



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSIVANDA SANTOS ALMEIDA

**“ESTUDO CITOGENÉTICO EM DUAS ESPÉCIES DA
FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE (CALLICHTHYINAE,
SILURIFORMES) DA BACIA DO RIO DE CONTAS/BAHIA.”**

Londrina
2011

JOSIVANDA SANTOS ALMEIDA

**“ESTUDO CITOGENÉTICO EM DUAS ESPÉCIES DA
FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE (CALLICHTHYINAE,
SILURIFORMES) DA BACIA DO RIO DE CONTAS/BAHIA.”**

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.

Orientadora: Dr. Ana Lúcia Dias

Co-Orientador: Paulo Roberto Antunes de Mello
Affonso

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A447e Almeida, Josivanda Santos.

Estudo citogenético em duas espécies da família Callichthyidae (Callichthyinae, Siluriformes) da bacia do Rio de Contas/Bahia / Josivanda Santos Almeida. – Londrina, 2011.
78 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Co-Orientador: Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Ictiologia – Teses. 3. Bagre (Peixes) – Teses. 4. Callichthyidae – Teses. I. Dias, Ana Lúcia. II. Affonso, Paulo Roberto Antunes de Mello. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 576.312.32:579.551.4

JOSIVANDA SANTOS ALMEIDA

**“ESTUDO CITOGENÉTICO EM DUAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
CALLICHTHYIDAE (CALLICHTHYINAE, SILURIFORMES) DA
BACIA DO RIO DE CONTAS/BAHIA.”**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari Universidade
UEPG – Ponta Grossa – PR

Profª. Dra. Lucia Giuliano Caetano Universidade
UEL – Londrina – PR

Profª. Dra. Ana Lúcia Dias
UEL – Londrina – PR

Londrina, 09 de fevereiro de 2011

DEDICATÓRIA

À Deus, meus pais, Charles
e demais familiares!

Minha força vem de vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu Porto Seguro diante das dificuldades encontradas e por me guiar na concretização desse sonho.

À minha orientadora Ana Lúcia Dias por ter aceitado me orientar e por sua colaboração durante o mestrado.

Agradeço também ao meu co-orientador Paulo Roberto de Mello Affonso, pelas muitas sugestões no meu trabalho, por todo apoio, por acreditar em mim, por se empenhar em conseguir uma bolsa e também pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, ao prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari e à prof^a. Dr^a Lucia Giuliano-Caetano, pelas sugestões neste trabalho. Muito obrigada.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e apoio no andamento das pesquisas. E à FAPESB, que me concedeu a bolsa.

À Universidade Estadual de Londrina e o Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, infraestrutura necessária para a realização dos experimentos.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, também pela estrutura e apoio essenciais para o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

À Sueli, secretária da pós-graduação da UEL, por ser muito prestativa. Aos técnicos Dário e Melissa pela ajuda.

À professora Dra Renata da Rosa pelas contribuições durante meu exame de qualificação.

Aos professores Sérgio Siqueira e Marluce Barreto, por acreditarem e me encorajarem a seguir esse caminho, mesmo sem bolsa. Obrigada

Aos colegas do laboratório de citogenética da UEL (Marce, Natalia, Angelica de Paula, Angélica Rossoti, Larissa pires, Larissa Lacerda, Vanessa, Tatiana, Renata, Ana Cláudia, Laura, Vivian e Juceli). Obrigada a todos pela ajuda e contribuições, e também pela valiosa oportunidade de conviver com vocês.

Aos colegas do laboratório de citogenética da UESB (Dra. Ana Maria, Dr. Paulo Carneiro, Dr. Juvenal Cordeiro, Dra Caroline Garcia, Dra. Ana Karina, Aline, Jamille, Vítor, Mave, Isabel, Milena, Roque, Ozzy, Malu, Léo, Cleberson). Pelas contribuições e apoio tão essenciais para o desenvolvimento dessa pesquisa, pelas idas à Panqueca do Cilion depois do expediente e pelas conversas descontraídas no lab.

Às colegas de curso que estiveram mais próximas: Ediane, Vanessa e Vick...

À Débora Diniz, Marceléia Rubert, Renata da Rosa e Angélica Rossoti, por colaborarem com a realização da técnica de FISH. Ao Professor Paulo Carneiro, por ter conseguido a bolsa...

Ao amigo Fábio, o japonês poio, um dos poucos amigos de verdade que fiz nesses dois anos. Nosso amor é de “mula”, mas é verdadeiro. Obrigada querido!

Em especial à amiga Jamille por anos de amizade, à qual se intensificou quando passamos a dividir uma quitinete. Você é uma pessoa rara e maravilhosa. Obrigada inclusive, pelo apoio financeiro. Sem sua ajuda jamais conseguiria. Obrigada também por compartilhar as alegrias e tristezas, pelas resenhas, você é hilária, (especialmente em momentos de estresse).

Ao meu namorado Charles por ter vindo para o Sul por minha causa, pelo amor, a compreensão e o respeito a mim conferido nos dias em que estou longe. Obrigada também pelos conselhos, por sempre acreditar no meu potencial. Amo você!

Finalmente a minha família que é minha vida. Agradeço pelo apoio dedicado e incondicional dos meus pais Jorge e Alice, meus irmãos Joscilda, Josinei e Ivanei, aos meus cunhados Robério e Daiane e meus pequenos Bruno e Danilo, por fazerem parte da

minha vida, minimizando os obstáculos, fazendo valer a pena cada esforço. Ao meu tio Cláudio por me acolher em sua casa. Obrigada, inclusive pelo apoio financeiro, sei que não é fácil, mas sempre estão dispostos a me ajudar. Obrigada por vocês existirem na minha vida.

Enfim, obrigada a todos vocês que tornaram esta jornada possível.

“O homem é capaz de partir e de chegar. Mas, o que o define mesmo é a estrada. Mais do que ser de chegada e de partida, o homem é um ser da estrada. É um eterno caminhante. Não resiste ao apelo do horizonte misterioso que lhe pede novos passos”.

(Arduini)

“Quanto maiores somos em humildade, tanto mais próximos estamos da grandeza.”

(Rabindranath Tagore)

"Tira força da tua fraqueza."
(Miguel de Cervantes)

ALMEIDA, Josivanda Santos. **Estudo citogenético em duas espécies da família Callichthyidae (Callichthyinae, Siluriformes) da bacia do Rio de Contas/Bahia**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A família Callichthyidae está incluída na ordem Siluriformes, apresenta ampla distribuição pela região neotropical e é composta por 194 espécies e oito gêneros, distribuídos em duas subfamílias, Corydoradinae e Callichthyinae. Visando ampliar a informação citogenética da ictiofauna das bacias hidrográficas do Atlântico leste, o presente trabalho foi realizado em *Callichthys callichthys* e *Hoplosternum littorale*, da subfamília Callichthyinae, coletadas em afluentes da bacia do rio de Contas/BA e submetidas à estudos citogenéticos convencionais e moleculares. Em *C. callichthys*, as duas populações analisadas apresentaram $2n=54$ ($16m+24sm+6st+8a$) com a ocorrência de um cromossomo supranumerário de tamanho grande, que foi detectado em todos os exemplares da população do rio das Pedras e em 47,06% dos indivíduos da lagoa temporária. Múltiplos sítios e acentuado polimorfismo de RONS, $CMA_3^+/DAPI^-$, DNAr 18S e 5S com diferenças quanto ao número, posição e tipo cromossômico também foram observados em ambas as populações sendo que, no geral, a da lagoa temporária evidenciou menor variação interindividual e uma frequência maior de marcações nos cromossomos acrocêntricos. Regiões DAPI positivas foram detectadas no centrômero de alguns cromossomos em ambas as populações e a heterocromatina foi observada de modo discreto em regiões centroméricas de quase todos os cromossomos, indicando que algumas destas regiões heterocromáticas, provavelmente, sejam ricas em bases AT. *Hoplosternum littorale* apresentou $2n=60$ ($6m+ 2sm+ 52a$ e $NF=68$), RONS simples e heteromórficas na região terminal do braço curto do par 6, coincidente com a constrição secundária. A técnica de *double*-FISH evidenciou sítios de DNAr 18S em posição terminal do braço curto do par 6, confirmando as RONS e o heteromorfismo estrutural de tamanho, e o DNAr 5S foi localizado na porção terminal do braço curto de dois pares de cromossomos acrocêntricos, não sintênicos aos portadores das RONS. A heterocromatina mostrou-se distribuída em regiões cromossômicas centroméricas, intersticiais e terminais. Quatro cromossomos apresentaram-se positivos para o CMA_3 , sendo um par coincidente com as RONS e o outro com marcação intersticial no braço longo, provavelmente relacionado à heterocromatina. Os dados aqui apresentados para *C. callichthys*, confirmam uma grande variabilidade cromossômica nesta espécie que, combinados com a existência de problemas taxonômicos, reforçam a sugestão de um complexo de espécies para o grupo. Em contraste, os resultados apresentados para *H. littorale* confirmam uma grande semelhança cariotípica entre todas as populações já estudadas, representando uma espécie com baixa plasticidade cariotípica.

Palavras-chave: *Callichthys callichthys*. Cromossomos B. Conservação cariotípica. FISH. Heterogeneidade. *Hoplosternum littorale*

ALMEIDA, Josivanda Santos. **Cytogenetic studies in two species of the family Callichthyidae (Callichthyinae, Siluriformes) basin Rio de Contas/Bahia.** 2011. 78 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The family Callichthyidae is included in the order Siluriformes, is widely distributed by the Neotropical region and comprises 194 species and eight genera, distributed in two subfamilies, Corydoradinae and Callichthyinae. Aiming to expand the cytogenetics information of the ichthyofauna of the eastern Atlantic basins, this work was done in *Callichthys callichthys* and *Hoplosternum littorale* subfamily Callichthyinae collected in tributaries of the river basin Contas/BA and subjected to conventional and molecular cytogenetic studies. In *C. callichthys*, the two populations analyzed had $2n = 54$ (16m+6sm +24st +8a) and the occurrence of a supernumerary chromosome of large size, which was detected in all samples of the population of Pedras River and 47.06% of individuals from the temporary pond. Multiple sites, and accentuated polymorphism of NORs, CMA₃⁺/DAPI⁻, 18S rDNA and 5S with differences in the number, location and type of chromosomes were also observed in both populations and that, overall, the pond temporary showed less interindividual variation and a higher frequency of markers on chromosomes acrocentric. DAPI positive regions were detected in the centromeres of some chromosomes in both populations and the heterochromatin was observed in a discrete way in the centromeres of almost all chromosomes, indicating that some of these heterochromatic regions probably are rich in AT bases. *Hoplosternum littorale* exhibited $2n=60$ (6m + 2SM + 52nd and NF = 68), simple and heteromorphic NORs in the terminal region of the short arm of pair 6, coincident with the constriction metastasis. The procedure of double-FISH showed 18S rDNA sites in place of the short arm of pair 6, confirming the structural heteromorphism of NORs and the size, and 5S rDNA was located in the terminal portion of the short arm of two pairs of acrocentric chromosomes, not syntenic to bearing of NORs. The technique of double-FISH showed 18S rDNA sites in place of the short arm of pair 6, confirming the structural heteromorphism of NORs and the size, and 5S rDNA was located in the terminal portion of the short arm of two pairs of acrocentric chromosomes, not syntenic to bearing of NORs. The heterochromatin was shown to be distributed in chromosomal regions centromeric, interstitial and terminal. Four chromosomes were positive for CMA₃, with a matching pair with NORs and the other with interstitial marking on the long arm, probably related to heterochromatin. The data presented here for *C. callichthys* confirm a large chromosomal variability in this species, which combined with the existence of taxonomic problems, reinforce the suggestion of a species complex for the group. In contrast, the results for *H. littorale* confirm a great karyotypic similarity among all the populations already studied, representing a species with low plasticity karyotype.

Keywords: B chromosomes. *Callichthys callichthys*. FISH. Heterogeneity. *Hoplosternum littorale*. Karyotypic conservation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A) Mapa representando a divisão hidrográfica nacional. B) Mapa da região hidrográfica do Atlântico Leste e suas principais bacias. Fonte: Agência Nacional de Águas- ANA, (2003) e Ministério do Meio Ambiente – MMA, (2006)..... 24

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Exemplar de: *Callichthys callichthys* (a). Locais de coleta: Mapa das bacias do Nordeste: IV- Bacia do rio de Contas (b) rio das pedras e lagoa temporária (c). Os números romanos indicam as Regiões de Planejamento e Gestão de Águas (RPGAs) da Bahia, elaborado pelo Instituto de Gestão de Águas e Climas 47
- Figura 2** – Cariótipo de *Callichthys callichthys*, evidenciando o cromossomo B (a); Representação dos diferentes tipos cromossômicos com constrição secundária nas populações do rio das Pedras e da lagoa temporária (b-h)..... 48
- Figura 3** – Cromossomos de *Callichthys callichthys* representando as marcações Ag-RONs e CMA₃⁺/DAPI⁻ e sítios de DNAr 18S nas populações do rio das Pedras (a) e da lagoa temporária (b) 49
- Figura 4** – Metáfase de *C. callichthys* após tratamento com fluorocromo DAPI. Os asteriscos evidenciam os cromossomos com marcação DAPI positivo em algumas regiões centroméricas 49
- Figura 5** – Metáfase de *C. callichthys*, da lagoa temporária, após a hibridação *in situ* com fluorescência (FISH), com sondas de DNAr 18S e 5S (double FISH). No detalhe, os cromossomos com os sítios ribossômicos 50
- Figura 6** – Cariótipo de *C. callichthys* com banda C, evidenciando o cromossomo B eucromático (a). Cromossomos mostrando a constrição secundária após bandamento C (b-e)..... 51

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Exemplar de: *Hoplosternum littorale* (a), Locais de coleta: Mapa das bacias do Nordeste: IV- Bacia do rio de Contas (b) lagoa temporária(c). Os números romanos indicam as Regiões de Planejamento e Gestão de Águas (RPGAs) da Bahia, elaborado pelo Instituto de Gestão de Águas e Climas 68
- Figura 2** – Cariótipos de *H. littorale* com coloração convencional (a) e com banda C (b). Em destaque o par cromossômico portador da constrição secundária, AgRON, CMA₃ e sítios de DNAr 18S 69
- Figura 3** – Metáfase de *H. littorale* após a hibridação *in situ* com fluorescência (FISH), com sondas de DNAr 18S e 5S (double FISH). No detalhe, os cromossomos com os cístrons ribossômicos 70
- Figura 4** – Metáfases de *H. littorale* após tratamento com fluorocromos CMA₃ e DAPI. Em (a) cromossomos com sítios CMA₃; em (b) sobreposição de CMA₃/DAPI 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies da família Callichthyidae 18

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Frequência dos cromossomos supranumerários em células somáticas de *Callichthys callichthys* da Bacia do Rio de Contas-BA..... 45

Tabela 2 – Dados citogenéticos na espécie *Callichthys callichthys*..... 46

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies do gênero *Hoplosternum*..... 67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE.....	14
1.2 CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE	15
1.3 A BACIA DO RIO DE CONTAS	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 1	30
CROMOSSOMOS B E ACENTUADO POLIMORFISMO DE DNAR EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE TROPICAL, <i>CALLICHTHYS CALLICHTHYS</i> (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE)	31
RESUMO	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 2	58
HOMOGENEIDADE CARIOTÍPICA EM <i>HOPLOSTERNUM LITTORALE</i> (HANCOCK, 1828) (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE), UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL DE AMPLA DISTRIBUIÇÃO	59
RESUMO	59
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS	61
RESULTADOS	62
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE.

Entre os Ostariophysi, os Siluriformes representam uma das mais diversas ordens de peixes, compreendendo 36 famílias, 478 gêneros e 3093 espécies, sendo que destas, aproximadamente 1727 ocorrem nas Américas (REIS, 2003; NELSON, 2006; FERRARIS Jr, 2007). Eles são encontrados em água doce, marinha ou salobra com a maioria das espécies ocorrendo no Novo Mundo (MENEZES *et al.*, 2007).

A família Callichthyidae, objeto do presente estudo, é amplamente distribuída nos rios das principais bacias hidrográficas da América do Sul, desde a Venezuela até Argentina, incluindo as drenagens costeiras atlânticas e também rios transandinos da Colômbia e Panamá. Como em muitos outros grupos de peixes, a diversidade de espécies é maior na Amazônia e no Escudo das Guianas (MENEZES *et al.*, 2007).

Os peixes desta família são conhecidos como bagres blindados devido à presença de duas séries longitudinais de placas em cada lado do corpo que lhes conferem uma armadura óssea, característica que os torna muito distintos de todos os outros bagres. A linha lateral reduzida, ausência do osso lacrimal-anterorbital, a série infra-orbital reduzida a apenas dois ossos e ausência dos dentes pré-maxilares nos adultos são também características externas exclusivas, úteis para o reconhecimento do grupo. O tamanho do corpo varia de 20 mm (pequenas espécies do gênero *Corydoras*) até 160 mm de comprimento padrão (espécies dos gêneros *Callichthys* e *Hoplosternum*) (REIS, 2003, MENEZES *et al.*, 2007).

As espécies deste grupo ocupam uma variedade de habitats, desde pequenos riachos de águas rápidas e oxigenadas até rios de grande porte, incluindo também poças e locais pantanosos, onde o oxigênio pode ser praticamente ausente (REIS, 1998). Todos os Callichthyidae usam o intestino como um órgão respiratório acessório, sendo que o ar coletado na superfície da água é engolido, passa para o intestino e acaba sendo expulso através do ânus (REIS, 2003; JUCÁ-CHAGAS e BOCCARDO, 2006; JUCÁ-CHAGAS, 2004). Contrariamente aos Loricariídeos, os peixes da família Callichthyidae respiram ar sob todas as condições da água. No entanto, o ar engolido tem um papel mais importante na manutenção do contrapeso hidrostático do que na respiração, contribuindo com, aproximadamente, 75% do ar necessário para a flutuabilidade (GEE e GRAHAM, 1978).

