioria das espécies analisadas heteromorfismo de tamanho de RONS entre os cromossomos homólogos, com exceção de *H. strigiceps*. Este é um caráter bastante comum, observado também em espécies da subfamília Hypoptopomatinae (Andreatta *et al.*, 1994), em Loricariinae (Giuliano-Caetano, 1998) em outras espécies de Hypostominae (Artoni & Bertollo, 1996) e em outros grupos de peixes neotropicais analisados (Foresti *et al.*, 1981; Almeida-Toledo *et al.*, 1985; 2000). Este heteromorfismo observado quanto ao tamanho das RONS, podem ser resultantes de um crossing-over desigual em um dos cromossomos homólogos, e estes por sua vez, podem ser transmitidos por herança (Markovic *et al.*, 1978; Gold, 1979).

Tabela 1: Dados citogenéticos para a/Espécie, Local de coleta, número diplóide (2n), fórmula cromossômica, número fundamental (NF) e referência (Ref.). m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; MT = Mato Grosso; SP = São Paulo; PR = Paraná – Estados Brasileiros; *** diferentes localidades da bacia do Paranapanema.

Espécie	Local	2n	NF	fórmula cromossômica	Ref.
<i>Hypostomus affinis</i>	Córrego Jacuí (SP)	66	94	14m 14sm 12st 26a	9
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	74	104	10m 20sm 44st-a	23
<i>Hypostomus ancistroides</i>	—	68 macho 68 fêmea	105 106	10m 27sm 31st-a 10m 28sm 30st-a	13 13
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Córrego Monjolinho (SP)	68	102	16m 18sm 34st-a	23
<i>Hypostomus ancistroides</i>	***	68	104	10m 26sm 32st-a	29
<i>Hypostomus aff. auroguttatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	76*	114	8m 30sm 38st-a	23
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	64 macho 64 fêmea	100 97	16m 20sm 28st-a 16m 19sm 27st-a	28 28
<i>Hypostomus emarginatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	98	16m 30sm 6st	20
<i>Hypostomus macrops</i>	—	68	92	10m 14sm 44st-a	13
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Rio Mogi Guaçu (SP)	76*	104	8m 20sm 48st-a	29
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Ribeirão Três Bocas (PR)	76*	102	6m 20sm 50st-a	29
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Ribeirão dos Apertados (PR)	76*	102	6m 20sm 50st-a	29
<i>Hypostomus paulinus</i>	—	74	104	10m 20sm 44st-a	13
<i>Hypostomus paulinus</i>	Ribeirão Três Bocas	76	98	6m 16sm 54st-a	29
<i>Hypostomus plecostomus</i>	—	54	90	36m-sm 18st-a	24
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72**	102	10m 20sm 42st-a	23
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Jacutinga	72**	100	10m 18sm 44st-a	29
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	—	74	86	8m 4sm 62st-a	13
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	***	72	98	10m 16sm 46st-a	
<i>Hypostomus</i> sp. A	Córrego Rincão (SP)	70	102	18m 14sm 38st-a	23
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72**	102	12m 18sm 42st-a	23
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72**	103	13m 18sm 41st-a	25
<i>Hypostomus</i> sp. D1	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72**	108	10m 26sm 36st-a	23
<i>Hypostomus</i> sp. D2	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72**	106	14m 20sm 38st-a	23
<i>Hypostomus</i> sp. E	Rio Mogi-Guaçu (SP)	80	104	8m 16sm 56st-a	23
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	76*	102	10m 16sm 50st-a	22
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	75	102	10m 17sm 48st-a	25
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64	102	14m 24sm 26st-a	26
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64	103	15m 24sm 25st-a	26
<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>Hypostomus</i> sp. 2-rio Perdido NUP 4249	Rio Perdido (MS)	84	106	6m 16sm 62st-a	28
<i>Hypostomus</i> sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	82	102	6m 14sm 62st-a	28

Referências: 24 – Muramoto *et al.* (1968) in Artoni & Bertollo (2001); 13 – Michelle *et al.* (1977); 22 – Artoni (1996); 23 – Artoni & Bertollo (1996); 26 – Artoni *et al.*, 1998; 5 – Fenerich (1998) in Kavalco *et al.* (2005); 25 – Artoni & Bertollo (1999); 27 – Artoni *et al.* (1999); 20 – Artoni & Bertollo (2001); 9 – Kavalco *et al.* (2005); 28 – Cereali (2006); 29 – Rubert (2007).

Quanto à evolução das RONS em Loricariidae existem algumas hipóteses: segundo Artoni (1996) a RON terminal é um caráter plesiomórfico em Loricariidae; Oliveira & Gosztonyi (2000) sugerem a RON terminal como um caráter basal e as intersticiais como derivadas em Siluriformes, onde os autores utilizaram como grupo externo Gymnotiformes e Characiformes; para Alves (2000) as RONS terminais seriam derivadas na família Loricariidae porém basais em Siluriformes, sendo que as subfamílias Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Hemipsichthiinae conservaram o fenótipo das RONS intersticiais e as demais apresentariam divergência com relação aos fenótipos de RONS. No presente trabalho, com exceção de *H. paulinus*, todos apresentaram RONS múltiplas e localizadas terminalmente, o que é observado na maioria dos Loricariidae e na maioria dos peixes Neotropicais.

No que diz respeito à distribuição da heterocromatina, no presente trabalho, pode-se perceber que, com exceção de *H. regani*, que possui blocos intersticiais e *H. paulinus*, que apresenta um par com três blocos intersticiais, no braço longo, todos possuem heterocromatina distribuída terminalmente em cromossomos st-a e parecem compartilhar um mesmo par com a heterocromatina distribuída na região pericentromérica; quanto à composição química todos possuem heterocromatinas ricas em CG e AT, com exceção de *H. strigaticeps*, que apresenta heterocromatina rica em AT.

Com relação ao número diplóide, macroestrutura cariotípica e bandamento cromossômico, o gênero *Hypostomus* tem sido caracterizado como não conservado, esta diversificação cariotípica entre as diferentes populações pode estar relacionados a diferentes rearranjos cromossômicos presentes na história evolutiva deste gênero (Artoni & Bertollo, 1996); e/ou pela mobilidade e tamanho do grupo, ou seja, quanto maior a mobilidade e quantidade de indivíduos, mais estável é sua macroestrutura cariotípica (Oliveira *et al.*, 1988). Por meio de estudos de filogenia morfológica, Schaefer (1987) propôs que esta diversidade cromossômica pode estar relacionada com uma possível origem polifilética dos Hypostominae.