Com hábitos bentônicos, a maioria das espécies desta família se alimenta de invertebrados aquáticos como microcrustáceos e insetos, inclusive detritos vegetais (NELSON, 1994).

De acordo com Ferraris Jr. (2007), a família Callichthyidae é composta de 194 espécies e apresenta duas subfamílias: Callichthyinae (Hoedeman, 1952) e Corydoradinae (Hoedeman, 1952). A subfamília Corydoradinae é composta pelos gêneros *Aspidoras*, *Corydoras* e *Brochis*; e a Callichthyinae é formada pelos gêneros *Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis* (REIS, 2003). De acordo com a filogenia baseada em caracteres morfológicos proposta por Reis (1998), *Dianema* e *Hoplosternum* compõem um clado que tem *Megalechis* como grupo irmão. *Lepthoplosternum* é o grupo irmão de *Megalechis*, *Dianema* e *Hoplosternum*; e *Callichthys* é o gênero mais primitivo na subfamília.

Segundo Ferraris Jr. (2007), o gênero *Callichthys* possui apenas quatro espécies válidas: *C. callichthys*, *C. fabricioi*, *C. oibaensis* e *C. serralabium*. Entretanto, devido à taxonomia confusa, os espécimes são geralmente identificados como *C. callichthys*, independentemente da localidade (REIS, 1998).

O gênero *Hoplosternum* contém três espécies: *H. littorale*, *H. magdalenae* e *H. punctatum* (FERRARIS Jr., 2007). *Hoplosternum littorale*, comumente conhecido como tamboatá, consegue viver em ambientes estagnados e pobres em oxigênio como os chacos paraguaios, os llanos venezuelanos e as florestas inundadas da Amazônia (AFFONSO, 2001). Essa espécie, além de possuir um alto valor comercial em países como Guiana Francesa e Suriname, apresenta como características a fácil reprodução em ambientes confinados e a tolerância a baixos níveis de oxigênio o que torna propício seu cultivo (LUQUET et al. 1990).

1.2 CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE

Das 194 espécies descritas para a família Callichthyidae, 51 apresentam informações cromossômicas, o que representa pouco mais de $\frac{1}{4}$ do total de espécies válidas, como mostra a tabela 1.

Apesar dos poucos estudos, este grupo de peixes caracteriza-se por apresentar uma grande diversidade de números cromossômicos. Por exemplo, no gênero *Corydoras*, subfamília Corydoradinae, o número diplóide varia de $2n=40$ in *Corydoras*

nattereri (OLIVEIRA *et al.*, 1990) a $2n=134$ em *C. aeneus* (TURNER *et al.*, 1992), uma das maiores amplitudes de valores cromossômicos já encontrada para um gênero de peixes. Análises citogenéticas na subfamília Callichthyinae mostram pequena variação no número diplóide, de $2n=52$ a $2n=66$ (Tabela 1), quando comparadas à extensiva variabilidade cariotípica encontrada entre os Corydoradinae. Esta diferença entre as duas subfamílias de Callichthyidae parece estar relacionada ao número de espécies dentro de cada uma delas; enquanto o gênero *Corydoras* é o mais especioso entre os Siluriformes, os outros gêneros da família Callichthyidae têm um pequeno número de espécies (SHIMABUKURO-DIAS *et al.*, 2005).

No gênero *Callichthys*, e mais especificamente na espécie *C. callichthys*, populações de diferentes bacias da América do Sul já foram estudadas e os dados cromossômicos disponíveis evidenciam uma variação peculiar, de $2n=52$ a $2n=58$, com a ocorrência de diferentes números inclusive dentro da mesma bacia. Nessa espécie já foram identificados $2n=52$ e $2n=54$ por Porto e Feldberg (1993), $2n=56$ por Shimabukuro-Dias *et al.* (2005), Sanchez e Fenocchio (1996) e o mais frequente, $2n=58$ por Shimabukuro-Dias *et al.* (2005) e outros autores especificados na Tabela 1.

Apesar da variabilidade cariotípica observada em *C. callichthys* e nos gêneros *Corydoras*, *Aspidoras* e *Megalechis*, a espécie *Hoplosternum littorale* apresenta um número constante de 60 cromossomos distribuídos em $6m+2sm+52a$ (Tabela 1).

Segundo Porto e Feldberg (1992), essa diversidade cariotípica encontrada na família Callichthyidae está relacionada à ocorrência de rearranjos como translocações Robertsonianas e não-Robertsonianas, repetição em tandem de heterocromatina e eventos de poliploidia, favorecidos pelo tamanho e vagilidade das populações.

Na família Callichthyidae, cromossomos supranumerários já foram descritos para *Corydoras aeneus* e *Callichthys callichthys* (Tabela 1). Na primeira espécie, Oliveira *et al.* (1988) observaram até 2 microcromossomos nas populações dos rios Araquá, Corumbataí e Alambari e até 3 no rio Capivara, em São Paulo. Já *C. callichthys* apresentou de 0 a 1 elemento acessório no citótipo de $2n=52$ (PORTO e FELDBERG, 1993). No citótipo de $2n=56$, foi detectado 1 macrocromossomo extra na população de Corumbá/MT e até 8 microcromossomos na população de Marília/SP (SHIMABUKURO-DIAS *et al.*, 2005). Em uma população da Argentina, com $2n=56$, foram observados até 2 cromossomos supranumerários (SANCHEZ e FENOCCHIO, 1996) e, no citótipo de $2n=58$ em

Intanhaém/SP, foram observados até 5 supranumerários por espécime (OLIVEIRA *et al.*, 1993a).

O bandamento C nessa família tem demonstrado que há diferença na quantidade de heterocromatina entre os grupos (OLIVEIRA *et al.*, 1992). Enquanto *Callichthys*, em geral, apresenta pouca heterocromatina localizada principalmente na região centromérica, *Hoplosternum* e *Megalechis* possuem quantidade considerável, dispersas nas regiões centroméricas e/ou intersticiais dos cromossomos. Outros gêneros como *Aspidoras* e *Corydoras* apresentam grandes blocos heterocromáticos centroméricos e terminais em muitos cromossomos (Tabela 1).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) também são heterogêneas nesse grupo de peixes (ARTONI *et al.*, 2006). De acordo com os dados da tabela 1, 61,25% das populações de diferentes espécies da família apresentaram RONs simples. Contudo, RONs múltiplas são detectadas com certa frequência, perfazendo até 10 cromossomos nucleolares. Além disso, as marcações podem apresentar polimorfismos de tamanho como observado por Shimabukuro-Dias *et al.* (2004a) e Nirchio *et al.* (2006). Preferencialmente, os sítios Ag-RONs distribuem-se nas regiões terminais dos cromossomos, mas algumas raras marcações intersticiais já foram relatadas (FENOCCHIO *et al.*, 2003, SANCHEZ e FENOCCHIO, 1996).

Em Callichthyidae, os estudos com a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) ainda são escassos. Até agora, dados de FISH usando sonda de DNAr 18S estão disponíveis apenas para duas espécies do gênero *Corydoras* e *Hoplosternum littorale*. Artoni *et al.* (2006) observaram que *Corydoras ehrhardti* e *C. paleatus* (portadoras de Ag-RONs simples) exibiam, respectivamente, 2 e 3 cromossomos marcados pela FISH, e para *Hoplosternum littorale*, Pazza *et al.* (2005), usando sondas de DNAr 18S e 5S detectaram 2 e 4 cromossomos portadores destes sítios, respectivamente. Igualmente, o uso de fluorocromos CMA₃ e DAPI é pouco frequente, tendo sido realizado apenas em *Hoplosternum littorale* por Pazza *et al.* (2005), que observaram quatro cromossomos com sítios CMA₃⁺.

Desta forma, grande parte das informações citogenéticas obtidas nos diferentes gêneros de Callichthyidae consistem, muitas vezes, de dados considerados preliminares como relacionado na Tabela 1. e que necessitam de complementações através de bandamentos cromossômicos.

Além disso, comparando-se o nível de conhecimento disponível para outras regiões do Brasil, os dados citogenéticos em peixes são ainda incipientes em populações naturais de bacias no Estado da Bahia. Os estudos citogenéticos poderão, além de fornecer informações inéditas sobre a biodiversidade da ictiofauna dessas bacias, contribuir para o conhecimento da biologia, taxonomia, sistemática e evolução de espécies, que serão úteis para o planejamento de estratégias de conservação e manejo. Sendo assim, o presente estudo reuniu dados inéditos sobre padrões cromossômicos de duas espécies da subfamília Callichthyidae de bacias costeiras do Estado da Bahia.

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies da família Callichthyidae. 2n=número diplóide; B=cromossomo supranumerário; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; a=acrocêntrico; c= centromérica; t=terminal; i=intersticial; p= pericentromérica; st=subterminal

SUBFAMÍLIA/ ESPÉCIE	LOCALIDADE	2N	FÓRMULA CROMOSSÔMICA	B	Nº DE RONS	BANDA C	REFERÊNCIAS
Callichthyinae							
<i>Callichthys</i>	Itanhaém/SP	58	22m+22sm+14st	0-5	2	c	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>Callichthys</i>							
<i>C. callichthys</i>	Guarulhos/SP	58	22m+22sm+14st	---	2	c	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>C. callichthys</i>	Marchantaria/ AM	54	46m,sm+8st-a	---	3	blocos c t e i	Porto e Feldberg (1993)
<i>C. callichthys</i>	Córrego do Candirú – AM	52	44 m-sm + 8 st-a	0-1	2	----	Porto e Feldberg (1993)
<i>C. callichthys</i>	Manaus/AM	58	-----	---	2	----	Porto e Feldberg (1993)
<i>C. callichthys</i>	Argentina	56	14m+10sm+32st-a	0-2	2	c e p	Sanchez e Fenocchio,(1996)
<i>C. callichthys</i>	Marília/ SP	56	22m+16sm+18st	0-8	2	c	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>C. callichthys</i>	Pindamonhagaba/SP	58	18m+14sm+26st	---	2	c	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>C. callichthys</i>	Embu Guaçu/SP	58	18m+16sm+24st	---	2	c	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>C. callichthys</i>	Corumbá, MT	56/57	20m+16sm+20st	1	2	c	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>Corydoras</i> . sp.	R Itabapoana/RJ	60	4m+6sm+46st+4a	---	---	---	Oliveira <i>et al.</i> (1998) *
<i>Dianema urostriatum</i>	Pirassununga/SP	62	8m+4sm+4st+46a	---	2	blocos c e i	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>Hoplosternum litoralle</i>	L ago Camaleão/AM	60	4m+4sm+52st-a	---	2	----	Porto e Feldberg, (1992)
<i>H. litoralle</i>	R Orinoco/ Colômbia	60	6m+2sm+2st+50a	---	2	c, p e i	Nirchio <i>et al.</i> (2006)
<i>H. litoralle</i>	Pirassununga/ SP	60	4m+4sm+52a	---	2	blocos c e i	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>H. litoralle</i>	R Guaíba/RS	60	6m+2sm+52a	---	2	c e/ou i	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>H. litoralle</i>	Reservatório Jurumirim/ SP	60	6m+2sm+52a	----	2	c e/ou i	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>H. litoralle</i>	R Pirai/ MT	60	6m+2sm+52a	---	2	c e/ou i	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)

<i>H. litoralle</i>	Costa Sudeste do Brasil	60	6m+2sm+52a	---	2	st e i	Pazza <i>et al.</i> (2005)
<i>Hoplosternum</i> sp.	Mirassolândia/SP	60	6m+2sm+52a	---	2	blocos c e i	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>Megalechis. Personata+</i>	L. Camaleão/ AM	64	8m+12sm+44st-a	---		----	Porto e Feldberg (1992)
<i>M. personata</i>	R Itiquira/MT	62	6m+2sm+54a	---	2	c e/ou i	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
<i>M. personata</i>	Córrego Almoço/AC	62	8m+54a	---	4	c e/ou i	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
Corydoradinae							
<i>Aspidoras fuscoguttatus</i>	Monte Alto /SP	44	28m+ 12sm+ 2st	----	2	blocos c	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>A.fuscoguttatus</i>	Mirassolândia/SP	44	28m+ 12sm+ 2st	---	2	blocos c	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>Aspidoras cf. fuscoguttatus</i>	Mirassolândia/SP	46	32m+10sm+4 st	---	2	blocos c	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004a)
<i>A. poecilus</i>	R Araguaí/MG	46	30m+10sm+6st	---	2	blocos c	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004a)
<i>A. taurus</i>	R Itiquira/MG	46	30m+10sm+6st	---	2	blocos c e t	Shimabukuro Dias <i>et al.</i> (2004a)
<i>Brochis britski</i>	R Itiquira/MG	90	4m+10sm+22st+54a	---	2	blocos c	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>B. splendens</i>	R Pirai/ MG	100	18m+18sm+20st+44a	---	4	blocos c	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>Corydoras aeneus</i>	-----	132	-----	---	---	----	Scheel <i>et al.</i> (1972)*
<i>C. aeneus</i>	R Araquá/ SP	60-63	26m+26sm+8st	0-2	8	----	Oliveira <i>et al.</i> (1988)*
<i>C. aeneus</i>	R Corumbataí/ SP	60-62	26m+26sm+8st	0-2	8	----	Oliveira <i>et al.</i> (1988)*
<i>C. aeneus</i>	R Capivara/ SP	60-63	26m+26sm+8st	0-3	---	----	Oliveira <i>et al.</i> (1988)*
<i>C. aeneus</i>	R Alambari/SP	60-62	26m+26sm+8st	0-2	---	----	Oliveira <i>et al.</i> (1988)*
<i>C. aeneus</i>	Peru e Guyana	134	-----	---	---	----	Turner <i>et al.</i> (1992)*
<i>C. aeneus</i>	Belem /Pará	56	-----	---	---	----	Turner <i>et al.</i> (1992)*
<i>C. aeneus</i>	-----	60-62	-----	---	---	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998)*
<i>C. aeneus</i>	-----	60	20m+20sm+20st-a	---	---	----	Kato e Ojima, (1991)*
<i>C. agassizi</i>	-----	98	-----	---	---	----	Sheel <i>et al.</i> (1972)*
<i>C. araguensis</i>	-----	94	46m+40sm+8st	---	6	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. arcuatus</i>	R Tabatinga/ AM	46	28m+18sm	---	2	p e/ou i	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. axelrodi</i>		46	-----	---	---	----	Scheel <i>et al.</i> (1972)*
<i>C. barbatus</i>	Itanhaém/ SP	64	38m+20sm+4st+2a	---	8	blocos p e t	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. barbatus</i>	Bertioga/ SP	64	38m+20sm+4st+2a	---	8	blocos p e t	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>C. barbatus</i>	Morretes/ PR	66	38m+22sm+4st+2a	---	8	blocos p e t	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. barbatus</i>	Jaraguá do Sul/SC	66	38m+22sm+4st+2a	----	6	blocos p e t	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. barbatus</i>	-----	66	-----	---	---	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998)*
<i>C. barbatus</i>	Guaruva/ PR	66	38m+22sm+6st	---	6	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. barbatus</i>	R Betari/ SP	66	46m+40sm+8st	---	6	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)*
<i>C. bondi</i>	-----	46	-----	---	---	----	Scheel <i>et al.</i> (1972)

<i>C. britski</i>	R Pirai/MG	90	4m+10sm+22st+54a	---	4	i e t	*	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004a)
<i>C. delphax</i>	-----	84	12m+22sm+50st-a	---	---	----	----	Kato e Ojima (1991)*
<i>C. difluviatilis</i>	Araras/SP	78	6m+2sm+20st+50a	---	2	----	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. difluviatilis</i>	-----	78	-----	---	---	----	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998) *
<i>C. ehrhardti</i>	L. Dourada/PR	44	18m+26sm	---	3	blocos p	----	Artoni <i>et al.</i> (2006)
<i>C. ehrhardti</i>	Jaraguá do Sul/SC	44	18m+26sm	---	4	blocos p	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. ehrhardti</i>	R São João/SC	44	22m+22sm	---	2	----	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. elegans</i>	-----	50	-----	---	---	----	----	Scheel <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. flaveolus</i>	R Alambari/SP	58	18m+26sm+14st	---	4	blocos p e/ou i	----	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. flaveolus</i>	-----	58	-----	---	---	----	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998) *
<i>C. julii</i>	-----	92	-----	---	---	----	----	Scheel <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. macropterus</i>	Itanhaém/ SP	66	28m+14sm+16st+8a	---	6	blocos i e t	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. macropterus</i>	Peruíbe/SP	66	28m+14sm+16st+8a	---	6	blocos i e t	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. macropterus</i>	-----	68	18m+16sm+8st+14a	---	---	----	----	Oliveira, (1987)*
<i>C. melanistus</i>	-----	46	-----	---	---	----	----	Scheel <i>et al.</i> (1972)*
<i>C. melanistus</i>	-----	46	32m+14sm	---	---	----	----	Kato e Ojima (1991) *
<i>C. metae</i>	-----	92	-----	---	---	----	----	Scheel <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. metae</i>	Colômbia	92	40m+36sm+6st+10a	---	6	p e i	----	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. metae</i>	-----	92	-----	---	---	----	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998) *
<i>C. nattereri</i>	R Bonito/ RJ	40	20m+20sm	---	2	blocos p e t	----	Oliveira <i>et al.</i> (1990)
<i>C. nattereri</i>	Niterói/RJ	40	20m+20sm	---	2	----	----	Oliveira <i>et al.</i> (1988) *
<i>C. nattereri</i>	R Bonito/ RJ	40	20m+20sm	---	2	----	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. nattereri</i>	R Biguá,/SP	42	18m+24sm	---	4	blocos p, i e t	----	Oliveira <i>et al.</i> (1990)
<i>C. nattereri</i>	R Juquiá/SP	42	18m+24sm	---	4	----	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. nattereri</i>	R Tinguá/RJ	44	20m+24sm	---	2	----	----	Oliveira <i>et al.</i> (1990)
<i>C. nattereri</i>	Morretes/PR	44	18m+26sm	---	2	blocos p	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. nattereri</i>	R Marumbi /PR	44	18m+26sm	---	2	----	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. nattereri</i>	Nova Iguaçu/ RJ	44	20m+24sm	---	2	----	----	Oliveira <i>et al.</i> (1988) *
<i>C. cf. nijsseni</i>	-----	52	32m+20sm	---	2	----	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. paleatus</i>	-----	44	-----	---	---	----	----	Scheel <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. paleatus</i>	-----	44	-----	---	---	----	----	Scheel (1973) *
<i>C. paleatus</i>	São Leopoldo/RS	44	20m+24sm	---	4	blocos p	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. paleatus</i>	Curitiba/PR	44	20m+24sm	---	6	blocos p	----	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. paleatus</i>	R Grande/RS	44	22m+22sm	---	4	blocos p	----	Oliveira <i>et al.</i>

<i>C. paleatus</i>	R Guaíba/ RS	44	20m+24sm	---	4	----	(1993b) Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. paleatus</i>	L. Dourada/PR	44	18m+26sm	---	2	blocos p	Artoni <i>et al.</i> (2006)
<i>C. panda</i>	Peru	46	24m+22sm	---	2	C	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>C. prionotos</i>	R. Juquiá/SP	68	14m+12sm+14st+ 28a	---	4	blocos p e t	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. prionotos</i>	Nova Iguaçu, RJ	86	20m+28sm+20st+ 18a	---	4	blocos p e t	Oliveira <i>et al.</i> (1993b)
<i>C. pulcher</i>	-----	102	10m+14sm+42st+ 36a	---	2	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. aff. punctatus</i>	R Negro, AM	102	10m+14sm+20st+ 58a	---	2	blocos p e/ou i	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. rabauti</i>	-----	58	-----	---	---	----	Scheel <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. rabauti</i>	Peru	58	20m+22sm+10st+6a	---	2	blocos p	Oliveira <i>et al.</i> (1993a)
<i>C. reticulatus</i>	-----	74	20m+10sm+44st/a	---	---	----	Kato e Ojima (1991) *
<i>C. robinae</i>	-----	84	8m+18sm+16st+42a	---	2	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. schwartzi</i>	-----	46	-----	---	---	----	Scheel. <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. schwartzi</i>	R Negro/AM	46	32m+14sm	---	2	p e/ou i	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. schwartzi</i>	-----	46	-----	---	---	----	Shimabukuro. <i>et al.</i> (1998) *
<i>C. cf. simulatus</i>	Colômbia	62	34m+22sm+6st	---	2	blocos p e/ou i	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. sodalist</i>	-----	76	-----	---	---	----	Scheel <i>et al.</i> (1972) *
<i>C. sodalist</i>	R Negro/AM	74	16m+20sm+12st+ 26a	---	---	----	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. sodalist</i>	-----	74	16m+18sm+10st+ 30a	---	2	c, i e t	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004a)
<i>C. trilineatus</i>	R Caripi/PA	46	28m+18sm	---	1	p e/ou i	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>C. trilineatus</i>	-----	46	-----	---	---	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998) *
<i>C. undulates</i>	R Guaíba/RS	52	24m+14sm+12st+2a	---	10	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>C. zygatus</i>	-----	56	18m+20sm+10st+8a	---	2	----	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004b)
<i>Corydoras</i> sp. A	Colômbia	120	18m+30sm+24st+ 48a	---	---	----	Oliveira (1991)*
<i>Corydoras</i> sp. B	R Caripi/PA	60	38m+16sm+6st	---	2	blocos c e/ou t	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>Corydoras</i> sp. C	R Galheiro/MG	84	4m+2sm+18st+60a	---	10	blocos c e/ou t	Oliveira <i>et al.</i> (1992)
<i>Corydoras</i> sp. F	-----	52	-----	---	---	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998) *
<i>Corydoras</i> sp. G	-----	56	-----	---	---	----	Shimabukuro <i>et al.</i> (1998) *

Fonte: *Informações obtidas da base de dados disponível no site:
<http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>

1.3 A BACIA DO RIO DE CONTAS

A Região Hidrográfica do Atlântico Leste compreende os Estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe, com 69% de sua área pertencente ao Estado da Bahia, 26% em Minas Gerais, 4% em Sergipe e 1% no Espírito Santo perfazendo uma área de 386.092 km² e ocupando 4% do território brasileiro. Nessa área de estudo, a rede hidrográfica encontra-se dividida em 16 unidades hidrográficas, sendo que 12 estão total ou parcialmente no Estado da Bahia (Figura 1A e B) (MMA, 2006).

A bacia do Rio de Contas (Figura 1B) localiza-se na região centro-sul do Estado da Bahia e possui uma área total de 55.334 km², constituindo a maior bacia hidrográfica inteiramente contida no Estado, estendendo-se no sentido leste-oeste por, aproximadamente, 700 km e incluindo diversos municípios. Além disso, conecta três diferentes biomas: o Cerrado, na Chapada Diamantina (região de cabeceiras), a Caatinga em seu trecho médio e a Mata Atlântica na região inferior (SSRH, 1993; PAULA *et al.*, 2010; SEVERI *et al.*, 2010).

O rio de Contas é o principal rio dessa bacia, que nasce na Chapada Diamantina formada pela Serra do Espinhaço a aproximadamente 1.500 metros de altitude e deságua no Oceano Atlântico no município de Itacaré (14°18'S; 39°W) (SRH, 1993, CRA, 2001, COSTA, 2005).

A bacia do Rio de Contas apresenta três regiões com características fisiográficas bem diferenciadas: Alto, Médio e Baixo Contas. O Alto Contas está inserido em uma paisagem montanhosa e é o trecho compreendido do divisor de águas do rio São Francisco até, aproximadamente, as cidades de Itanhaçu e Anagé, com extensão de 183 km, onde predominam as características climáticas e fisiográficas do semi-árido baiano e vegetação de Caatinga. Nesta região localizam-se os principais tributários do rio de Contas: os rios Brumado, do Antônio e Gavião. O Médio Contas é a região que se estende da cidade de Contendas do Sincorá até Jequié, onde ocorre a transição do clima semi-árido da caatinga para o clima semi-úmido do Baixo Contas e predominância da floresta tropical característica de mata atlântica. Já o Baixo Contas é a parte da bacia que se estende da cidade de Jequié até a foz no Oceano Atlântico. À jusante da cidade de Jequié, há a transição da região semi-úmida para a úmida, onde o Contas passa a receber a contribuição de vários rios de pequeno e médio porte. Nesta região destacam-se os rios Sincorá, Jacaré e Jequezinho, tributários da margem esquerda do Contas (SRH, 1993). O rio das Pedras, um pequeno afluente, que também

deságua na margem esquerda, nasce no município de Jequié e sua nascente está localizada praticamente na fronteira da bacia do rio de Contas com a do Recôncavo Sul e deságua no baixo Contas entre as cidades de Jitaúna e Ipiaú.

Às margens da bacia do rio de Contas, assim como em outras bacias da região neotropical, observam-se pequenos corpos d'água também conhecidos como lagoas (MMA, 2006). Estas podem ser de formação temporária ou permanente e caracterizam-se por possuir grande quantidade de vegetação aquática, pequena extensão e pouca profundidade (JUNK e WELCOMME, 1990; DABÉS, 1995).

Os sistemas hídricos do extremo sul da Bahia possuem uma ictiofauna diversa e rica em endemismos e são habitados principalmente por espécies de peixes de pequeno porte (BUCKUP, 1998; MENEZES, 1998). Tais espécies dependem do material orgânico alóctone da vegetação marginal para sobreviver (SABINO e CASTRO, 1990; MAZZONI e REZENDE, 2003). Essa região tem sofrido sérios impactos e vem sendo rapidamente degradada com a expansão da pecuária extensiva e da agricultura desordenada, bem como a atividade madeireira que consumiu as madeiras nobres das florestas remanescentes de Mata Atlântica (ARAÚJO *et al.*, 1998; MMA, 2006). O impacto da remoção da vegetação original pode representar um perigo para a sobrevivência da fauna nativa. No caso dos organismos aquáticos, como os peixes, algumas espécies habitam apenas ambientes com denso sombreamento e cobertura vegetal. Além disso, os efluentes eventualmente gerados pelas atividades antrópicas não sofrem, via de regra, nenhum tipo de tratamento prévio antes de atingirem os corpos hídricos receptores (MMA, 2002, XAVIER *et al.*, 2005). Assim, faz-se necessário um vasto conhecimento da ictiofauna dessa região para que sejam tomadas medidas de conservação e recuperação das matas ciliares, proteção das margens dos rios, despoluição de ambientes aquáticos, além da interrupção da introdução de espécies exóticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente duas espécies de peixes da subfamília Callichthyinae, da bacia do rio de Contas e comparar os resultados obtidos com outras espécies e/ou populações de Callichthyidae já analisadas, inferindo sobre as tendências evolutivas do grupo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o número diplóide e fórmula cariotípica das espécies de Callichthyidae coletadas a partir de coloração convencional;
- Detectar as regiões organizadoras de nucléolos (RONS) e determinar o padrão de distribuição da heterocromatina;
- Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e AT;
- Localizar os sítios ribossômicos 18S e 5S;
- Interpretar os dados obtidos visando uma maior compreensão da evolução cariotípica do grupo em estudo.
- Comparar os resultados obtidos com outras espécies e/ou populações de Callichthyidae já analisadas, inferindo sobre as tendências evolutivas do gênero.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, E. G. (2001). Respiratory Characteristics of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). **Acta Amazônica**. v. 31, n. 2, p. 249-262.
- ARAÚJO, M.; ALGER, K.; ROCHA, R.; MESQUITA, C. A. B. (1998). **A Mata atlântica do sul da Bahia. Situação atual, ações e perspectivas. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Unesco-Programa MAB- O homem e a biosfera**. Série 5, caderno 8. São Paulo. 20 p.
- ARTONI, R. F.; TERÊNCIO, M. L.; VICARI, M. R.; MATIELLO, M. C. A.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C. (2006). Citogenética de duas espécies simpátricas de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) do Sul do Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, nº.1b.
- BRASIL. Agência Nacional de Águas (ANA). 2001. **Regiões hidrográficas do Brasil: caracterização geral e aspectos prioritários**. Brasília.
- BUCKUP, P.A. (1998). Biodiversidade dos Peixes da Mata Atlântica. *In: Base de Dados Tropical. Biodiversity Patterns of South and Southeast Atlantic Rain Forest/* BUCKUP, P.A. (ed.), <http://www.bdt.org.br/bdt/workmatasud/peixes>.
- COSTA, H. K. M. (2005). Bahia. *In: Gestão legal dos recursos hídricos dos Estados do Nordeste do Brasil /* XAVIER, Y. M. A., BEZERRA, N. F. (orgs.), Fortaleza Fundação Konrad Adenauer.
- CRA (CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS). (2001). Recursos Hídricos. *In: Avaliação da Qualidade das Águas. Relatório Técnico/Avaliação Ambiental*. Centro de Recursos Ambientais (ed.), Salvador, Brasil, p. 15-389. <http://www.cra.ba.gov.br>.
- DABÉS, M. B. G. S. (1995). Composição e descrição do zooplâncton de 5 lagoas marginais do Rio São Francisco, Pirapora, Três Marias/ Minas Gerais/ Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v, 55, n: 4, p 831-845.
- FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C. S.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C. (2003). Cytogenetic studies and correlations on Rhamidiinae relationships (Pisces, Silurioidei, Pimelodidae). **Cytologia**. v. 68(4), p 363-368.
- FERRARIS, JR., C. J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types . **Zootaxa** 1418. 628ps.
- GEE, J. H.; GRAHAM, J. B. (1978). Respiratory and hydrostatic functions of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 74, p 1-16.

- JUCÁ-CHAGAS, R. (2004). Air breathing of the neotropical fishes *Lepidosiren paradoxa*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Hoplosternum littorale* in aquatic hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139, p 49-53.
- JUCÁ-CHAGAS, R.; BOCCARDO, L. (2006). The air-breathing cycle of *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae). **Neotropical ichthyology**, v.4, n.3, p. 371-373.
- JUNK, W. J.; WELCOMME, R. L. (1990). Floodplains. In: **PATTEN, B. C. Wetlands and shallow continental waters bodies**. Academic Publishing: The Netherlands. 524 p.
- LUQUET, P.; BOUJARD, T.; PLANQUETTE, P.; MOREAU, Y.; HOSTACHE, G. (1990). The culture of *Hoplosternum littorale*: State of the art and perspectives. **Advances in Tropical Aquaculture**, p.511-516.
- MAZZONI, R.; REZENDE, C. F. (2003). Seasonal diet shift in a tetragonopterinae (Osteichthyes. Characidae) from the Ubatiba river, RJ, Brazil. **Brazilian Journal Biology**, v. 63, n.1, p. 69-74.
- MENEZES, N. A. (1998). Padrões de distribuição da biodiversidade da mata atlântica do sul e sudeste brasileiro: peixes de água doce. In: **Base de Dados Tropical (ed.). Biodiversity Patterns of South and Southeast Atlantic Rain Forest**.
<http://www.bdt.org.br/bdt/workmatasud/peixes>.
- MENEZES, N. A.; WEITZMAN S.H.; OYAKAWA, O. T.; LIMA, F.C.T.; CASTRO, R.M.C.; WEITZMAN, M.J. (2007) **Peixes de Água doce da Mata Atlântica: Lista Preliminar das Espécies e Comentários sobre a Conservação de Peixes de Água Doce Neotropicas**. São Paulo: Museu de Zoologia- Universidade de São Paulo.
- MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). (2002). **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga**. Ministério do Meio Ambiente/ Secretaria de Biodiversidade e Floresta, Brasília.
- MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). (2006). **Caderno da região hidrográfica Atlântico Leste**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos (ed.), Brasília, DF. p. 156.
- NELSON, J. S. (1994). **Fishes of the world**. United States of America, Ed. Wiley Jonh & Sons. 600p.
- NELSON, J.S. (2006). **Fishes of the World**. 4ed. John Willey & Sons, Inc., New York, 601p.

NIRCHIO, M.; PÉREZ, J.; GRANADO, A.; RON, E. (2006). Conventional karyotype, constitutive heterocromatin, and nucleolar organizer regions, in *Hoplosternum littorale* (Pisces: Callichthyidae) from Caicara del Orinoco. **Venezuela**, v. 18, n. 2, p. 113- 116.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. A.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO FILHO, S. A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, n. 3, p. 557-624.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. A.; MORI, L.; TOLEDO FILHO, S. A. (1992). Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Journal of Fish Biology**, v. 40, p. 419-431.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO FILHO, S.A. (1990). Comparative cytogenetic analysis in three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Cytologia**, v. 55, p. 21–26.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; MORI, L.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1993a). Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). **Caryologia**, v. 46, p.171-188.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; MORI, L.; TOLEDO-FILHO, S. A. (1993b). Cytogenetica and DNA content studies on armoured catfishes of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 617-629.

PAULA, F. C. F.; LACERDA, L. D.; MARINS, R. V.; AGUIAR, J. E.; OVALLE, Á. O R. C. e FILHO, C. A. T. F. (2010). Emissões naturais e antrópicas de metais e nutrientes para a bacia inferior do rio de contas, bahia. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p.70-75.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BERTOLLO, L. A. C. (2005). *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. **Caryologia**, v.58 p.339-344.

PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. (1992). Comparative cytogenetic study of the armored catfishes of the genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.15, p. 359-367.

PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E., (1993). Is *Callichthys* Linné (Siluriformes, Callichthyidae) a monotypic genus? **Acta Amazonica** v. 24, p.311–314.

REIS, R. E (1998). Anatomy and phylogenetic analysis of 343 the Neotropical Callichthyidae catfish (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.124, p. 105–168.

REIS, R. E., (2003) Family Callichthyidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C.J. (Eds.), **The Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, pp. 291–309.

SABINO, J.; CASTRO, R. C. M. (1990). Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (Sudeste do Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, v, 50, p. 23-36.

SANCHEZ, S.; FENOCCHIO, A. S., (1996). Karyotypic studies and cytotaxonomic considerations on *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes) from Argentina. **Cytologia**, v. 61, p. 247-252.

SRH (SECRETARIA DOS RECURSOS HÍDRICOS SANEAMENTO E HABITAÇÃO) (1993). **Plano Diretor de Recursos Hídricos Bacia do rio de Contas: Diagnóstico do sistema físico**. Relatório Técnico. Salvador: (SRHSH) Governo Do Estado Da Bahia, 160 p.

SEVERI, W.; EL-DEIR, A. C. A.; FELIX, R. T. S.; ARAÚJO, I. M. S.; LUZ, S. C. S.; CALADO NETO, A. V.; COSTA, B. D. F.; CHAGAS, R. J.; BARRETTO, M. G. (2010). Composição e abundância da ictiofauna na área de influência dos reservatórios da Pedra e Funil, Bacia do Rio de Contas, Bahia. In: Moura, A. N.; Araújo, S. E. L.; Bittencourt-Oliveira, M. C.; Pimentel, R. M. M.; Albuquerque, U. P. **Reservatórios do Nordeste do Brasil: Biodiversidade, ecologia e manejo**. Bauru. NUPPEA, p. 541-572.

SHIMABUKURO-DIAS, C. K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2004). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Corydoradinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, n. 4, p. 549-554.