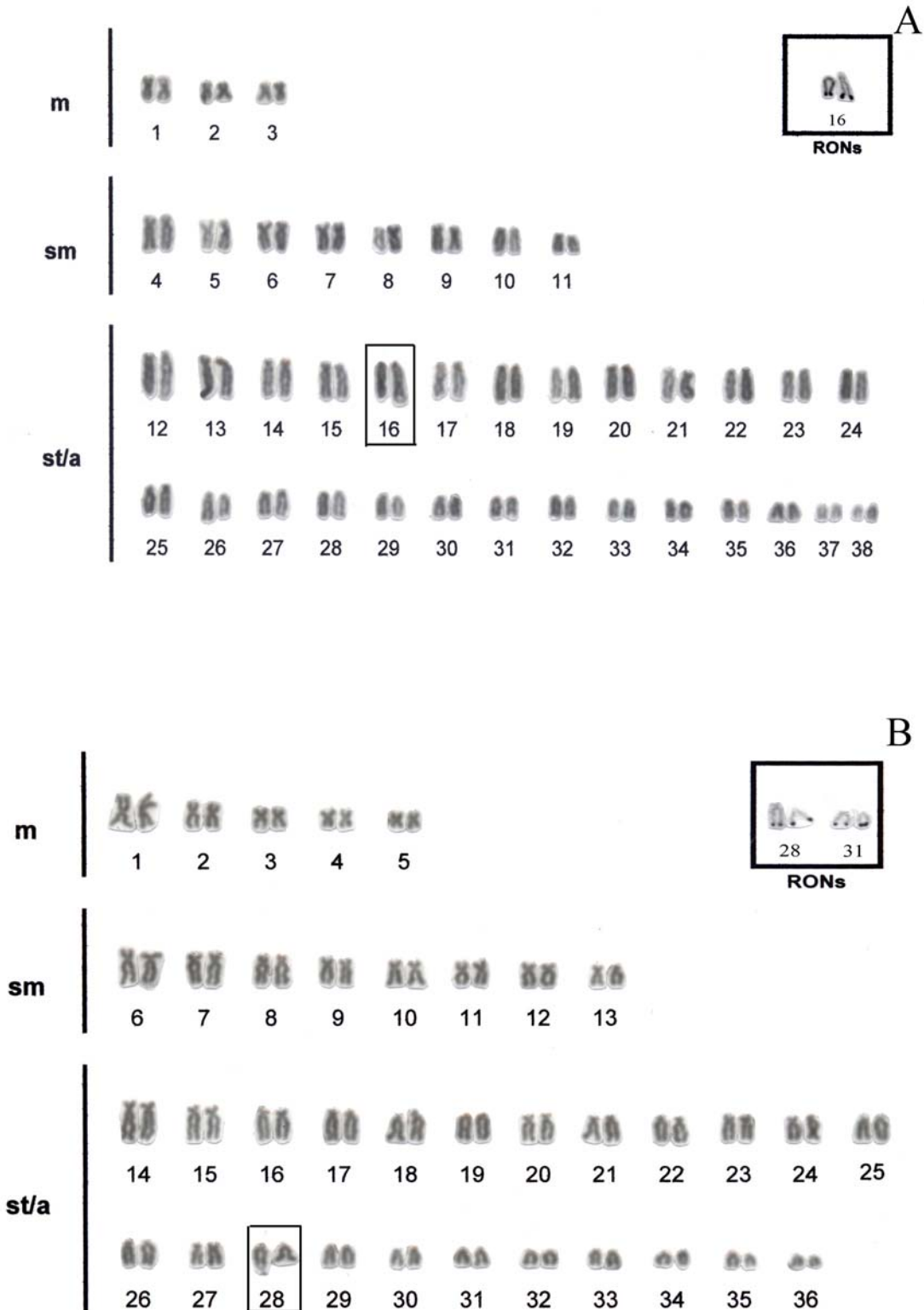


Figura 1: Cariótipos corados por Giemsa e RONS: **A)** *H. paulinus*; **B)** *H. strigaticeps*. Os pares portadores das constrições secundárias encontram-se em destaque. No box os cromossomos portadores das RONS.

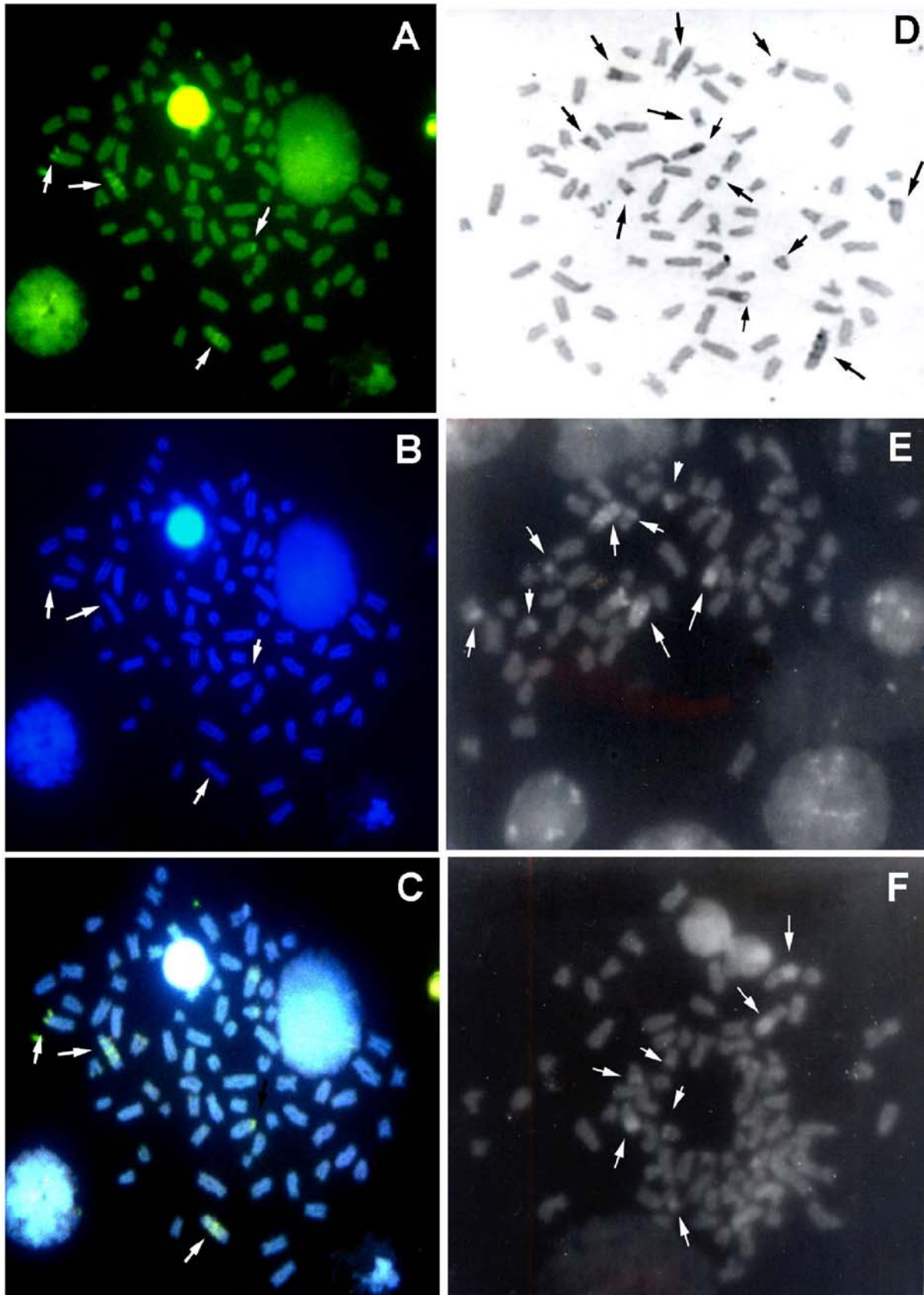


Figura 2: Metáfases de *H. paulinus* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C corada com CMA₃; **F)** banda-C corada com DAPI. As setas brancas à esquerda indicam as regiões GC ricas, à direita os cromossomos heterocromáticos.