SHIMABUKURO-DIAS, C. K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2004a). Karyotype variability in eleven species of the genus *Corydoras* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 15, p. 135-146,

SHIMABUKURO-DIAS, C. K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2005b). Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). **Caryologia**, v. 58, no. 2: 102-111.

TURNER, B. J.; DIFFOOT, N.; RASCH, E. M. (1992). The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 3 p.17-23,

XAVIER, Y. M. A. (2005). **Gestão Legal dos Recursos Hídricos dos Estados do Nordeste do Brasil** / XAVIER, Y. M. A.; BEZERRA, N. F. (orgs.), Fortaleza Fundação Konrad Adenauer, 187p

CAPÍTULO 1

CROMOSSOMOS B E ACENTUADO POLIMORFISMO DE DNA_r EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE TROPICAL, *Callichthys callichthys* (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE).

* Este artigo será submetido à publicação na revista Journal of Fish Biology

CROMOSSOMOS B E ACENTUADO POLIMORFISMO DE DNAR EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE TROPICAL, *CALLICHTHYS CALLICHTHYS* (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE).

Josivanda Santos Almeida¹, Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso² Paulo de Souza Carneiro² e Ana Lúcia Dias¹

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone (43) 3371-4527 (e-mail: anadias@uel.br); ²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, DCB, CEP 45200-000, Jequié, Bahia, Brasil, fone (73) 35289661 (e-mail: paulomelloaffonso@yahoo.com.br)

Resumo

A família Callichthyidae é um grupo de peixes neotropicais que possui 194 espécies válidas distribuídas em oito gêneros e em duas subfamílias: Corydoradinae e Callichthyinae. Os peixes dessa família apresentam ampla distribuição, ocorrendo nos rios das principais bacias hidrográficas da América do Sul. Estudos citogenéticos em Callichthyidae tem revelado grande variação cariotípica, porém as informações cromossômicas estão disponíveis para um número reduzido de espécies. O presente trabalho fornece dados cromossômicos sobre duas populações de *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Callichthyinae), da Bacia do Rio de Contas/BA, nordeste do Brasil. Ambas as populações apresentaram $2n=54$ (16m+24sm+6st+8a) com a ocorrência de um cromossomo supranumerário de tamanho grande. Múltiplos sítios de RONS $CMA_3^+/DAPI^-$ foram observados com diferenças na posição e tipo cromossômico envolvido. A hibridação *in situ* com sondas ribossomais confirmou os múltiplos sítios de DNAr 18S e revelou vários cromossomos portadores de DNAr 5S. Alguns centrômeros apresentaram-se $DAPI^+$ nas populações de *C. callichthys* analisadas. A heterocromatina foi observada de modo discreto nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos. Os dados obtidos neste estudo revelam a presença de um macrocromossomo B eucromático evolutivamente recente em ambas as populações estudadas, além de uma intensa variação de sítios de DNAr nos cariótipos. Dessa forma, este trabalho contribui com a citotaxonomia de Callichthyidae e auxilia no entendimento da evolução cariotípica no grupo.

Palavras-chave: Callichthyinae. Cromossomo supranumerário. Heterogeneidade

INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce da região neotropical é a mais rica e diversa do mundo e os Siluriformes compõem uma de suas ordens mais representativas, com 36 famílias, 478 gêneros e 3093 espécies (Ferraris Jr., 2007). Dentre estes, Callichthyidae é uma família de peixes com ampla distribuição nos rios e bacias dessa região, que possui 194 espécies descritas alocadas nas subfamílias Corydoradinae (gêneros: *Aspidoras*, *Brochis* e *Corydoras*) e Callichthyinae (gêneros: *Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis*) (Reis, 2003, Menezes *et al.*, 2007). Segundo estudos baseados em caracteres morfológicos e moleculares, Callichthyidae é considerado um grupo monofilético (Reis, 1998) com o gênero *Callichthys* como o mais primitivo dentro da família. Devido a taxonomia confusa deste gênero, populações de diferentes localidades tem sido geralmente identificadas como *Callichthys callichthys* (Reis, 1998; Ferraris Jr., 2007).

Até o momento, informações cromossômicas estão disponíveis para 51 espécies de Callichthyidae, representando pouco mais de ¼ do total de espécies válidas. A avaliação de dados numéricos e morfológicos indica que esta família é um grupo citogeneticamente diverso, com número diplóide variando de $2n=40$ em *Corydoras nattereri* (Oliveira *et al.*, 1990) a $2n=134$ em *C. aeneus* (Turner *et al.*, 1992), uma das maiores amplitudes de valores cromossômicos já encontradas para um grupo de peixes. No gênero *Callichthys*, mais especificamente na espécie *C. callichthys*, os dados existentes nas diferentes populações analisadas evidenciam uma variação peculiar, de $2n=52$ a $2n=58$, bem como a presença de cromossomos supranumerários (Oliveira *et al.*, 1993a; Porto & Feldberg, 1993; Sanchez & Fenocchio, 1996; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005). Apesar de algumas populações de *C. callichthys* já terem sido estudadas, os trabalhos citogenéticos tratam apenas de caracterização por meio de coloração convencional e necessitam de complementações através de estudos mais refinados.

Vale salientar também, que a maioria dos estudos realizados sobre a genética de peixes neotropicais no Brasil concentram-se nos principais rios e bacias das regiões Sul e Sudeste, enquanto bacias menores e isoladas ainda estão sub-representadas (Medrado, *et al.* 2008).

Visando um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica e na especiação da família Callichthyidae, foram realizadas análises citogenéticas convencional e molecular em populações de *C. callichthys*, da Bacia do Rio de

Contas, Bahia, nordeste do Brasil, com inferências sobre a origem do macrocromossomo B eucromático e a diversificação cariotípica relacionada aos sítios de DNAr.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas citogeneticamente exemplares de duas populações de *Callichthys callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae), coletados em dois afluentes da Bacia do rio das Contas (Figura 1a, 1b e 1c), a saber: 9 exemplares (3♂, 4♀ e 2 com sexo não identificado) do rio das Pedras, distrito de Florestal no município de Jequié- BA, nas coordenadas 13°43'39,7''S e 39°05'25,8''W e 17 espécimes (6♂, 5♀ e 6 com sexo não identificado) da lagoa temporária da fazenda Santo Antônio, no município de Jitaúna – BA, entre 14°18'57''S e 39,5°23,2'30,4''W

Coloração convencional

Após estimulação mitótica *in vivo* por 48h (Lee & Elder, 1980), os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica de obtenção direta segundo Bertollo *et al.* (1978) usando células do rim anterior . Os cromossomos foram visualizados por coloração convencional com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8) e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), como comumente realizado em peixes (Bertollo *et al.*, 1983; Morelli *et al.*, 1983; Portela *et al.*, 1988, entre outros). O número fundamental (NF) foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como portadores de dois braços e cromossomos acrocêntricos portadores de um braço.

Bandamento cromossômico

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (RONs) foram detectadas pela impregnação com nitrato de prata (Howell & Black, 1980). O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado de acordo com a técnica de bandamento C com Giemsa após tratamento com HCl 0.1 M, Ba(OH)₂ e 2xSSC (Sumner, 1972). Os sítios ricos em GC e AT foram detectados com cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'-6-diamino-2-fenilindole (DAPI),

respectivamente, de acordo com Schweizer (1980). As lâminas foram coradas com 0.5 mg/mL de CMA₃ por 1 hora, lavadas em água destilada e sequencialmente coradas com 2µg/mL DAPI por 15 minutos. As lâminas foram montadas com um meio composto de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0) 1:1, mais 2.5 mM de MgCl₂.

Hibridação fluorescente *in situ*

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi usada para localizar o DNAr 18S e 5S usando a sonda de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999), respectivamente. A técnica de FISH foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Pinkel *et al.* (1986), com modificações. A metodologia consiste em: desidratar as lâminas em série alcoólica 70 e 100%, 5 min cada; incubar em 90 µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37° C por 1h. Em seguida, lavar 3X em 2xSSC; 1X em paraformaldeído 4% e mais 1X em 2xSSC por 10 min (agitando). Lavar em 1X PBS por 5 min; desidratar em série alcoólica a 70 (agitando) e 100 % por 5 min e deixar secando de 30 min à 3 horas. Simultaneamente, preparar o “mix” de hibridação (7,5 µl da sonda, 12 µl de sulfato de dextrano 10%, 30 µl formamida a 50% e 10,5 µl de 20x SSC) e deixá-lo à temperatura ambiente ou 37°C. Usar 7,5 µl de sonda marcada, inclusive em *double FISH*. Desnaturar as lâminas em formamida 70% a 70° C por 4 min; e desidratar em série alcóolica 50% e 100% por 5 minutos cada, no gelo (secar ao ar). Desnaturar a solução de hibridação a 80°C por de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo. Montar as lâminas colocando 50 µl do “mix” em cada uma, incubar em câmara úmida 37°C *overnight*. Lavar duas vezes em 2xSSC por 5 min e 1 vez em 1x PBS por 10 min, ambos a 45°C (agitando). Incubar as lâminas em 1xPBD. Colocar 50 µL da solução de detecção, inverter a lâmina sobre a lamínula e deixar 1 h em câmara úmida e escura a 37°C. Lavar 3X em 1xPBD a 45°C, por 5 min (no escuro). Em seguida, montar as lâminas com 25µL de meio de montagem DABCO + 1µL de MgCl₂ 50mM + 1µL de solução de iodeto de propídio (50µg/mL); ou 1 µL DAPI (2µg/mL) por lâmina. Guardar as lâminas no escuro a 4°C, até as análises ao microscópio.

RESULTADOS

Coloração por Giemsa

Todos os indivíduos analisados de *Callichthys callichthys*, independentemente da população, apresentaram um número modal de $2n=54$ com fórmula cariotípica de $16m+24sm+6st+8a$, $NF=100$, sem diferenças visíveis entre os sexos (Figura 2a). Adicionalmente, um cromossomo supranumerário ou B, do tipo metacêntrico grande, com dimensões semelhantes a do 1º par (Figura 2a, em destaque) foi detectado em todos os exemplares da população do rio das Pedras e em 47,06% dos da lagoa temporária (Tabela 1). Na população do rio das Pedras, esse cromossomo estava presente em 14,4% do total de células analisadas, sendo que dois indivíduos apresentaram uma frequência superior a 40%. Já na população da lagoa temporária, o cromossomo acessório apareceu em apenas 6,06% do total de células analisadas cuja maior frequência observada foi no exemplar 1152, com 36,84% das células (Tabela 1).

Constrições secundárias foram frequentemente observadas em 1 ou 2 cromossomos de ambas as populações de *C. callichthys*, com diferentes localizações quanto à posição e o tipo cromossômico. Alguns fenótipos foram exclusivos de uma população e outros compartilhados pelas mesmas, conforme descrito a seguir:

A) Constrição secundária intersticial no braço curto de um cromossomo metacêntrico grande, correspondente a um dos homólogos do 2º par (Figuras 2a e b), exclusivo da população do rio das Pedras.

B) Constrição secundária terminal, com discreto heteromorfismo de tamanho no braço longo de um grande par de cromossomos submetacêntrico, correspondente ao par 9, compartilhada por ambas as populações (Figura 2c).

C) Constrição secundária no braço curto de um dos homólogos do par 27, o menor do cariótipo, compartilhado pelas duas populações (Figura 2d).

D) Constrição secundária terminal no braço longo de um dos homólogos do par 9 (o primeiro par submetacêntrico) na população da lagoa (Figura 2e).

E) Constrição secundária intersticial no braço curto de um dos homólogos do par 5 (Figura 2f), exclusivo da população da lagoa.

F) Constrição secundária no braço curto de um dos cromossomos do par 25 (Figura 2g), exclusivo da população da lagoa.

G) Constrição secundária observada no braço curto do 4º par de acrocêntricos, par 27 do complemento (Figura 2h), também exclusivo da população da lagoa.

Regiões organizadoras de nucléolos

Após impregnação por nitrato de prata, a população do rio das Pedras mostrou-se extremamente polimórfica, com variação de número, tipo e localização dos cromossomos portadores dos sítios Ag-RONs. Acentuado heteromorfismo destes sítios entre cromossomos homólogos também foram constatados. Em cada exemplar do rio das Pedras no qual foi possível obter resultados satisfatórios, observou-se um padrão de RONS exclusivo envolvendo até três cromossomos nucleolares por exemplar e um total de 13 cromossomos impregnados pela prata na população, os quais incluem: um metacêntrico grande com sinal na região intersticial do braço curto (cromossomo 2); nove submetacêntricos, sendo dois pares (9 e 16) com marcação terminal no braço longo, e um acentuado heteromorfismo de tamanho entre os homólogos no par 16; um par com marcação no braço curto (par 17), dois cromossomos (11 e 13) com marcação terminal no braço curto; um par na região intersticial do braço longo (par 14); um cromossomo subtlocêntrico (21), com marcas terminais no braço longo; e dois acrocêntricos não homólogos (cromossomos 24 e 27) com marcação terminal no braço curto (Figura 3a).

Na população da lagoa as RONS também apresentaram-se múltiplas e polimórficas. No entanto, houve menor variação interindividual nessa população e uma frequência considerável de marcações nos cromossomos acrocêntricos, ocorrendo, no máximo, 2 cromossomos nucleolares por exemplar, alguns exclusivos para a localidade e outros em que os sinais foram compartilhados entre as duas populações analisadas. A população da lagoa apresentou um total de 11 cromossomos impregnados pela prata, sendo estes: um metacêntrico com marcação intersticial no braço curto (cromossomo 5); quatro submetacêntricos com sinais na região terminal, um no braço longo e três no braço curto (cromossomos 9, 17, 18 e 19); um subtlocêntrico, marcado na porção terminal do braço longo (cromossomo 22); e cinco cromossomos acrocêntricos com marcações no braço curto (cromossomos 24, 26, 27 e par 25). O cromossomo 26 apresentou uma forte marcação e o par 25 mostrou um heteromorfismo de tamanho dos sítios Ag-RONs entre os homólogos (Figura 3b).

Fluorocromos CMA₃/DAPI

A coloração pelos fluorocromos base específicos CMA₃ e DAPI também evidenciou um polimorfismo na população do rio das Pedras quanto ao número, tipo e localização nos cromossomos portadores das regiões ricas em pares de bases GC, variando de 2 a 6 cromossomos por indivíduo, perfazendo 16 cromossomos com marcações fluorescentes na população sendo: um cromossomo metacêntrico com forte marcação intersticial e dois de tamanho médio com sítios na porção terminal do braço curto; dez submetacêntricos, com três grandes cromossomos marcados na posição terminal do braço longo e sete de tamanhos variados com sítios na posição terminal do braço curto; um subtelocêntrico e um par acrocêntrico com sítios na porção terminal do braço curto (Figura 3a).

Na população da lagoa foram observadas de uma a cinco marcações CMA₃⁺/DAPI por indivíduo, totalizando 17 cromossomos, incluindo seis metacêntricos marcados na região terminal, sendo três com sinais no braço curto e três marcados no braço longo; quatro cromossomos submetacêntricos, um com marcação no braço longo e três no braço curto; um subtelocêntrico com marcação no braço longo e seis cromossomos acrocêntricos, todos com sítios fluorescentes na porção terminal do braço curto. O par 25 também apresentou o mesmo heteromorfismo de tamanho evidenciado pelo nitrato de prata (Figura 3b).

Regiões DAPI positivas foram observadas de forma discreta no centrômero de alguns cromossomos em ambas as populações (figura 4)

Hibridação fluorescente *in situ*

Após a FISH com a sonda de DNAr 18S foi possível evidenciar 13 cromossomos com sinais positivos na população dos rio das Pedras (Figura 3a), com cada indivíduo apresentando até cinco cromossomos portadores. Variações interindividuais quanto ao tipo cromossômico e à posição dos sítios cromossômicos também foram observadas. A maioria das regiões evidenciadas pela Ag-RON e pela FISH nessa população foram localizadas em cromossomos submetacêntricos e, em geral, foram coincidentes com àquelas ricas em pares de base GC. Adicionalmente, alguns cromossomos com sítios CMA₃⁺ não relacionado ao DNAr foram observados (Figura 3a). Nos pares 9 e 16 foi evidenciado um heteromorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos. No par 16 este mesmo

heteromorfismo foi detectado pelo nitrato de prata, mostrando-se muito mais acentuado (Figura 3a).

Na população da lagoa a análise por *double*-FISH com sondas de DNAr 18S e 5S foi realizada com sucesso. A hibridação fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S confirmou os sinais Ag-RONs, além de evidenciar sítios de DNAr que estavam inativos. Desta forma, múltiplos sinais de DNAr 18S foram encontrados na porção terminal ou intersticial dos braços curtos ou longos de 2 a 7 cromossomos por indivíduo. Esta população apresentou ao todo, 15 cromossomos portadores de sítios de DNAr 18S (Figura 2 d). O heteromorfismo observado no par 25 pelo nitrato de prata e pelo CMA₃ foi confirmado pela FISH, mostrando-se menos acentuado (Figura 3a).

As marcações de DNAr 5S foram observadas em 8 a 12 cromossomos diferentes dos cromossomos portadores dos sítios 18S, apresentando sinais na posição intersticial e/ou terminal do braço curto (Figura 5).

Bandamento C

A heterocromatina foi observada de modo discreto nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos de *C. callichthys* nas duas localidades amostradas. Os pares 4, 11 e 21 apresentaram, além das bandas centroméricas, marcações sutis nas regiões terminais do braço longo; e observou-se região heterocromática na posição terminal do braço curto em um dos homólogos do 2º par.

O cromossomo B não revelou nenhuma banda, mostrando-se completamente eucromático para ambas as populações (Figura 6a). As constrições secundárias não foram evidenciadas pelo bandamento C (Figuras 6 b-e).

DISCUSSÃO

A espécie *C. callichthys* apresenta considerável variabilidade e sua diversidade cariotípica pode estar relacionada tanto à presença de diversos números diplóides ($2n=52, 54, 56$ e 58) quanto à ocorrência de diferentes fórmulas cromossômicas em populações dentro e entre bacias (Tabela 2). Em alguns casos, os números cromossômicos são exclusivos para populações de uma determinada bacia como o $2n=56$ encontrado apenas na bacia Paraná-Paraguai (Porto & Feldberg 1993; Oliveira *et al.*, 1993a; Sanchez & Fenocchio,

1996 e Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005) e o $2n=52$ presente somente na Bacia Amazônica (Porto & Feldberg 1993). Outros valores são compartilhados, como o $2n = 58$ encontrado em exemplares de rios costeiros das regiões Sul e Sudeste do Brasil (Oliveira *et al.*, 1993a e Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005) e o $2n=54$ que, além do presente estudo, foi também encontrado na bacia Amazônica (Porto & Feldberg, 1993).

Embora o valor diplóide seja semelhante ao observado em outras populações, os exemplares de *C. callichthys* da bacia do rio de Contas diferenciaram-se por apresentar fórmula cromossômica particular, com menor número de cromossomos m-sm e quantidade maior de st-a (Tabela 2). Além disso, as fêmeas não evidenciaram um par cromossômico heteromórfico, o provável par sexual de um sistema ZZ-ZW, sugerido por Porto & Feldberg (1993), em exemplares de bacia Amazônica com $2n=54$. Adicionalmente, um cromossomo acessório metacêntrico de tamanho grande, com tamanho similar ao primeiro par de metacêntricos, foi observado em indivíduos das duas populações do presente estudo.

Desta forma, as populações de *C. callichthys* da bacia do rio de Contas, parecem estar evoluindo de forma independente e indica que inversões pericêntricas desempenharam um papel importante na diferenciação cromossômica das populações estudadas. Considerando que o cariótipo ancestral de Siluriformes teria maior quantidade de cromossomos com dois braços (Oliveira & Gosztanyi, 2000), as populações da bacia do rio de Contas seriam mais derivadas, indicando maior número de rearranjos em relação ao padrão plesiomórfico.

Os resultados obtidos incrementam os dados já existentes para essa espécie de ampla distribuição, inclusive disponibilizando a primeira ocorrência de cromossomos adicionais ou supranumerários no cariótipo de $2n=54$. No entanto, cromossomos B já foram descritos em outros números cromossomos ($2n=58$, $2n=56$, $2n=52$) de *C. callichthys*, com variações em relação ao tamanho, à morfologia, ao número (Tabela 2). Shimabukuro-Dias *et al.* (2005) evidenciaram um grande B metacêntrico na população de Corumbá/MT, que se assemelha em forma e tamanho ao cromossomo observado nas populações aqui amostradas, entretanto o $2n$ desta população era de 56/57.

As constrições secundárias observadas nas duas populações de *C. callichthys* foram coincidentes com os sítios de DNAr e os sinais de CMA₃ porém, não evidenciaram associação com heterocromatina (regiões C negativas). Na família Callichthyidae, constrições secundárias, usualmente heteromórficas, têm sido visualizadas com frequência e já foram encontradas em espécies de *Aspidoras* (Oliveira *et al.*, 1993a; Shimabukuro-Dias *et al.*,

2004a); *Brochis* e *Dianema* (Oliveira *et al.*, 1993a); *Megalechis* (citado como *Hoplosternum thoracatum*) (Porto & Feldberg, 1992), *Hoplosternum* (Porto & Feldberg, 1992; e Nirchio *et al.*, 2006), *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1992, 1993a e 1993b ; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004a) e também em diferentes populações de *C. callichthys* (Sanchez & Fenocchio, 1996; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005).

Em *C. callichthys* há uma predominância da ocorrência de RONS simples e com heteromorfismo de tamanho entre homólogos (Tabela 2). Contudo, múltiplas regiões organizadoras de nucléolos também foram observadas em populações de $2n=54$, da bacia Amazônica (Porto & Feldberg, 1993) e aquelas aqui estudadas, levando-nos a sugerir que RONS múltiplas estão associadas à ocorrência de um cariótipo de 54 cromossomos. Novamente, a presença de múltiplos cromossomos portadores de RONS sugere que este caráter analisado no presente trabalho é mais derivado pois um único par portador de DNAr 45S é considerado um caráter primitivo para peixes (Galetti Jr., 1998). Além disso, a análise das regiões organizadoras nucleolares permitiu diferenciar as populações estudadas, onde a população do Rio das pedras apresentou uma maior expressão gênica, visto que possui uma maior quantidade de cromossomos com sítios Ag-RONS do que a população da lagoa temporária.

Até o momento, os únicos resultados de FISH com DNAr 18S na família Callichthyidae foram relatados por Artoni *et al.* (2006) em duas espécies de *Corydoras* e por Pazza *et al.* (2005) em *Hoplosternum littorale*. A hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S em *C. callichthys* foi coincidente com os sinais Ag-RONS positivos, além de evidenciar sítios inativos em ambas as populações, confirmando a variação intra e interindividual dos sinais, bem como a ausência de homologia para alguns cromossomos. Até 13 sítios de DNAr 18S foram visualizados na população do rio das Pedras, com a maioria dos sinais situados em cromossomos submetacêntricos, enquanto a população da lagoa temporária revelou até 15 cromossomos marcados apresentando maior frequência de marcações nos cromossomos acrocêntricos e menor variação entre os indivíduos. Esta variação na quantidade de sinais de DNAr 18S, de acordo com Kavalco & Moreira-Filho (2003), poderia estar relacionada ao número de cópias de DNAr em cada sítio, mascarando assim a localização de todo o conjunto de genes de RNAr no cariótipo. Ferro *et al.* (2001) também atribuíram tal variabilidade ao reduzido tamanho dos sítios ribossômicos ao analisarem diferentes populações de *Astyanax scabripinnis*. Hipóteses similares poderiam explicar a variação encontrada nos sítios portadores de DNAr em *C. callichthys*.

Ainda a ocorrência heteromorfismo estrutural entre sítios de DNAr de cromossomos homólogos, como os observados nos pares 9 e 16 da população do rio das Pedras, pode ser devida à duplicação e/ou deleção de sequências de DNA ribossômico, provavelmente causadas por crossing-over desigual (Almeida-Toledo *et al.*, 2000, Affonso *et al.*, 2002).

Múltiplos sinais de DNAr 5S, variando de 8 a 12, foram observados nos exemplares de *Callichthys callichthys* da lagoa temporária, em cromossomos diferentes dos portadores de genes de DNAr 18S revelando, portanto, uma não sintenia entre os sítios maiores e menores de DNAr. A não sintenia entre estes sítios é uma característica comumente relatada entre os peixes e esta divergência de localização, segundo Martins & Galetti (1999), parece representar uma condição ótima que evita interferências na harmonia desses sítios de múltiplas cópias. Entretanto, sítios de DNAr 18S e 5S podem assumir uma organização sintênica em algumas espécies de peixes como *Salmo salar* (Pendás *et al.*, 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Móran *et al.*, 1996), *Prochilodus lineatus* (Jesus *et al.*, 2003), *Harttia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2005).

Para a família Callichthyidae, o mapeamento de genes de RNAr 5S foi realizado apenas em *Hoplosternum littorale* (Pazza *et al.*, 2005) com identificação de 4 cromossomos portadores de DNAr 5S. Nos Siluriformes, a maioria dos estudos mostram que esse gene ribossomal está geralmente situado apenas em um par de cromossomos, como observado em *Iheringichthys labrosus* (Carvalho & Dias, 2007), *Steindachneridion scriptum* e *S. melanodermatum* (Swarça *et al.*, 2009) e *Rhamdia quelen* (Garcia *et al.*, 2010a). Contudo, múltiplos sinais de DNAr 5S como os observados nos espécimes aqui analisados também foram encontrados por exemplo em três diferentes espécies do gênero *Pimelodus* (Garcia & Moreira-Filho, 2008), duas espécies de *Pimelodella* (Garcia *et al.*, 2010b) e uma espécie de *Harttia* (Centofante *et al.*, 2006) mas, o número de sítios documentados foram notavelmente inferiores aos aqui observados.

Em *Callichthys callichthys* da lagoa temporária foram observados tantos sítios de DNAr 5S intersticiais quanto terminais. O mapeamento de genes de DNAr 5S em vários grupos de peixes, anfíbios e mamíferos também tem demonstrado que marcações em segmentos intersticiais dos cromossomos são comuns, o que pode representar alguma vantagem na organização desses genes no genoma deste grupo de vertebrados (Martins & Wasko, 2004; Galetti & Martins, 2004). Entretanto, relatos de localização terminal de tais sítios, também têm sido observados em outros grupos de peixes como Tetraodontiformes

(Mandrioli & Manicardi, 2001; Noletto *et al.*, 2006), Perciformes (Affonso & Galetti, 2005), Atheriniformes (Sczepanski *et al.*, 2007).

A coloração com fluorocromos base específicos revelou também diferenças inter e intraindividuais na posição, tipo e número de cromossomos com marcações CMA₃⁺/DAPI. A população do rio das Pedras apresentou 16 cromossomos com regiões ricas em GC, estando grande parte destes sítios em cromossomos submetacêntricos. Já na população da lagoa, foram observados 17 cromossomos com sinais CMA₃⁺, apresentando maior frequência de marcações em cromossomos meta e acrocêntricos e menor variação entre os indivíduos. Estes constituem também os primeiros dados de fluorocromos nesta espécie e, como anteriormente observado com nitrato de prata e os DNAr 18 e 5S, confirmou um acentuado polimorfismo destas regiões em *C. callichthys*.

Similarmente, foi demonstrado que, além de variáveis, os sinais fluorescentes aparecem em cromossomos sem homologia, o que pode ser igualmente devido ao tamanho reduzido destes sítios, tornando-se difíceis de serem detectados.

As RONS detectadas pelo nitrato de prata em *C. callichthys* da bacia do rio de Contas revelaram-se CMA₃ positivas demonstrando que estas regiões são ricas em pares de bases GC. Também foram localizados alguns cromossomos com regiões ricas em GC não relacionados às regiões organizadoras de nucléolos. Segundo Galetti & Martins (2004), as RONS em peixes são comumente evidenciadas por fluorocromos GC-específicos, e havendo também casos em que a CMA₃ evidencia sítios adicionais à prata em porções heterocromáticas não relacionadas aos sítios de DNAr.

Nas duas populações de *C. callichthys*, o bandamento C revelou pequena quantidade de heterocromatina nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos enquanto as regiões de DNAr 18S ricas em GC, não foram evidenciadas pelo bandamento C. Este padrão de localização centromérica de heterocromatina, tem sido predominantemente observada em *C. callichthys* (tabela 2). Adicionalmente, regiões DAPI⁺ foram detectadas no centrômero de alguns cromossomos mostrando, provavelmente, associação entre heterocromatina centromérica e regiões AT ricas.

O cromossomo supranumerário ou B não apresentou qualquer sequência identificada por meio de Ag-RON, FISH ou fluorocromos e revelou-se completamente eucromático, como observado em *Characidium cf. zebra* (Venere *et al.*, 1999), *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia* sp (Abucarma & Martins-Santos, 2001) e *Rhamdia quelen* (Moraes *et al.*, 2007).

Em *C. callichthys*, apenas Shimabukuro-Dias *et al.* (2005) apresentam dados de bandamento C em Bs, onde na população de Marília/SP os microcromossomos B observados foram inteiramente heterocromáticos e na população de Corumbá/MT o cromossomo acessório apresentou um segmento C-positivo na região centromérica. Nesta última, apesar do cromossomo acessório ser semelhante em tamanho e forma ao encontrado nas populações aqui estudadas, ele pode ser diferenciado pela presença de blocos heterocromáticos.

Segundo Camacho (2000), a evolução dos cromossomos supranumerários envolve acúmulo de DNA repetitivo, silenciamento de genes e rápida heterocromatinização. O autor ainda sugere que esta última constitui a base para diferenciação dos cromossomos B. Essa informação representa um forte indício de que supranumerários eucromáticos possuem origem mais recente, o que nos leva a sugerir que o cromossomo supranumerário nas populações analisadas neste trabalho são evolutivamente mais recentes que aqueles identificados em outras populações de *C. Callichthys*.

A composição, a função e, especialmente, a origem dos cromossomos B não são claramente conhecidas. De acordo com Jones & Rees (1982), os Bs se originam do complemento A, podendo ser derivados de autossomos e cromossomos sexuais (origem intra-específica) ou de cruzamentos entre espécies próximas (Camacho *et al.* 2000).

O cromossomo B observado em ambas as populações de *Callichthys callichthys* é um metacêntrico grande que apresentou uma homologia estrutural entre os dois braços, após as técnicas utilizadas. Salvador e Moreira-Filho (1992) observaram este tipo de cromossomo em *Astyanax scabripinnis* e, posteriormente, Mestriner *et al.* (2000) demonstraram que características estruturais e funcionais do macrocromossomo B desta espécie suportam a hipótese de que se trata de um isocromossomo. A mesma hipótese poderia se aplicar ao cromossomo B de *C. callichthys*, entretanto, técnicas como a do complexo sinaptonêmico poderia ser utilizada para se chegar a uma melhor conclusão.

Porto & Feldberg (1993) sugerem que *C. callichthys* formam populações pequenas e isoladas, o que favoreceria as divergências observadas dentro e entre bacias. Esse comportamento poderia explicar assim as diferenças observadas entre as populações do rio das Pedras e da lagoa temporária. Corroborando essa hipótese, a população da lagoa temporária apresentou menor variação citogenética que a do rio das Pedras, provavelmente em função da perda de diversidade genética associada aos efeitos de endogamia e deriva impostos pelo isolamento, caráter efêmero e pequena área de habitat.

Para Oliveira *et al.* (1993a), a variação intraespecífica no número diplóide e estrutura cariotípica em peixes deve-se a ocorrência de subespécies, espécies crípticas ou espécies não identificadas. Assim, a existência de problemas taxonômicos (Reis, 1998), combinada com a grande variabilidade cromossômica e ampla distribuição de *C. callichthys*, incluindo a presença de elementos adicionais e diferentes cariomorfos sem identificação de formas intermediárias, como as do presente estudo, reforça a sugestão de um complexo de espécies ainda não resolvido para o grupo.

Os dados obtidos neste estudo revelam a presença de um macrocromossomo B eucromático que, provavelmente, evoluiu recentemente em ambas as populações estudadas, além de ter sido observada uma intensa variação de sítios de DNAr nos cariótipos. Sendo assim, este trabalho contribui com a citotaxonomia da família Callichthyidae e auxilia no entendimento da evolução cariotípica no grupo.

Tabela 1 – Frequência dos cromossomos supranumerários em células somáticas de *Callichthys callichthys* da Bacia do Rio de Contas-BA.

Localidade	Espécime	Sexo	Nº células analisadas	Nº de Bs		Frequência do B (%)
				0	1	
Rio das Pedras	385	?	27	26	1	3,70
	386	♂	26	20	6	23,08
	387	♂	19	18	1	5,26
	763	♂	42	25	17	40,48
	765	♀	17	10	7	41,18
	905	?	38	32	6	15,79
	907	♀	77	74	3	3,90
	908	♀	74	65	9	12,16
	909	?	55	51	4	7,27
	Total		375	321	54	
	(%)		100	85,6	14,4	
Lagoa	900	♀	89	80	9	10,11
	947	?	54	54	0	0
	949	?	31	28	3	9,68
	1146	♂	22	22	0	0
	1150	♂	13	13	0	0
	1152	?	19	12	7	36,84
	1154	?	38	38	0	0
	1168	♂	21	21	0	0
	1169	♂	42	38	4	9,52
	1170	♂	24	24	0	0
	1172	♀	7	6	1	14,28
	1173	?	11	11	0	0
	1174	♀	38	36	2	5,26
	1175	♂	20	18	2	10
	1176	♀	23	21	2	8,69
	1177	♀	27	27	0	0
	1185	?	16	16	0	0
	Total		495	465	30	
	(%)		100	94,85	6,06	

Tabela 2 – Dados citogenéticos na espécie *C callichthys*. 2n=número diplóide; B=cromossomo supranumerário; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; a=acrocêntrico; c= centromérica; t=terminal; i=intersticial; p= pericentromérica; st=subterminal

SUBFAMÍLIA/ ESPÉCIE	LOCALIDADE	2N	FÓRMULA CROMOSSÔMICA	B	Nº DE RONS	BANDA C	REFERÊNCIAS
Callichthyinae							
<i>Callichthys</i>	Itanhaém/SP	58	22m+22sm+14st	0-5	2	C	Oliveira <i>et al.</i> , (1993a)
<i>Callichthys</i>							
<i>C. callichthys</i>	Guarulhos/SP	58	22m+22sm+14st	---	2	C	Oliveira <i>et al.</i> , (1993a)
<i>C. callichthys</i>	Marchantaria/ AM	54	46m,sm+8st-a	---	3	blocos c t e i	Porto e Feldberg (1993)
<i>C. callichthys</i>	Córrego do Candirú – AM	52	44 m-sm + 8 st-a	0-1	2	----	Porto e Feldberg (1993)
<i>C. callichthys</i>	Manaus/AM	58	-----	---	2	----	Porto e Feldberg (1993)
<i>C. callichthys</i>	Argentina	56	14m+10sm+32st-a	0-2	2	c e p	Sanchez e Fenocchio, (1996)
<i>C. callichthys</i>	Marília/ SP	56	22m+16sm+18st	0-8	2	C	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> , (2005)
<i>C. callichthys</i>	Pindamonhagaba/SP	58	18m+14sm+26st	---	2	C	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> , (2005)
<i>C. callichthys</i>	Embu Guaçu/SP	58	18m+16sm+24sbt	---	2	C	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> , (2005)
<i>C. callichthys</i>	Corumbá/ MT	56/57	20m+16sm+20st	1	2	C	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> , (2005)
<i>C. sp.</i>	R Itabapoana/RJ	60	4m+6sm+46st+4a	---	---	---	Oliveira <i>et al.</i> , (1998) *
<i>C. callichthys</i>	Jequié/Ba	54	16m+24sm+6st+8a	0-1	13	C	Presente estudo
<i>C. callichthys</i>	Jitaúna/Ba	54	16m+24sm+6st+8a	0-1	11	C	Presente estudo