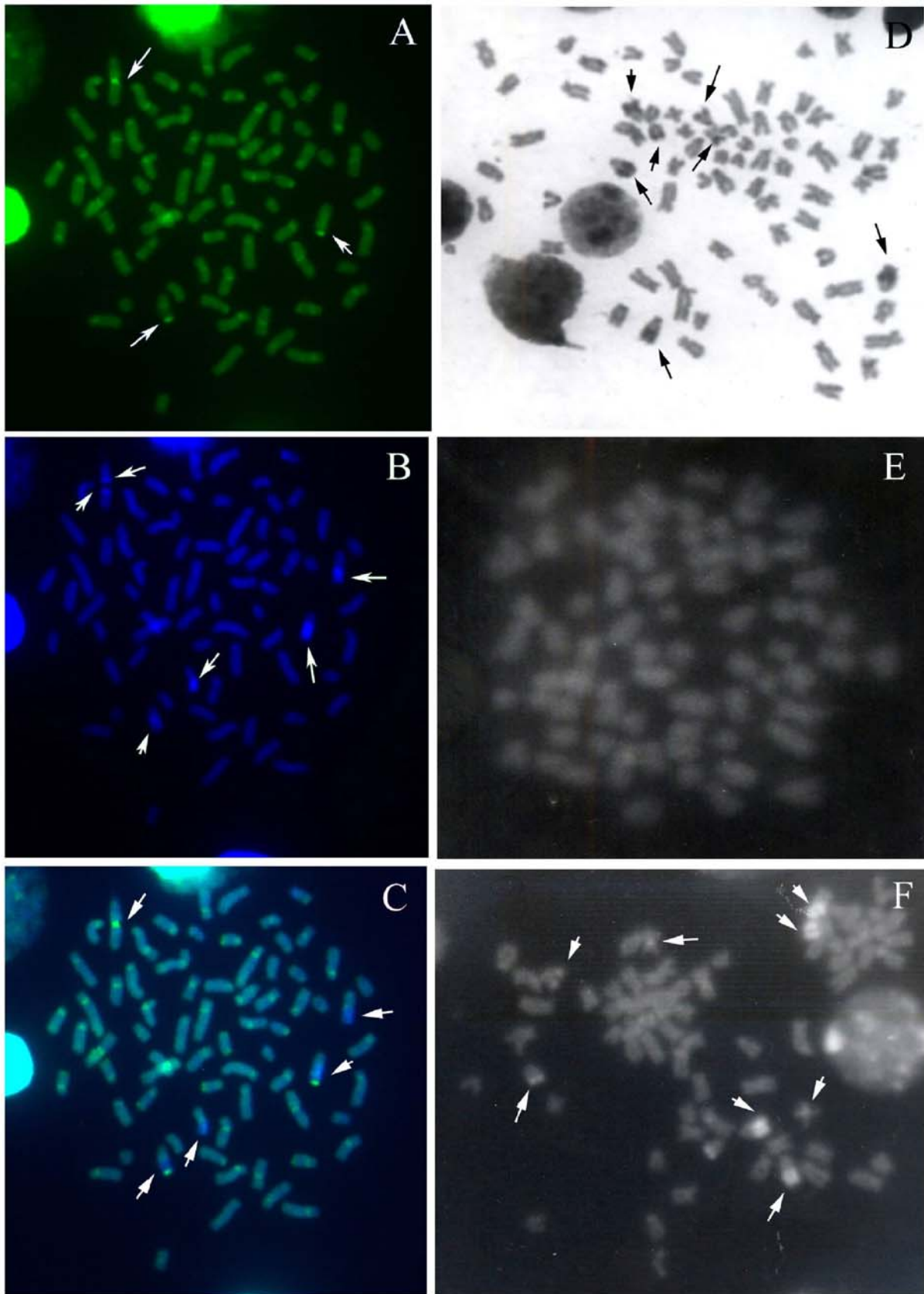


Figura 3: Metáfases de *H. strigaticeps* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C corada com CMA₃; **F)** banda-C corada com DAPI. Em **A)** As setas brancas indicam as RONS, **B)** os blocos ricos em AT, à direita as setas brancas e pretas indicam os cromossomos heterocromáticos.