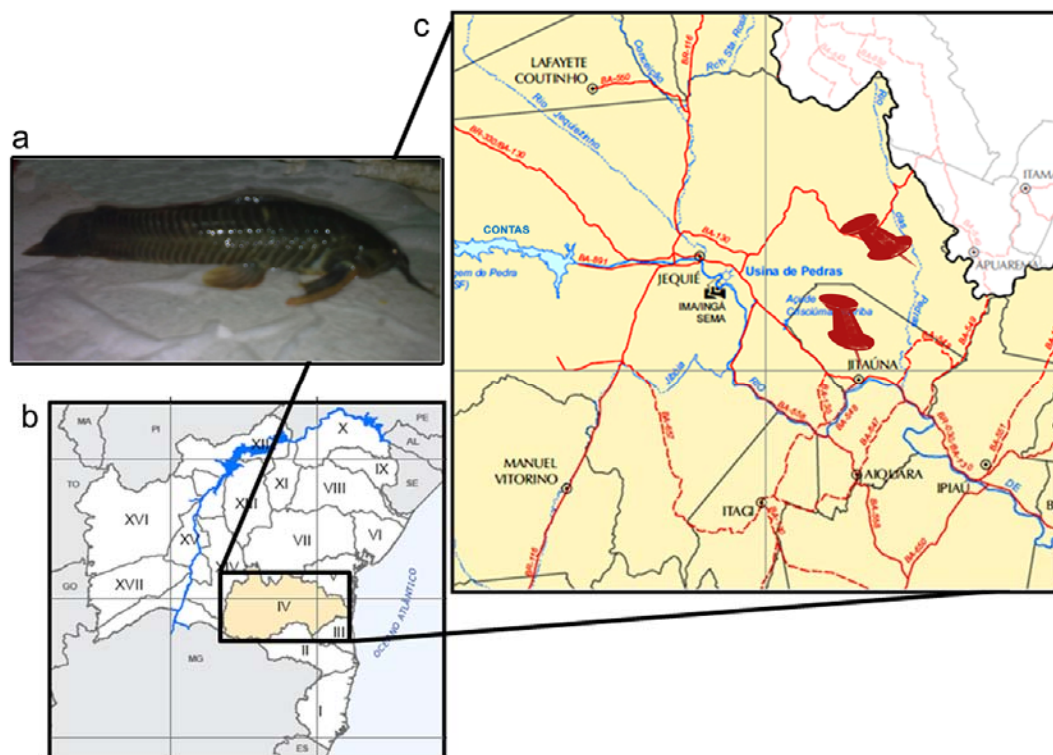


Figura 1 – Exemplar de: *Callichthys callichthys* (a), Locais de coleta: Mapa das bacias do Nordeste: IV- Bacia do rio de Contas (b) rio das pedras e lagoa temporária (c). Os números romanos indicam as Regiões de Planejamento e Gestão de Águas (RPGAs) da Bahia, elaborado pelo Instituto de Gestão de Águas e Climas.

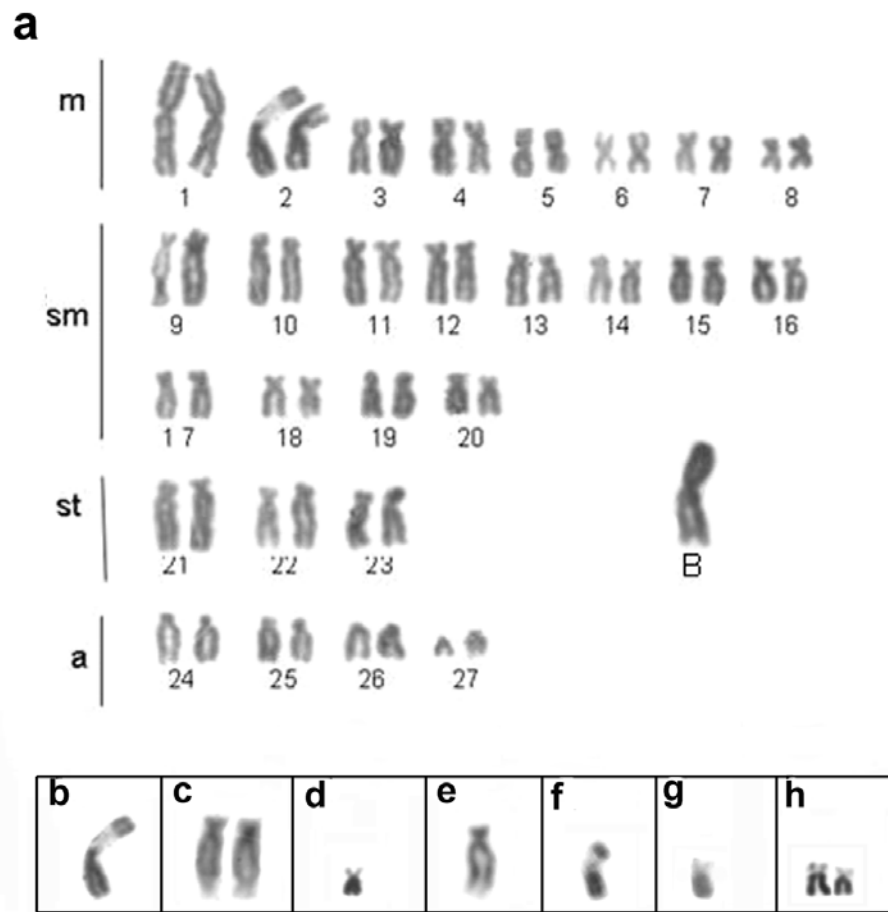


Figura 2 – Cariótipo de *Callichthys callichthys*, evidenciando o cromossomo B (a); Representação dos diferentes tipos cromossômicos com constrição secundária nas populações do rio das Pedras e da lagoa temporária(b-h).

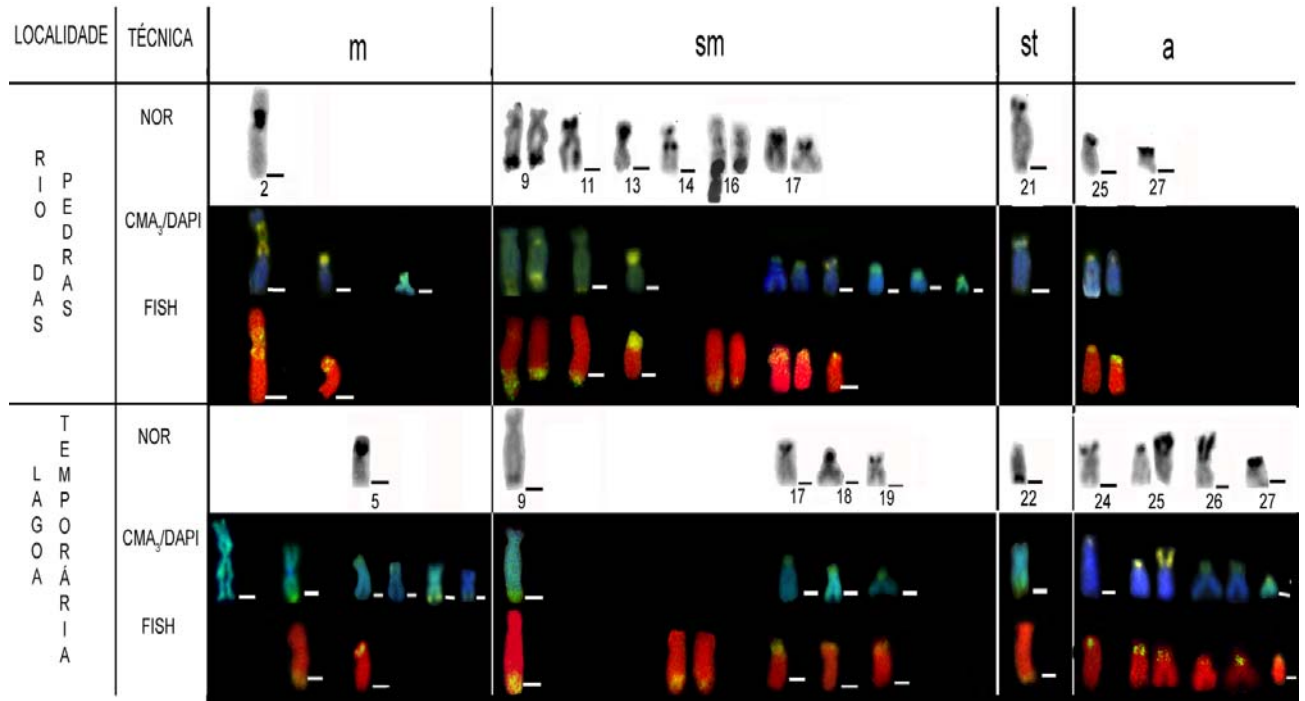


Figura 3 – Cromossomos de *Callichthys callichthys* representando as marcações Ag-RONs, CMA₃⁺/DAPI⁻ e sítios de DNAr 18S, nas populações do rio das Pedras (a) e da lagoa temporária (b).

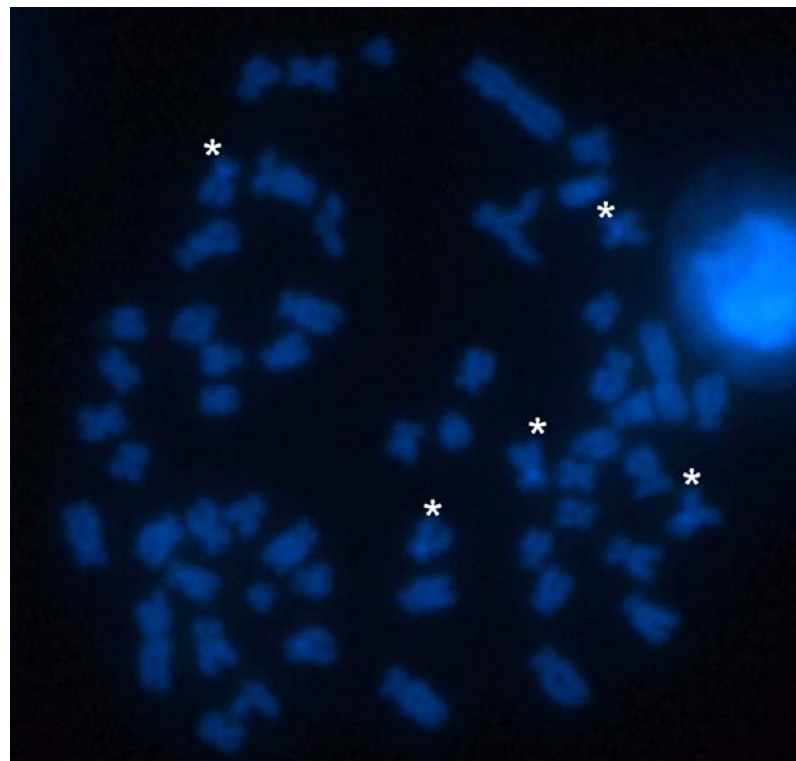


Figura 4 – Metáfase de *C. callichthys* após tratamento com fluorocromo DAPI. Os asteriscos evidenciam os cromossomos com marcação DAPI positivo em algumas regiões centroméricas.

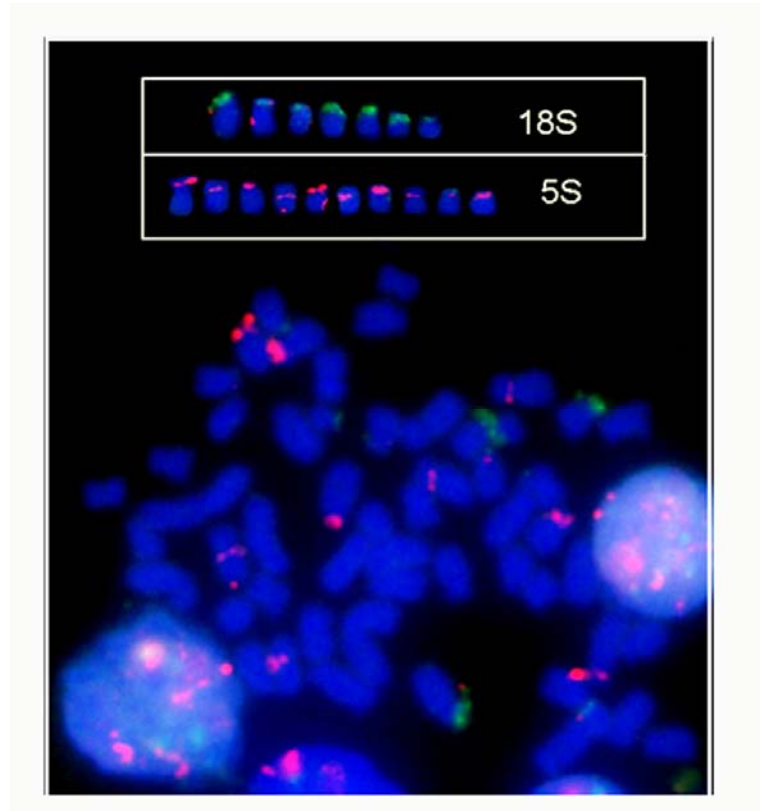


Figura 5 – Metáfase de *Callichthys callichthys*, da lagoa temporária, após a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sondas de DNAr 18S e 5S (double FISH). No Box os cromossomos com os cístrons ribossômicos.

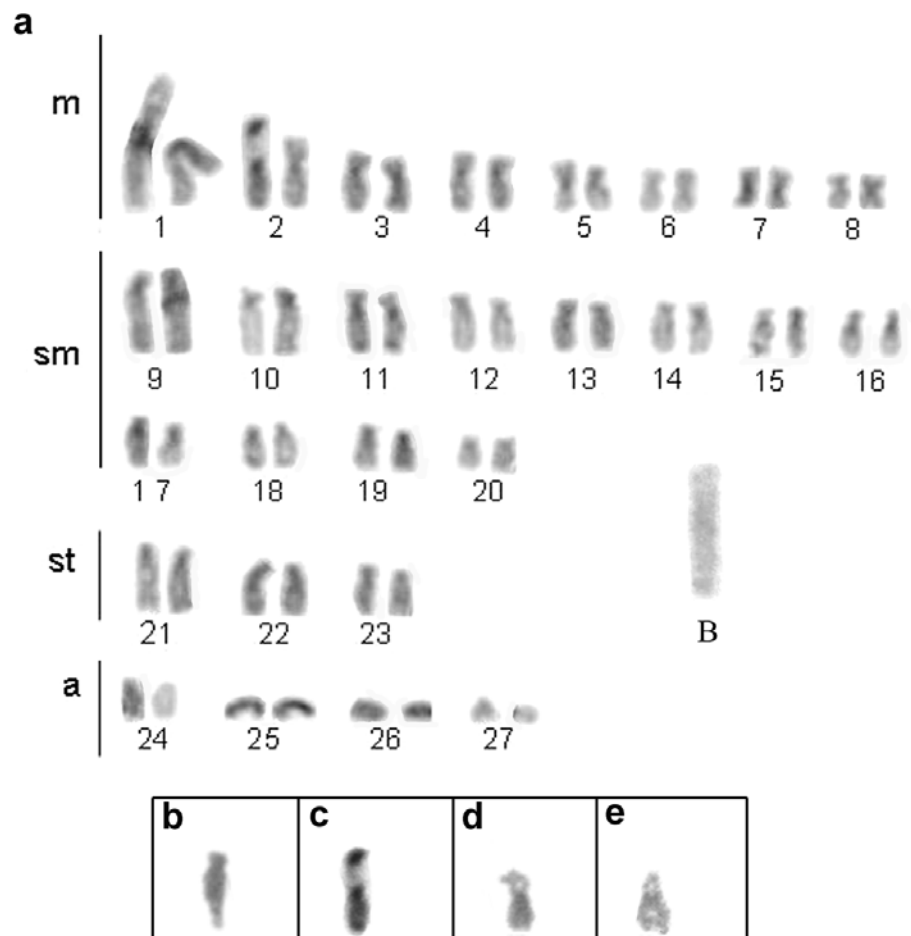


Figura 6 – Cariótipo de *C. callichchys* com banda C, evidenciando o cromossomo B eucromático (a). Cromossomos mostrando a constrição secundária após bandamento C (b-e).

REFERÊNCIAS

- Abucarma, M., & Martins-Santos, I. C. (2001). Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia* **66**, 299-306.
- Affonso, P. R. A. M. & Galetti Jr., P. M. (2005). Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica* **123**, 227–233.
- Affonso, P. R. A. M., Guedes, W., Pauls, E. & Galetti Jr, P. M. (2002). Close karyotypical relationship between two species of marine angelfishes from South Atlantic: *Pomacanthus arcuatus* and *P. paru* (Perciformes, Pomacanthidae). *Caryologia* **55**, 323-329.
- Almeida-Toledo, L. F., Foresti, F., Toledo-Filho, S. A. (2000). Karyotypic evolution of neotropical freshwater fishes. Olmo E. (Org.) *Chromosomes Today*, 1 ed. Basel: Birkhauser Verlag **13**: 169-182.
- Artoni, R. F., Terêncio, M. L., Vicari, M. R., Matiello, M. C. A, Cestari, M. M. & Bertollo, L. A. C. (2006). Citogenética de duas espécies simpátricas de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) do Sul do Brasil. *Brazilian Journal of Biology* **66**, 191-198.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* **03**, 120.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1983). Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia* **48**, 1-12.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. (2000). B chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **355**, 163-178.
- Carvalho, R. A. & Dias, A. L. (2007). Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**, 141-146.
- Centofante L., Bertollo L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2006). Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic Genome Research* **112**, 320–324.
- Ferraris Jr., C. J. (2007). *Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types*. New Zealand: Magnolia Press.

- Ferro, D. A. M., Néo, D. M., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* **110**, 55- 62.
- Galetti, Jr., P. M. (1998). Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal Of Zoology* **65**, 53-56.
- Galetti, Jr., P. M. & Martins, C. (2004). Contribuição da Hibridização in situ para o Conhecimento dos Cromossomos de Peixes. In: *FISH Conceitos e Aplicações na Citogenética* (Marcelo Guerra Org.), pp. 61-88. Ribeirão Preto: Editora SBG.
- Garcia, C. & Moreira-Filho, O. (2008). Localization of ribosomal genes in three Pimelodus species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 261-264.
- Garcia, C., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2010a). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* **9**, 365-384.
- Garcia, C. & Almeida-Toledo, L. F. (2010b). Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* **63**, 32-40.
- Hatanaka T., Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18s and 5s ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* **122**, 239-244.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**, 1014-1015.
- Jesus, C. M., Galetti, Jr., P. M., Valentini, S.R. & Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* **118**, 25-32.
- Jones, R. N. & Rees, H. (1982). *B chromosomes*. New York:Academic Press.
- Kavalco, K. & Moreira-Filho O. (2003). Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River basin. *Caryologia* **56**, 453-461.
- Lee M. R., Elder F. F. B. (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetics and Cell Genetics* **52**, 36-40.

- Mandrioli, M., Manicardi, G. C., Machella, N. & Caputo V. (2001). Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica* **110**, 73-78.
- Mandrioli, M. & Manicardi, G. C. (2001). Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica* **111**, 433-438.
- Mantovani, M., Abel, L. D. S. & Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* **123**, 211-216.
- Martins, C. & Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosome localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* **7**, 363-365.
- Martins, C. & Galetti Jr., P. M. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* **8**, 353-355.
- Martins, C. & Wasko, A. P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on Genome Research* (Williams C. R. Org.), pp. 289-318. Nova Science Publishers.
- Medrado, A. S., Figueiredo, A. V. A., Waldschmidt, A. M., Affonso, P. R. A. M. & Carneiro P. L. S. (2008). Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 208-214.
- Menezes, N. A., Weitzman, S.H., Oyakawa, O. T., Lima, F.C.T., Castro, R.M.C. & Weitzman, M.J. (2007) *Peixes de Água doce da Mata Atlântica: Lista Preliminar das Espécies e Comentários sobre a Conservação de Peixes de Água Doce Neotropicas*. São Paulo: Museu de Zoologia- Universidade de São Paulo.
- Mestriner, C. A., Galetti Jr., P. M., Valentini, S., Ruiz, I. G. R., Abel, L. D.S. Moreira-Filho, O. & Camacho, J. P. M. (2000). Structural and functional evidence that a Bchromosome in the characid fish *Ast,mnax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* **85**, 1-9
- Moraes, V. P. O., Cereali, S. S., Froehlich, O. & Dias, A. L. (2007). Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Genetic and Molecular Research*. **6**, 627-633.
- Móran, P., Martínez, J. L., Garcia-Vásquez, E. & Pendás, A. M. (1996). Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetic and Cell Genetic* **75**, 145-150.
- Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti, F., Moreira-Filho, O. & Almeida-Toledo Filho, S. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia* **36**, 235-244.

- Nirchio, M., Pérez, J., Granado, A. & RON, E. (2006). Conventional Karyotype, constitutive heterocromatin, and nucleolar organizer regions, in *Hoplosternum littorale* (Pisces: Callichthyidae) from Caicara del Orinoco. *Agrobiologia* **18**, 113- 116.
- Noletto, R.B., Vicari, M.R., Cipriano, R.R., Artoni, R.F. & Cestari, M.M. (2007). Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica* **130**, 133-138.
- Oliveira, C., Toledo, L. F. A., Foresti, F., Britski, H. A. & Toledo Filho S. A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics* **11**, 557-624.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F. & Toledo Filho, S. A. (1990). Comparative cytogenetic analysis in three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Cytologia* **55**, 21–26.
- Oliveira, C., Toledo, L. F. A., Mori, L. & Toledo Filho, S. A. (1992). Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Journal of Fish Biology* **40**, 419-431.
- Oliveira, C., Toledo, L. F. A., Mori, L. & Toledo Filho, S. A. (1993a). Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia* **46**, 171-188.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F., Mori, L. & Toledo-Filho S. A. (1993b). Cytogenetica and DNA content studies on armoured catfishes of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* **16**, 617-629
- Oliveira, C. & Gosztonyi, A. E. (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrimus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. *Caryologia* **53**,31-37.
- Pazza, R., Kavalco, K. F., Almeida-Toledo, L. F. & Bertollo L. A. C. (2005). *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. *Caryologia* **58**, 339-344.
- Pendás, A. M., Mórán, P., Freije, J. P.,11' Garcia-Vásquez, E. (1994). Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Cell Genetic*. **67**, 31-36.
- Perfectti F, Werren JH: (2001). The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution* **55**, 1069–1073.

- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 2934-2938.
- Portela, A. L. B. S., Galetti Jr., P. M. & Bertollo, L. A. C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* **11**, 307-316.
- Porto, J. I. R. & Feldberg, E. (1992). Comparative cytogenetic study of the armored catfishes of the genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae). *Revista Brasileira de Genética* **15**, 359-367.
- Porto J. I. R. & Feldberg E. (1993). Is *Callichthys* Linné (Siluriformes, Callichthyidae) a monotypic genus? *Acta Amazonica* **24**, 311–314.
- Reis, R. E. (1998). Anatomy and phylogenetic analysis of 343 the Neotropical Callichthyidae catfish (Ostariophysi, Siluriformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* **124**, 105–168.
- Reis, R.E., (2003) Family Callichthyidae. In: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. eds.), pp. 291–309. Edipucrs.
- Salvador, L. B. & Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Aslyanax scabripinnis* (Pisces. Characidae). *Heredity* **69**, 50-56.
- Sanchez S. & Fenocchio A. S. (1996). Karyotypic studies and cytotaxonomic considerations on *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes) from Argentina. *Cytologia* **61**, 247-252.
- Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes. *Cytogenic Cell Genetic* **27**, 190-193.
- Schweizer D. & Loidl, J. (1987). A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today* **9**, 61-74.
- Szczepanski, T. S., Noleto, R. B., Kantek, D. L. Z., Cortinhas, M. C. S. & Cestari M. M. 2007. Classical and molecular cytogenetics of *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atherinoformes) from South coast of Brazil. *Journal of Fish Biology* **71**, 453-460.
- Shimabukuro-Dias, C. K., Oliveira, C. & Foresti, F. (2004a). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Corydoradinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Genetics and Molecular Biology* **27**, 549-554.

- Shimabukuro-Dias, C. K., Oliveira, C., Foresti F. (2004b). Karyotype variability in eleven species of the genus *Corydoras* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **15**, 135-146.
- Shimabukuro-Dias, C. K., Oliveira, C. & Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Caryologia* **58**, 102-111.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**, 304-306.
- Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M.M. & Dias, A. L. 2009. Localization and Characterization of the 5S rDNA Bearing Chromosome in Two *Steindachneridion* Species by Means of Different Cytogenetic Techniques. *Cytologia* **74**, 323-327.
- Turner, B. J., Diffoot, N. & Rasch, E. M. (1992). The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **3**, 17-23.
- Venere, P. C., Galetti, P. M. Jr. & Miyazawa, C. S. (1999). New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*. **22**, 345–349.

CAPÍTULO 2

HOMOGENEIDADE CARIOTÍPICA EM *Hoplosternum littorale* (HANCOCK, 1828) (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE), UMA ESPÉCIE NEOTROPICAL DE AMPLA DISTRIBUIÇÃO

* Este artigo será submetido à publicação na revista Comparative Cytogenetics

HOMOGENEIDADE CARIOTÍPICA EM *HOPLOSTERNUM LITTORALE* (HANCOCK, 1828) (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE), UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL DE AMPLA DISTRIBUIÇÃO.

Josivanda Santos Almeida¹, Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso² e Ana Lúcia Dias¹

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil (anadias@uel.br) ²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, DCB, CEP 45200-000, Jequié, Bahia, Brasil

Resumo

Estudos citogenéticos foram realizados em uma população da espécie de peixe Neotropical *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) da bacia do rio de Contas- BA, nordeste do Brasil. O número diplóide observado foi de $2n=60$, com fórmula cariotípica de $6m+2sm+52a$ e $NF=68$ para todos os indivíduos, independentemente do sexo. A impregnação por nitrato de prata revelou RONS simples e heteromórficas na região terminal do braço curto do par 6, coincidente com uma constrição secundária. A hibridação fluorescente *in situ* com utilização simultânea de sondas de DNAr 18S e 5S (*double-FISH*) confirmou o par da RONS e o heteromorfismo de tamanho entre homólogos e evidenciou marcações de DNAr 5S na região terminal do braço curto de dois pares de cromossomos acrocêntricos, não sintênicos às RONS. A heterocromatina mostrou-se distribuída nas regiões centroméricas, intersticiais e terminais de alguns cromossomos. A coloração com fluorocromos base-específicos evidenciou regiões ricas em bases GC ($CMA_3^+/DAPI$) coincidentes com as RONS e na região intersticial heterocromática de um par adicional de cromossomos. Os dados obtidos foram similares aos descritos na literatura para outras populações de *H. littorale* anteriormente analisadas em distintas regiões da América do Sul, envolvendo a manutenção da macroestrutura cromossômica, padrão de distribuição de heterocromatina, número de RONS e localização dos genes de RNAr 18 e 5S. Demonstra-se assim uma notável homogeneidade cariotípica para este representante de Callichthyidae em contraste com a extensa diversidade cromossômica verificada na família e com a ampla distribuição da espécie.

Palavras-chave: bandamento cromossômico, citogenética, conservação cariotípica, FISH

INTRODUÇÃO

A família Callichthyidae está dividida em duas subfamílias, a Corydoradinae, com três gêneros: *Aspidoras*, *Brochis* e *Corydoras* e a Callichthyinae constituída de cinco gêneros: *Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis*, perfazendo 194 espécies válidas (Ferraris, 2007; Menezes et al., 2007). Entre estas, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), popularmente conhecida como tamboatá, é um siluriforme com ampla distribuição na América do Sul ocupando uma variedade de habitats. Apesar de ser predominante em lagoas, essa espécie pode ser encontrados desde pequenos riachos de águas rápidas e oxigenados, até rios de grande porte, poças e locais pantanosos, onde o oxigênio pode ser praticamente ausente (Hahn et al., 1997; Reis, 1998).

Análises cromossômicas em *Hoplosternum littorale* já foram realizadas no Norte, Sul e Sudeste do Brasil e Colômbia, revelando que essa espécie apresenta um número diplóide invariável de $2n=60$ e fórmula cariotípica geralmente com 8 m-sm e 52 st-a (Porto e Feldberg, 1992; Oliveira et al., 1993a; Pazza et al., 2005; Shimabukuro-Dias et al., 2005; Nirchio et al., 2006). Esses resultados divergem da enorme variabilidade cromossômica observada em diferentes gêneros e espécies da família Callichthyidae, tais como *Corydoras* com $2n=40$ em *C. nattereri* (Oliveira et al., 1990) a $2n=134$ em *C. aeneus* (Turner et al., 1992), e *Callichthys callichthys* com $2n=52$ a $2n=58$ (Porto e Feldberg, 1993; Oliveira et al., 1993a; Sanchez e Fenocchio, 1996; Shimabukuro-Dias et al., 2005).

Contudo, apesar da ampla distribuição geográfica dessa espécie, não há estudos genéticos disponíveis para as bacias costeiras do nordeste brasileiro, área de pouco conhecimento biológico e alto endemismo (Cetra et al., 2010). Neste trabalho, foram reunidos dados inéditos sobre os padrões cromossômicos de *Hoplosternum littorale* da bacia do rio de Contas, importante sistema hidrográfico do estado da Bahia no Nordeste brasileiro, utilizando marcadores citogenéticos clássicos (coloração convencional, impregnação com nitrato de prata para detecção das regiões organizadores de nucléolos - RONS e bandamento C) bem como coloração com fluorocromos base específicos e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S, visando um melhor entendimento da evolução cariotípica neste grupo de peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados citogeneticamente 22 exemplares (4♂, 14♀ e 4 com sexo não identificado) de *Hoplosternum littorale* (Figura 1a) (Siluriformes, Callichthyidae), provenientes de coletas em uma lagoa temporária na Fazenda Santo Antônio próximo à cidade de Jitaúna/BA, pertencente à bacia do rio de Contas, estado da Bahia, Brasil (Figura 1b), entre as coordenadas 14°18'57''S e 39,5°23,2'30,4''W.

Coloração convencional.

Após estimulação mitótica *in vivo* por 48h (Lee e Elder, 1980), os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica de obtenção direta segundo Bertollo et al. (1978) usando células do rim anterior. Os cromossomos foram visualizados por coloração convencional com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8) e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a), como comumente realizado em peixes (Bertollo et al., 1983; Morelli et al., 1983; Portela et al., 1988, entre outros). O número fundamental (NF) foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelo-cêntricos como portadores de dois braços e cromossomos acrocêntricos portadores de um braço.

Bandamento cromossômico.

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (RONs) foram detectadas pela impregnação com nitrato de prata (Howell e Black, 1980). O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado de acordo com a técnica de bandamento C com Giemsa após tratamento com HCl 0.1 M, Ba(OH)₂ e 2xSSC (Sumner, 1972). Os sítios ricos em GC e AT foram detectados com cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'-6-diamino-2-fenilindole (DAPI), respectivamente, de acordo com Schweizer (1980). As lâminas foram coradas com 0.5 mg/mL de CMA₃ por 1 hora, lavadas em água destilada e sequencialmente coradas com 2µg/mL DAPI por 15 minutos. As lâminas foram montadas com um meio composto de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0) 1:1, mais 2.5 mM de MgCl₂.

Hibridação fluorescente *in situ*.

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi usada para localizar o DNAr 18S e 5S usando a sonda de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999), respectivamente. A técnica de FISH foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Pinkel et al. (1986), com modificações. A metodologia consiste em: desidratar as lâminas em série alcoólica 70 e 100%, 5 min cada; incubar em 90 µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37° C por 1h. Em seguida, lavar 3X em 2xSSC; 1X em paraformaldeído 4% e mais 1X em 2xSSC por 10 min (agitando). Lavar em 1X PBS por 5 min; desidratar em série alcoólica a 70 (agitando) e 100 % por 5 min e deixar secando de 30 min à 3 horas. Simultaneamente, preparar o “mix” de hibridação (7,5 µl da sonda, 12 µl de sulfato de dextrano 10%, 30 µl formamida a 50% e 10,5 µl de 20x SSC) e deixá-lo à temperatura ambiente ou 37°C. Usar 7,5 µl de sonda marcada, inclusive em *double* FISH. Desnaturar as lâminas em formamida 70% a 70° C por 4 min; e desidratar em série alcóolica 50% e 100% por 5 minutos cada, no gelo (secar ao ar). Densaturar a solução de hibridação a 80°C por de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo. Montar as lâminas colocando 50 µl do “mix” em cada uma, incubar em câmara úmida 37°C *overnight*. Lavar duas vezes em 2xSSC por 5 min e 1 vez em 1x PBS por 10 min, ambos a 45°C (agitando). Incubar as lâminas em 1xPBD. Colocar 50 µL da solução de detecção, inverter a lâmina sobre a lamínula e deixar 1 h em câmara úmida e escura a 37°C. Lavar 3X em 1xPBD a 45°C, por 5 min (no escuro). Em seguida, montar as lâminas com 25µL de meio de montagem DABCO + 1µL de MgCl₂ 50mM + 1µL de solução de iodeto de propídio (50µg/mL); ou 1 µL DAPI (2µg/mL) por lâmina. Guardar as lâminas no escuro a 4°C, até as análises ao microscópio.

RESULTADOS

Todos os indivíduos de *Hoplosternum littorale*, independentemente do sexo, apresentaram um número diplóide igual a 60 com fórmula cariotípica de 6m+2sm+52a e NF=68 (Figura 2a). Usualmente, uma constrição secundária, com um pequeno heteromorfismo de tamanho, foi observada em um par de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio, equivalente ao par 6 (Figura 2a, em destaque).

A impregnação por nitrato de prata revelou RONS simples em um par de acrocêntricos de tamanho médio (6° par), coincidente com a constrição secundária, com a coloração pelo fluorocromo CMA₃ e com sítios de DNAr 18S (Figura 2a, em destaque).

O padrão de heterocromatina mostrou marcações centroméricas em todos os cromossomos, além de algumas marcações intersticiais e poucas terminais (Figura 2b). As RONS revelaram-se banda C negativas.

A técnica de *double*-FISH, com sondas de DNAr 18S e 5S, evidenciou dois cromossomos acrocêntricos portadores de DNAr 18S em posição terminal do braço curto, heteromórficas em tamanho e coincidentes com as RONS (Figura 2a, em destaque, e Figura 3), enquanto a sonda de DNAr 5S hibridou na porção terminal do braço curto de dois pares de cromossomos acrocêntricos, não sintênicos aos portadores das RONS (figura 3).