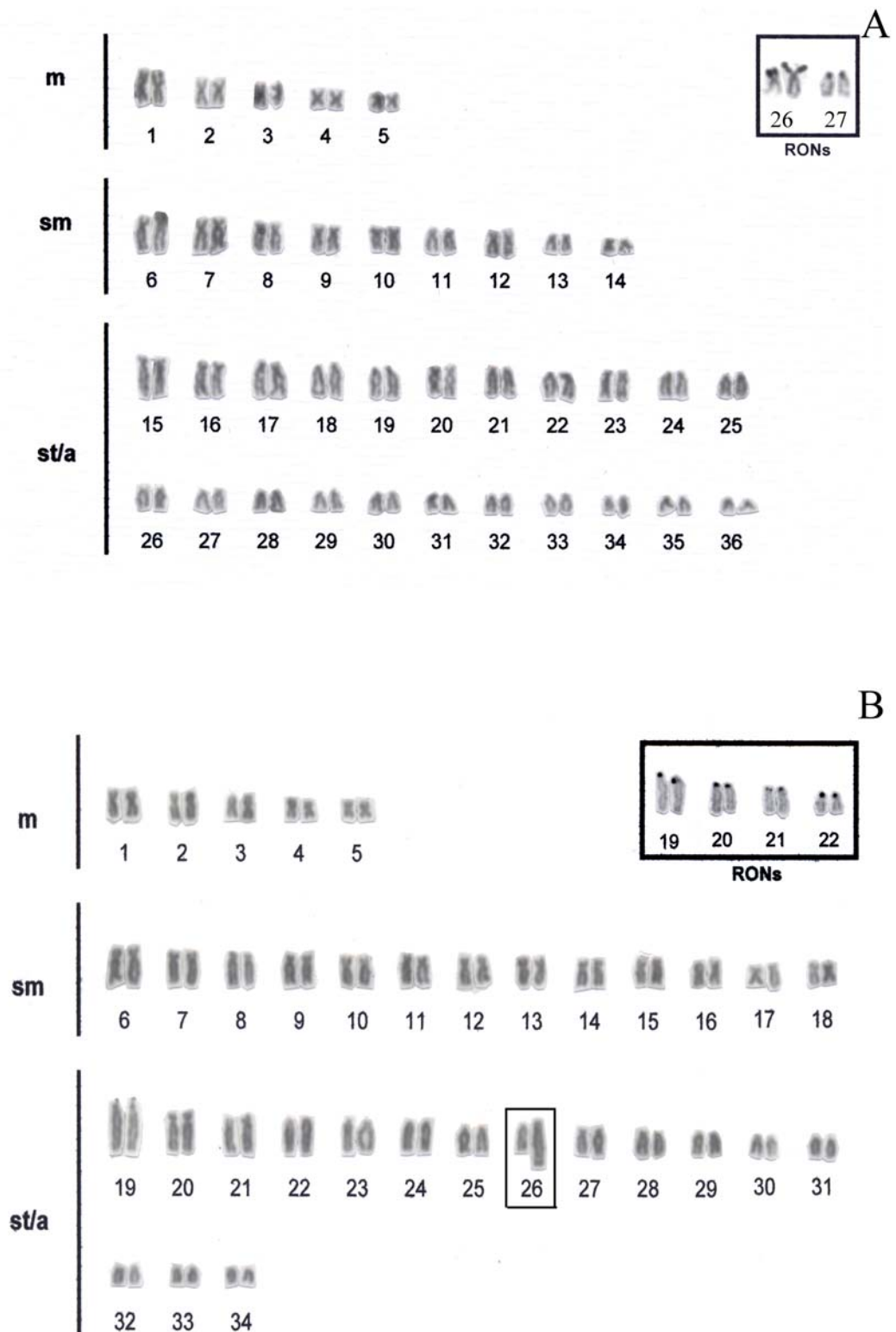
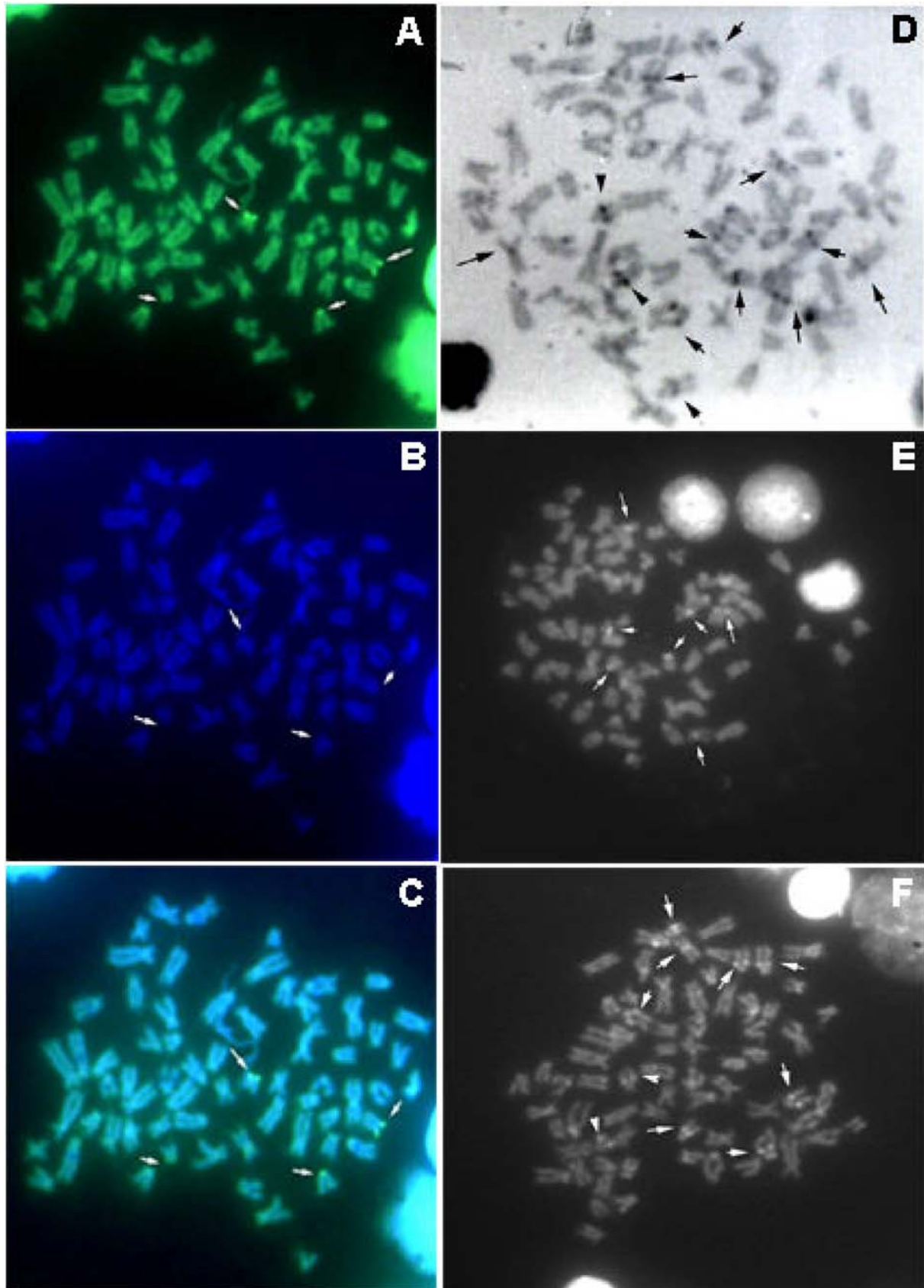


Figura 4: Cariótipos corados por Giemsa e RONs: **A)** *H. regani*; **B)** *H. ancistroides*. Em destaque está o par com heteromorfismo de tamanho. No box os cromossomos portadores das RONs.



gFigura 5: Metáfases de *H. regani* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C com CMA₃; **F)** banda-C com DAPI. As setas brancas à esquerda indicam as RONS, à direita as setas brancas e pretas indicam os cromossomos heterocromáticos.

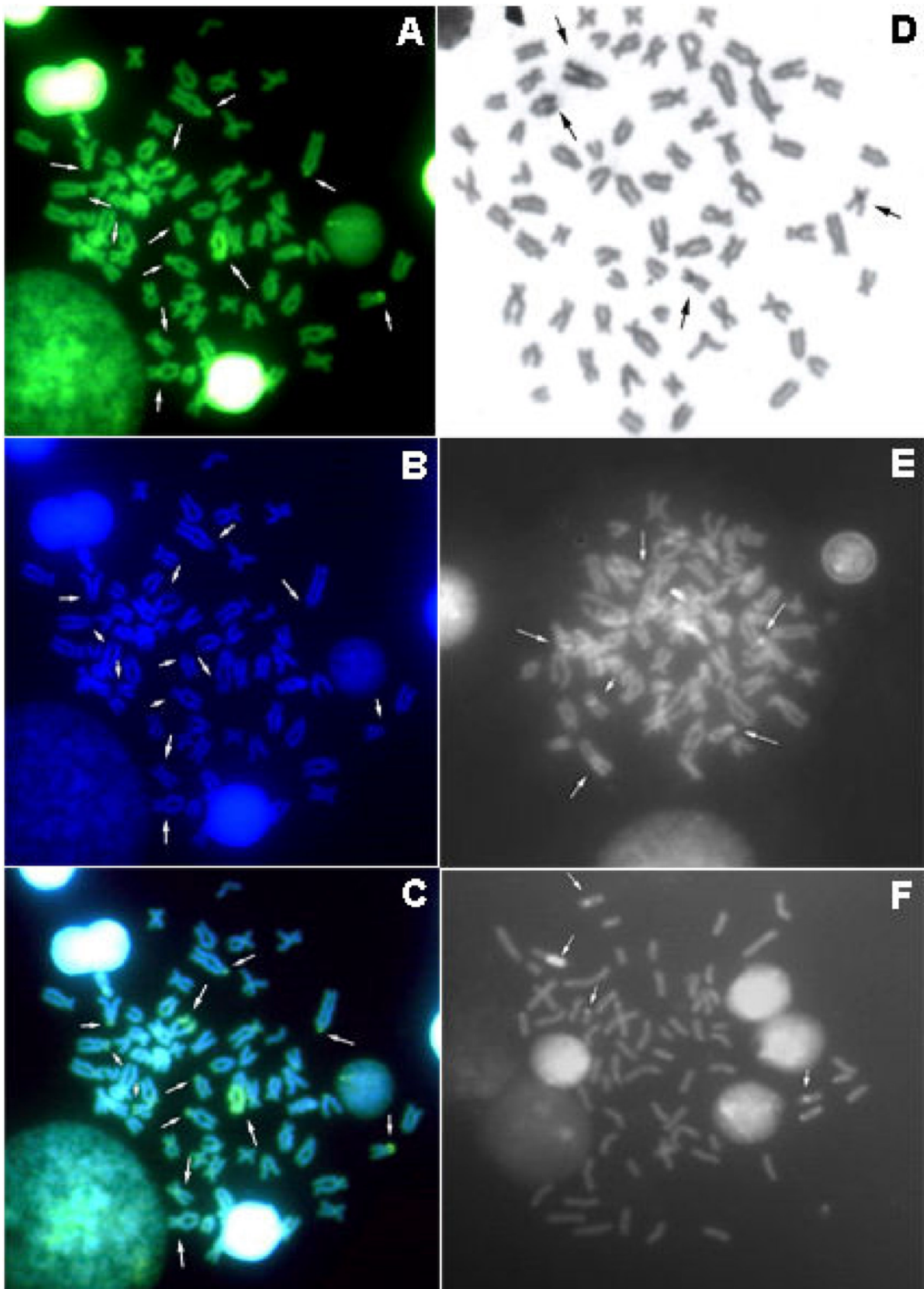


Figura 6: Metáfases de *H. ancistroides* coradas por: **A)** CMA₃; **B)** DAPI; **C)** sobreposição de ambos; **D)** banda-C corada com giemsa; **E)** banda-C com CMA₃; **F)** banda-C com DAPI. As setas brancas à esquerda indicam as regiões ricas em GC, à direita as setas brancas e pretas indicam os cromossomos heterocromáticos.

Referências Bibliográficas

- Almeida-Toledo LF and Foresti F (1985) As Regiões Organizadoras do Nucléolo em peixes. *Ciênc Cult* 37:448-452.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F and Toledo-Filho SA. (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater. *Chromosomes today* 13:169-182.
- Alves AL (2000) Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 129 pp.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C and Toledo-Filho SA (1994) Cytogenetics studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia* 47:27-37.
- Armbruster JW (1997) Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Ancistrinae, Hypostominae and Neoplecostominae. Ph.D. Thesis, Urbana, Illinois, USA.
- Armbruster JW (2004) Phylogenetic relationships of suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis en the Hypostominae and Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 141:1-80.

Artoni RF (1996) Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Loricariidae, Hypostominae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 162pp.

Artoni RF and Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49:81-90.

Artoni RF and Bertollo LAC (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106:209-214.

Artoni RF and Bertollo LAC (2001) Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134:201-210.

Artoni RF, Venere PC and Bertollo LAC (1998) A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63:421-425.

Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC and Galetti Jr PM (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genet Mol Biol* 22:1-6.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). *Braz J Genet* 1:103-120.

Burgess WE (1989) An Atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of

Siluriformes. T.F.H. Publications, New Jersey, 784 pp.

Cereali SS (2006) Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriforme) do Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 99pp.

Christian A, Mcniel 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.

Feldberg E and Bertollo LAC (1985) Karyotypes of 10 species of neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38:257-268.

Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31:137-144.

Giuliano-Caetano L (1998) Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 78 p.

Gold JR (1979) Cytogenetics fish physiology. Academic press 8:353-393.

Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.

- Isbrücker IJH (1980) Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Versl Tech Gegevens* 22:1-181.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes) *Heredity* 94:180-186.
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Margarido VP (1995) Uma contribuição a citogenética dos Bryconinae (Characiformes, Characidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 115pp.
- Markovic VD, Worton RG and Berg JM (1978) Evidence for de inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. *Itum Genet* 41:181-187.
- Michelle JL, Takahashi CS and 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.
- Nelson JS (1994) *Fishes of the world*. 3rd edition. John Wilry Sons, New York, 600 pp.

- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Foresti F, Britski HA and Toledo-Filho SA (1988) Chromosome formulae of Neotropical Freshwater Fishes. *Brazil J Genetic* 11:577-624.
- Oliveira C and Gosztonyi AE (2000) A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriformes. *Caryologia* 53:31-37.
- Reis RE, Kullander SO and Ferraris Jr CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, 742 pp.
- Schaefer SA (1987) Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the Loricariid subfamilies (Pisces, Siluroidei) *Cont. Sci. Nat. Hist. Mus. Los Angeles County* 394:1-31.
- Schmid M (1980) Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77:83-103.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306.
- Zawadzki CH, Renesto E and Bini LM (1999) Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the

Rio Iguazu basin (Brazil). *Revue Suisse de Zoologie* 106:91-105.

Zawadzki CH, Machado MFPS and Renesto E (2001) Differential expression for tissue-specific isozymes in three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29:911-922.

ARTIGO III

**POLIMORFISMO INTRA E INTERPOPULACIONAL DE
HETEROCROMATINA EM *Hypostomus strigaticeps* (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)**

*Este artigo será submetido à publicação na revista Genética.

**POLIMORFISMO INTRA E INTERPOPULACIONAL DE HETEROCROMATINA
EM *Hypostomus strigaticeps* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE,
HYPOSTOMINAE)**

Marceléia Rubert¹, Fernando Camargo Jerep² & Lucia Giuliano-Caetano^{1,*}

¹ Departamento de Biologia Geral; ² Departamento de Biologia Animal e Vegetal, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-970 Londrina, PR, Brasil; *Author for correspondence: (E-mail: giuliano@uel.br)

Palavras-chave: heterocromatina, Hypostominae, *Hypostomus strigaticeps*, polimorfismo.

Resumo

As heterocromatinas são regiões altamente repetitivas muito condensadas por isso não são transcritas. Alguns grupos de peixes como *Hypostomus* apresentam grande variabilidade com relação à distribuição da heterocromatina, tendo relação com a evolução microestrutural. Foram analisados exemplares de *Hypostomus strigaticeps* coletados no ribeirão Três Bocas e rio Jacutinga, afluentes do rio Tibagi/PR, submetidos ao estudo citogenético por meio da coloração convencional (Giemsa) e bandamento-C. Na análise por Giemsa foi observado $2n = 72$, com fórmula cariotípica: $10m+16sm+46st-a$ para todos os exemplares. A heterocromatina está distribuída na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos, com a presença de blocos grandes variando de quatro a seis cromossomos (st-a) no braço longo, sendo observado, aos pares ou sem seu homólogo, apresentando um polimorfismo intra e inter-populacional com relação ao padrão de distribuição da heterocromatina. Os resultados obtidos reforçam a importância dos estudos citogenéticos para uma melhor compreensão da evolução tanto do gênero *Hypostomus* quanto da família Loricariidae.

Abbreviations: **NF:** número fundamental, **m:** metacêntricos, **sm:** submetacêntricos, **st-a:** subtelo-cêntricos-acrocêntricos, **RONs:** regiões organizadoras de nucléolo.

Introdução

As heterocromatinas são regiões do DNA que possuem seqüências altamente repetitivas, que estão inativas durante o desenvolvimento e que podem permanecer inativas por muitas divisões celulares. Estão geralmente associadas às RONS, centrômeros, telômeros e às vezes em regiões intersticiais de alguns cromossomos (Morelli, 1998).

Os primeiros estudos realizados revelavam que estas regiões não desempenhavam nenhuma função, mas trabalhos posteriores demonstraram que a heterocromatina é responsável por vários efeitos, como por exemplo, o pareamento ectópico, ou o comportamento do centrômero durante a divisão celular (John, 1988).

A técnica para evidenciar as regiões heterocromáticas dos cromossomos utiliza o tratamento com ácido seguido por uma de solução alcalina, sendo posteriormente tratada com solução salina (Sumner, 1972). O que ocorre na verdade é que a região eucromática é uma região menos condensada, ao contrário da heterocromatina, então ambas reagem de maneira diferente ao tratamento, proporcionando a “remoção” da eucromatina e o bandamento da região heterocromática (Jack *et al.*, 1985). Sumner (1990) acredita que a presença de proteínas não histônicas possa ser a responsável pela proteção da heterocromatina durante o ataque dos reagentes, tornando a extração do DNA heterocromático mais lento do que o eucromático.

A heterocromatina geralmente está distribuída na mesma posição em cada cromossomo de um determinado cariótipo. Esta distribuição equilocal se deve a função desempenhada pela heterocromatina no comportamento dos cromossomos durante a divisão celular (Guerra, 1988).

Os primeiros estudos de regiões heterocromáticas em peixes que utilizou a técnica de banda-C foram com duas espécies de Salmonidae, realizado por Abe & Muramoto (1974). A técnica também pode ser utilizada para identificação de cromossomos sexuais e

polimorfismos cromossômicos (Almeida-Toledo, 1994) os quais, podem ser muito importantes para a diferenciação de espécies (Oliveira *et al.*, 1992).

Neste presente trabalho foi analisado o padrão de distribuição da heterocromatina em *H. strigaticeps* provenientes de dois afluentes do rio Tibagi/PR.

Material e Métodos

Foram analisados citogeneticamente 62 exemplares de *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1908) provenientes do: ribeirão Três Bocas e rio Jacutinga, ambos afluentes do rio Tibagi/PR.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células renais de acordo com a técnica de Bertollo, Takahashi & Moreira-Filho (1978). Os cromossomos foram classificados de acordo com a relação dos braços segundo Levan, Fredga & Sandberg (1964), com modificações. Para determinação do padrão de distribuição da heterocromatina, foi utilizado bandamento C (Sumner, 1972).

Resultados

Os estudos citogenéticos realizados nos exemplares de *H. strigaticeps* revelaram número diplóide de 72 cromossomos, com fórmula cariotípica: $10m+16sm+46st-a$ e $NF = 98$, para todas as populações analisadas (Fig. 1).

Quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina foi observado um polimorfismo intra e inter-populacional. Todos os exemplares apresentaram em comum a presença de heterocromatina na região pericentromérica de um par metacêntrico, correspondente ao par 3 do complemento (Fig. 2a e b), sendo observada uma variação de quatro a oito cromossomos marcados na região terminal no braço longo, com blocos grandes, correspondentes ao par 18,

28, 29 e 31, podendo apresentar ou não seus homólogos marcados (Fig. 2a e b). Para alguns exemplares foi observada uma banda intersticial no cromossomo 33, podendo apresentar ou não seu homólogo com a banda heterocromática, evidenciada nas populações do ribeirão Três Bocas e rio Jacutinga; nas regiões teloméricas de um cromossomo da posição 4 foi observado um heteromorfismo de tamanho com relação ao seu homólogo, nas duas populações, e no cromossomo de posição 13 a marcação é bitelomérica e só ocorreu na população do Três Bocas (Fig. 2a).

Discussão

O polimorfismo apresentado neste trabalho foi observado nas duas populações analisadas, e estes apresentaram uma variabilidade tanto inter-individual quanto inter-populacional. Foi observado que o par 3, com heterocromatina na região pericentromérica, é conservado em todos os indivíduos analisados e aparece também em outras espécies de *Hypostomus* como: *H. paulinus*, *H. nigromaculatus* e *H. ancistroides* (Rubert, 2007), sugerindo que estes cromossomos teriam a mesma origem e estariam conservados dentro deste grupo.

O cromossomo com bloco grande correspondente ao par 18 do complemento em *H. strigaticeps*, foi também observado em outras espécies do gênero como: *H. affinis* (Kavalco et al, 2004) correspondente ao par 21 do complemento; em *H. cochliodon* esta banda está localizada no par 20, com heteromorfismo de tamanho nos machos (Cereali, 2006) e *H. ancistroides* localizado no par 26 (Rubert, 2007), no entanto em *H. strigaticeps* esta heterocromatina é rica em AT e nas demais espécies ela é CMA₃⁺ (Rubert, 2007).

Este polimorfismo inter-individual com relação à distribuição da heterocromatina entre os cromossomos homólogos não é um caso isolado sendo observado também em duas

populações de *Astyanax scabripinnis* coletados nos rios: Marrecas (Londrina) e Centenário (Maringá) por Mantovani *et al.* (2000).

De acordo com Ohno (1970) a instabilidade da heterocromatina pode ser resultado de uma duplicação do segmento heterocromático, por um crossing-over desigual ou uma translocação não-recíproca, dando origem então a dois tipos de gametas com diferentes quantidades de cromatina.

Outra hipótese é o fenômeno de distribuição equilocal da banda-C, descrita por Schweizer & Loidl (1987) onde a troca entre segmentos cromossômicos é de acordo com a proximidade destes, podendo ocorrer no núcleo mitótico, pela polarização de Rabl, que se inicia durante a anáfase, onde os telômeros ocupam o mesmo espaço e esta organização permanece até a próxima interfase; ou segundo os mesmos autores, pela polarização de bouquet, no núcleo meiótico, onde estes ocupam o mesmo domínio no núcleo, possibilitando em ambas as situações a troca de segmentos entre cromossomos homólogos e/ou não-homólogos.

De acordo com Guerra (2000) a equidistribuição da heterocromatina somente é facilitada por estes tipos de organização e não determinada pelas mesmas; para o autor a similaridade funcional ou estrutural podem tornar cada região cromossômica receptiva ou não à amplificação ou recepção de alguma sequência de DNA.

Dentro do núcleo interfásico os telômeros desempenham um papel de organização dos cromossomos, pois estes se encontram na maioria das espécies, presos por determinadas regiões da cromatina à membrana nuclear e não soltos dentro do núcleo, este contato com a membrana é promovido pelos mesmos; foi observado que o pareamento entre os homólogos durante a meiose é iniciado nas extremidades que estão ligadas à membrana nuclear, ou seja, os telômeros também apresentam uma grande importância quanto ao pareamento durante a divisão celular (Guerra, 1988).

Como observado neste trabalho o polimorfismo ocorre entre os cromossomos que apresentam heterocromatina localizada na região terminal, levando em consideração o papel funcional dos telômeros, exposto acima, provavelmente sua disposição no núcleo interfásico facilita a troca entre os homólogos, não necessariamente de forma recíproca, que transmitido aos gametas, fixa a alteração.

A diferença na distribuição de heterocromatina observada neste trabalho e sua localização nas regiões teloméricas sugerem que pode ter ocorrido um mecanismo de dispersão por sucessivas translocações. Segundo Souza *et al.* (2001) a presença de heterocromatina nas regiões teloméricas e centroméricas facilita sua troca com outros cromossomos não-homólogos, e podendo ocorrer posteriormente sua amplificação.

A diversificação do padrão de distribuição da heterocromatina é possibilitada pela recombinação meiótica, ou seja, pelo crossing-over entre diferentes segmentos de cromossomos C-bandados (Kayano, 1972 apud Schweizer & Loidl, 1987).

Não pode ser descartada também a hipótese da origem ocasional da heterocromatina por replicação espontânea saltatória de qualquer seqüência de DNA (Schweizer & Loidl, 1987).

Quando observa-se o cromossomo do par 4, o qual apresenta uma amplificação da heterocromatina em um dos cromossomos, e o 13, que é bitelomérico, que só ocorre em um exemplar do ribeirão Três Bocas, podemos sugerir que são eventos recente.

Existem indivíduos que apresentam blocos de heterocromatina em homozigose (presente nos homólogos) e indivíduos que apresentam blocos em heterozigose (presente apenas em um dos cromossomos) ou ausente. Estes indivíduos heterozigotos, que apresentam variabilidade de heterocromatina, foram se cruzando ao longo do tempo, dando origem aos indivíduos homozigotos. Observando a Figura 2a pode ser verificado que a população do ribeirão Três Bocas apresenta muitos cromossomos em homozigose e que na Figura 2b, que representam indivíduos do rio Jacutinga, talvez esse processo seja ainda inicial devido à presença em

maior quantidade de heterozigose e talvez seja mais recente que do ribeirão Três Bocas. Por outro lado, o par 33 encontra-se mais difundido no rio Jacutinga que na população do ribeirão Três Bocas, sugerindo que a sua origem possa ter ocorrido em indivíduos da população do rio Jacutinga e estão sendo dispersos para outras populações, já que esta apresenta um maior número em homozigose. Quanto à localização da heterocromatina esta se encontra na região intersticial deste par, diferindo da condição mais frequente, que é terminal.

O gênero *Hypostomus* apresenta uma grande variabilidade em relação à distribuição da heterocromatina e dentre as espécies já descritas na literatura, *Hypostomus strigaticeps* é o que apresentou uma maior variabilidade, indicando que esta espécie está ainda em processo de diferenciação. E os dados obtidos corroboram com Artoni & Bertollo (1999), que sugerem que o grupo apresenta uma evolução cromossômica microestrutural divergente.

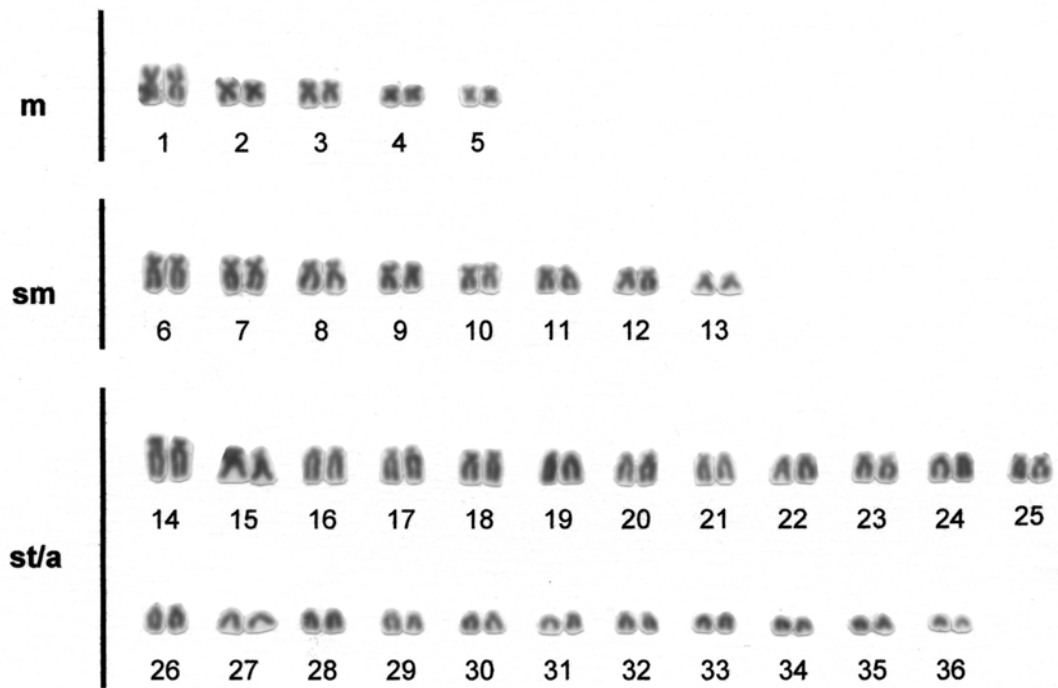


Figura 1. Cariótipo de *H. strigaticeps* corados por Giemsa.

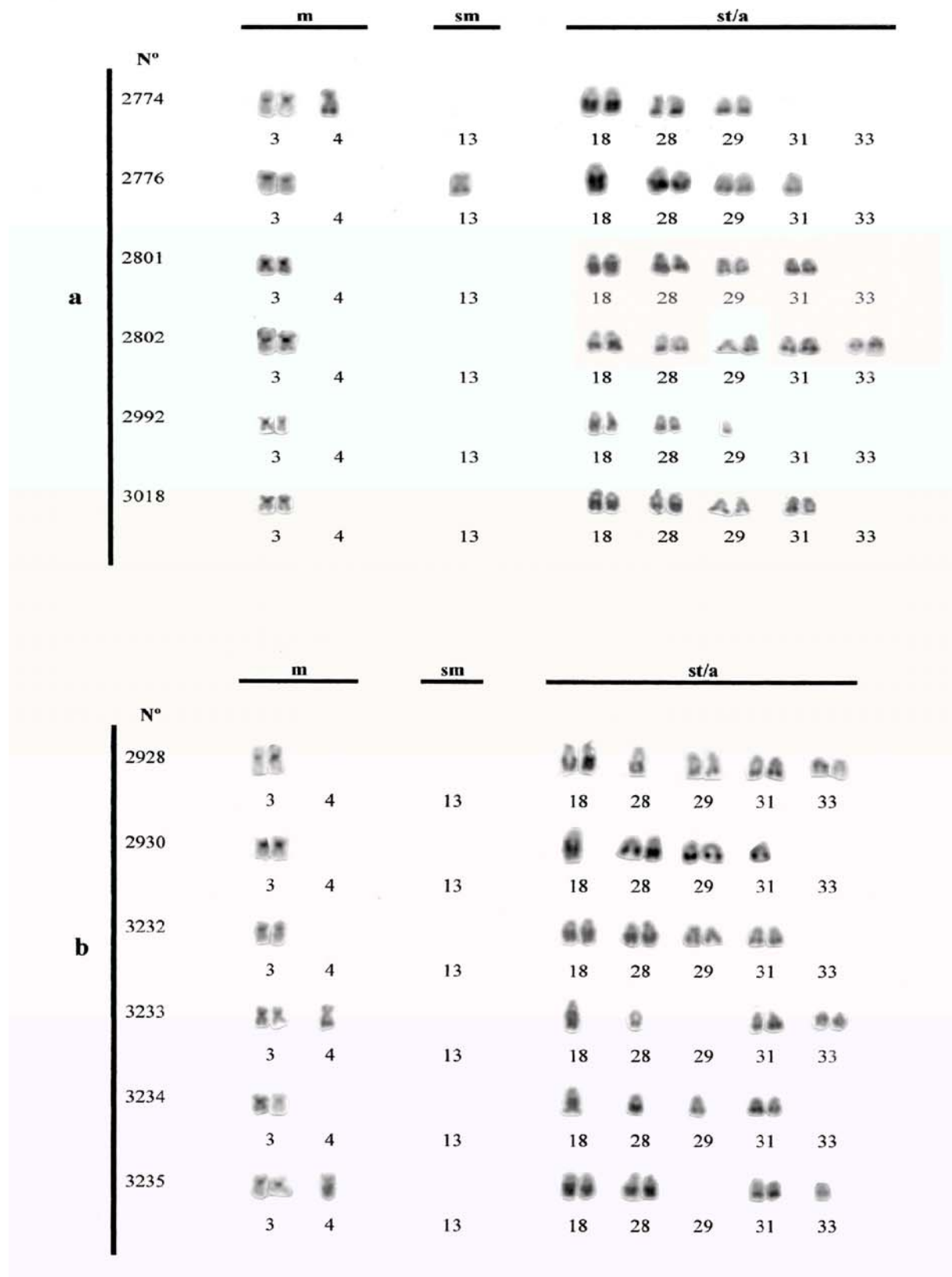


Figura 2. Polimorfismo intra e inter-populacional do padrão de distribuição da heterocromatina. a) população ribeirão Três Bocas; b) população rio Jacutinga.

Referências Bibliográficas

- Abe, S. & J. Muramoto, 1974. Differential staining of chromosomes of two salmonid species, *Salvelinus leucomaenis* (Pallis) and *Salvelinus malma* (Walbaum). Proc. Japan. Acad. 501: 507-511,
- Almeida-Toledo, L. F. 1994. Técnicas de bandeamento na análise citogenética de peixes. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. 5, Botucatu. Programas e resumos. Botucatu: Instituto de Biociências - Unesp,1994. p.74-77.
- Artoni, R.F. & L.A.C. Bertollo, 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). Genetica 106: 209-214.
- Bertollo, L.A.C., C.S. Takahashi & O. Moreira-Filho, 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). Braz. J. Genet. I: 103-120.
- Cereali, S. S. Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriforme) do Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 99p. 2006.
- Guerra, M. Introdução à Citogenética Geral. Ed Guanabara S.A. Rio de Janeiro, RJ. 1988. 133p.
- Guerra, M, 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. Genetics and Molecular Biology 23 (4): 1029-1041.

- Jack, E. M., C. J. Harrison, T. D. Allen & R. Harris, 1985. The structural basis for c-banding: a scanning electron microscopy study. *Chromosoma* 91: 363-368.
- John, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R. S. (ED.) *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. Cambridge: Cambridge University Press. 1988. Cap. 1, p.1-128.
- Kavalco, K.F., R. Pazza, L.A.C. Bertollo & O. Moreira-Filho, 2004. Gene mapping of 5 S rDNA in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet. Genome Res* 106: 107–110.
- Levan, A., K. Fredga & A.A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Mantovani, M., L.D.S. Abel, C.A. Mestriner & O. Moreira-Filho, 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109: 161-168.
- Morelli, S. Citogenética evolutiva em espécies do gênero *Hoplias*, grupo *lacerdae*. Macroestrutura cariotípica, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo. 1998. 76p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
- Ohno, S, 1970. The enormous diversity in genomes sizes of fish as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. *Trans Am Fish Soc* 99: 120-130.

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S. Análise da distribuição da heterocromatina constitutiva em *Salminus maxillosus* (dourado) e *Salminus hilarii* (tabarana). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. 4, 1992, Rio de Janeiro. Programas e Resumos. Rio de Janeiro: Departamento de Ciências Biológicas, 1992. p.27.

Souza, I. L., J. Galián, P. De La Rúa, L.A.C. Bertollo & O. Moreira-Filho, 2001. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia* 66: 85-91.

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

Sumner, A. T. Chromosome banding. 1 ed. London: Academic Division of Unwin Hyman Ltd. 40-58, 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. As espécies analisadas apresentam número diplóide que variou de 68 a 76 cromossomos.
2. Quanto à fórmula cariotípica foi observado que quanto menor o número diplóide maior a quantidade de cromossomos m-sm, e vice-versa.
3. Há variação inter populacional de NF com relação a *H. ancistroides*, *H. strigaticeps* e *H. nigromaculatus* ;
4. Com exceção de *H. paulinus*, todas as espécies apresentaram RONS múltiplas. Os resultados obtidos com CMA₃, mostraram marcações correspondentes aos cromossomos AgRONS, em *H. paulinus* foi observado um par de cromossomos com heterocromatina segmentada; em *H. strigaticeps* na região centromérica da maioria dos cromossomos e *H. nigromaculatus* (ribeirão Três Bocas e Apertados) na região centromérica de dois pares m-sm.
5. *H. paulinus* e *H. regani* são caracterizadas pelo padrão de heterocromatina;
6. *H. strigaticeps* apresentou uma maior variabilidade de heterocromatina, sugerindo que esta organização está ainda em diferenciação.
7. Os dados citogenéticos observados para as diferentes populações de *H. nigromaculatus* (rio Mogi Guaçu-localidade tipo e ribeirão Três Bocas/Apertados) sugerem que se tratam de espécies diferentes;
8. A localização dos sítios de DNAr e a distribuição da heterocromatina possuem um importante papel na diversificação cromossômica do gênero *Hypostomus*.