Após a coloração com fluorocromos base específicos, todos os indivíduos apresentaram quatro cromossomos acrocêntricos positivos para CMA₃ e negativos para DAPI. Destes, um par apresentou sítios na região terminal do braço curto coincidentes com as constrições e as RONS e o outro par evidenciou marcação intersticial no braço longo, próxima ao centrômero (Figuras 4a e b).

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, *H. littorale* da bacia do rio de Contas seguiu o padrão comumente descrito para outras populações dessa espécie de diferentes bacias da América do Sul (Tabela 1), evidenciando seu caráter invariável e reforçando a idéia de que esta é uma espécie altamente conservada, com número diplóide ($2n=60$) e fórmula cariotípica (8m-sm+52 st/a) constantes. Esse padrão conservado diverge da grande variabilidade cromossômica observada em diferentes gêneros da família Callichthyidae, tais como *Corydoras* (Oliveira et al., 1990; Turner et al., 1992) e *Callichthys* (Shimabukuro-Dias et al., 2005). De fato, amostras de *C. callichthys* da mesma localidade amostrada de *H. littorale* no presente trabalho, exibiram cariomorfos distintos de outras regiões do Brasil e com uma série de peculiaridades como cromossomos B e variabilidade de sítios de DNAr (ver capítulo 1).

A detecção de RONS simples tem sido predominante na família Callichthyidae (Oliveira et al., 1993a; Sanchez e Fenocchio, 1996; Shimabukuro-Dias et al., 2004a; Shimabukuro-Dias et al., 2005). Em *H. littorale*, as RONS simples são constantemente

visualizadas com heteromorfismo de tamanho, conforme observado no presente estudo. Entretanto, há uma discordância entre os autores quando ao par cromossômico portador desses sítios. Nirchio et al. (2006) localizaram as regiões organizadoras de nucléolos em *H. littorale* no par 5 em exemplares da Bacia do Orinoco (Venezuela) enquanto Pazza et al. (2005) em estudos conduzidos em bacias da região sudeste mapearam as RONS no par 6, coincidindo com o resultado observado nos exemplares da bacia do rio de Contas. Já em indivíduos da Bacia Amazônica, Porto e Feldberg (1992) identificaram o par 7 como o portador de RONS e três diferentes populações (São Paulo, Mato Grosso e Rio Grande do Sul) analisadas por Shimabukuro-Dias et al. (2005) apresentaram RONS no par 8. No entanto, a similaridade entre os pares das RONS entre as diferentes populações, independente da sua posição no cariótipo, reforça a hipótese de que estes cromossomos sejam possivelmente homeólogos.

Após a FISH com sonda de DNAr 18S, *H. littorale* apresentou sinais fluorescentes em um par de cromossomos acrocêntricos coincidente com a marcação pela prata. Da mesma forma, foi evidenciado um heteromorfismo de tamanho dos sítios de DNAr 18S entre homólogos, o que confirma que esta variação é estrutural. Essa característica tem sido encontrada em muitas espécies de peixes Neotropicais (Shimabukuro-Dias et al., 2004a) e sua ocorrência pode ser devida à duplicação e/ou deleção de sequências de DNA ribossômico, provavelmente causadas por crossing-over desigual (Almeida-Toledo et al., 2000, Affonso et al., 2002).

Estudos envolvendo técnicas mais refinadas como a hibridação fluorescente *in situ*, são pouco frequentes na família Callichthyidae e, até agora, há dados disponíveis apenas para duas espécies do gênero *Corydoras* e uma população de *Hoplosternum littorale*. Artoni et al. (2006) observaram que *Corydoras ehrhardti* e *C. paleatus* (portadoras de Ag-RONS simples) exibiam, respectivamente, 2 e 3 cromossomos marcados pela FISH com sonda de DNAr 18S e em *H. littorale*, onde apenas em dois exemplares coletados em São Paulo foram analisados por Pazza et al. (2005) demonstraram marcações de DNAr 18S e 5S semelhantes às do presente estudo. Contudo, somente a população do presente estudo exibiu heteromorfismo de tamanho das RONS entre homólogos.

Nos demais Siluriformes, a maioria dos estudos mostram que o DNAr 5S está situado apenas em um par de cromossomos, como em *Iheringichthys labrosus* (Carvalho e Dias, 2007), *Steindachneridion scriptum* e *S. melanodermatum* (Swarça et al., 2009) e *Rhamdia quelen* (Garcia et al., 2010a). No entanto, múltiplos sinais deste tipo de DNAr

observados nos espécimes aqui analisados também foram encontrados em três diferentes espécies do gênero *Pimelodus* (Garcia e Moreira-Filho, 2008), duas espécies de *Pimelodella* (Garcia et al., 2010b) e uma espécie de *Harttia* (Centofante et al., 2006). Varios Locarridae

Adicionalmente, a utilização simultânea das sondas de DNAr 18S e 5S em *H. littorale* do presente estudo mostrou que os sinais de DNAr 5S não foram sintênicos às RONS. Segundo Martins e Galetti Jr., (2000), esta é uma característica comum entre os peixes e também nos diferentes grupos animais. Entretanto, em peixes, estes sítios podem apresentar organização sintênica como observado em *Salmo salar* Pendás et al., (1994), *Oncorhynchus mykiss* Mórán et al., (1996), *Harttia carvalhoi* (Centofante et al., 2006), *Prochilodus lineatus* (Jesus et al., 2003) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2005).

A presença de DNAr 5S na posição terminal de dois pares em *H. littorale* na população da lagoa temporária, e também nos espécimes analisados por Pazza et al. (2005), indica que essa condição possa apresentar um estado derivado visto que a posição intersticial é mais observada tanto entre os peixes como entre os vertebrados de maneira geral (Martins e Wasko, 2004). Assim, um evento de inversão pericêntrica pode ter dado origem à posição divergente desse cístron ribossômico. A localização terminal de tais sítios também foi relatada em outros grupos de peixes como em alguns Tetraodontiformes (Mandrioli e Manicardi, 2001; Noleto et al., 2006), Perciformes (Mandrioli et al., 2001) e Atheriniformes (Sczepanski et al., 2007).

Dados de bandamento C na família têm demonstrado que há diferença na quantidade de heterocromatina entre os grupos (Oliveira et al., 1992). Enquanto *Callichthys*, em geral, apresenta pouca heterocromatina localizada principalmente na região centromérica (Porto e Feldberg, 1993; Sanchez e Fenocchio, 1996), *Hoplosternum* e *Megalechis* possuem quantidade considerável, dispersas nas regiões centroméricas e/ou intersticiais dos cromossomos (Nirchio et al., 2006, Shimabukuro-Dias et al., 2005). Outros gêneros como *Aspidoras* e *Corydoras* apresentam grandes blocos heterocromáticos centroméricos, pericentroméricos e terminais em muitos cromossomos (Oliveira et al., 1990, 1992, 1993a e 1993b e; Artoni et al., 2006; Shimabukuro-Dias et al., 2004a e 2004b). O padrão de heterocromatina em *H. littorale* mostrou marcações centroméricas em todos os cromossomos, além de algumas marcações intersticiais, seguindo a tendência observada para a espécie.

Em relação à coloração com fluorocromos base-específicos, *H. littorale* apresentou constantemente quatro cromossomos acrocêntricos marcados positivamente para CMA₃⁺ e DAPI. Destes, um par possui marcações coincidentes com as constrições e RONS,

evidenciando heterocromatina rica em pares de base GC associada aos sítios ribossômicos. O outro par mostrou marcação intersticial no braço longo próximo ao centrômero e não relacionado às RONS, coincidente com um dos blocos heterocromáticos intersticiais visualizados pelo bandamento C. Resultados similares foram também observados por Pazza et al. (2005) para a população de São Paulo.

De acordo com Oliveira *et al.* (1988), espécies amplamente distribuídas pela região Neotropical, com populações pequenas e baixa vagilidade geralmente apresentam ampla variabilidade cariotípica inter e intraespecífica. Curiosamente, *Hoplosternum littorale*, apesar de possuir estas características, não segue esse modelo teórico de estruturação populacional, apresentando uma grande semelhança cariotípica entre todas as populações já estudadas (Tabela 1). Assim, o presente trabalho, além de ampliar a documentação cariotípica para populações brasileiras de *Hoplosternum littorale*, reforça o caráter homogêneo da macroestrutura cariotípica dessa espécie, mesmo em bacias isoladas e com história evolutiva única onde padrões citogenéticos peculiares têm sido encontrados em diversos grupos de peixes (Medrado et al., 2008; Jacobina et al., 2009).

Diferentemente de espécies de outros gêneros de Callichthyidae, como *Corydoras* e *Callichthys*, a espécie *Hoplosternum littorale* apresenta uma notável estabilidade cariotípica, que possivelmente é uma característica da própria espécie. Este conservadorismo já foi observado em algumas populações de *Astyanax altiparanae* (Domingues *et al.*, 2007) e *Astyanax bimaculatus* (Pamponet *et al.*, 2008), em contraste com uma ampla variabilidade observada em outras espécies de *Astyanax* (Medrado *et al.*, 2008, Vicari *et al.*, 2008, Kavalco e Moreira-Filho, 2003), assim como *Hoplias lacerdae* (Blanco *et al.*, 2010a), em relação à variabilidade de diversas populações de *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000, Rosa *et al.*, 2009, Blanco *et al.*, 2010b).

Pode-se inferir ainda, que a expansão populacional de *Hoplosternum littorale* seja um evento recente, não favorecendo a fixação de rearranjos cromossômicos. De fato, acredita-se que a ampla distribuição geográfica desta espécie seja parcialmente influenciada por ações antrópicas de transposição de populações (Oliveira e Moraes Jr., 1997) o que explicaria parcialmente o notável conservadorismo citogenético das populações já analisadas. Porém, para confirmar essa hipótese, análises moleculares baseadas em DNA mitocondrial seriam necessárias.

Tabela 1 – Dados citogenéticos em espécies do gênero *Hoplosternum*. 2n = número diplóide; B = cromossomo supranumerário; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subteloentrico; a=acrocêntrico; c = centromérica; t = terminal; i = intersticial; p = pericentromérica; st = subterminal

SUBFAMÍLIA/ ESPÉCIE	LOCALIDADE	2N	FÓRMULA CROMOSSÔMICA	Nº DE RONS	BANDA C	REFERÊNCIAS
Callichthyinae						
<i>H. litoralle</i>	L ago Camaleão/AM	60	4m+4sm+52st-a	2	----	Porto e Feldberg, (1992)
<i>H. litoralle</i>	R Orinoco/ Colômbia	60	6m+2sm+2st+50a	2	c, p e i	Nirchio <i>et al.</i> , (2006)
<i>H. litoralle</i>	Pirassununga/ SP	60	4m+4sm+52a	2	blocos c e i	Oliveira <i>et al.</i> , (1993a)
<i>H. litoralle</i>	R Guaíba/RS	60	6m+2sm+52a	2	c e/ou i	Shimabukuro- Dias <i>et al.</i> ,(2005)
<i>H. litoralle</i>	Reservatório Jurumirim/ SP	60	6m+2sm+52a	2	c e/ou i	Shimabukuro- Dias <i>et al.</i> , (2005)
<i>H. litoralle</i>	R Pirai/ MT	60	6m+2sm+52a	2	c e/ou i	Shimabukuro- Dias <i>et al.</i> , (2005)
<i>H. litoralle</i>	Costa Sudeste do Brasil	60	6m+2sm+52a	2	st e i	Pazza <i>et al.</i> , (2005)
<i>H. sp.</i>	Mirassolândia/S P	60	6m+2sm+52a	2	blocos c e i	Oliveira <i>et al.</i> , (1993a)
<i>H. litoralle</i>	Jitaúna/BA	60	6m+2sm+52a	2	c, i e t	presente estudo

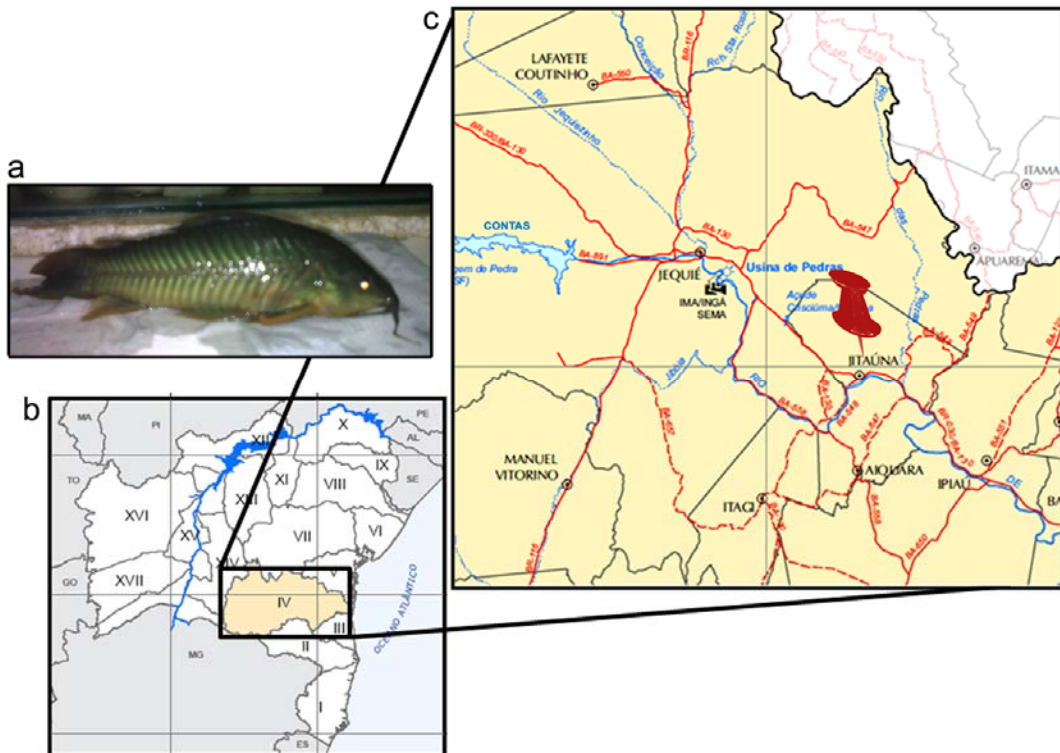


Figura 1 – Exemplar de: *Hoplosternum littorale* (a), Locais de coleta: Mapa das bacias do Nordeste: IV- Bacia do rio de Contas (b) lagoa temporária(c). Os números romanos indicam as Regiões de Planejamento e Gestão de Águas (RPGAs) da Bahia, elaborado pelo Instituto de Gestão de Águas e Climas.

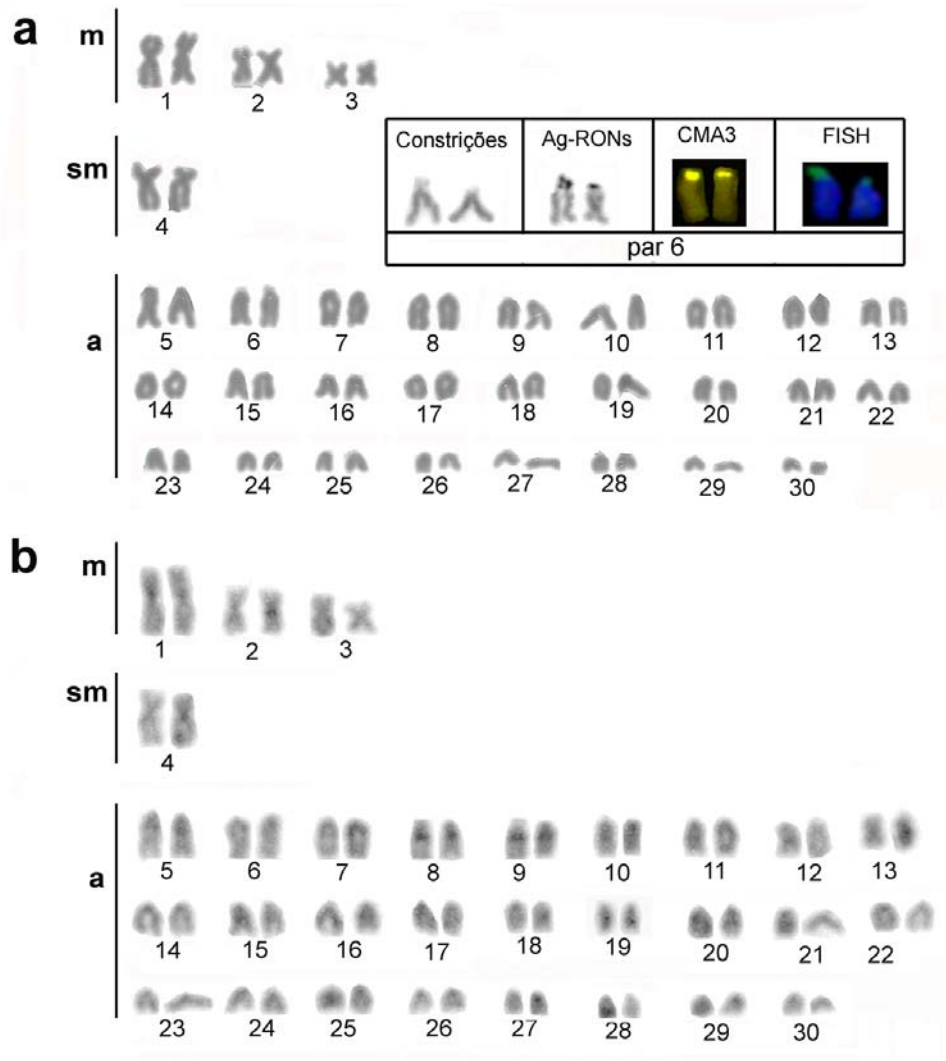


Figura 2 – Cariótipos de *Hoplosternum littorale* com coloração convencional (a) e banda C (b). Em destaque o par cromossômico portador da constrição secundária, Ag-RON, CMA₃ e sítios de DNAr 18S.

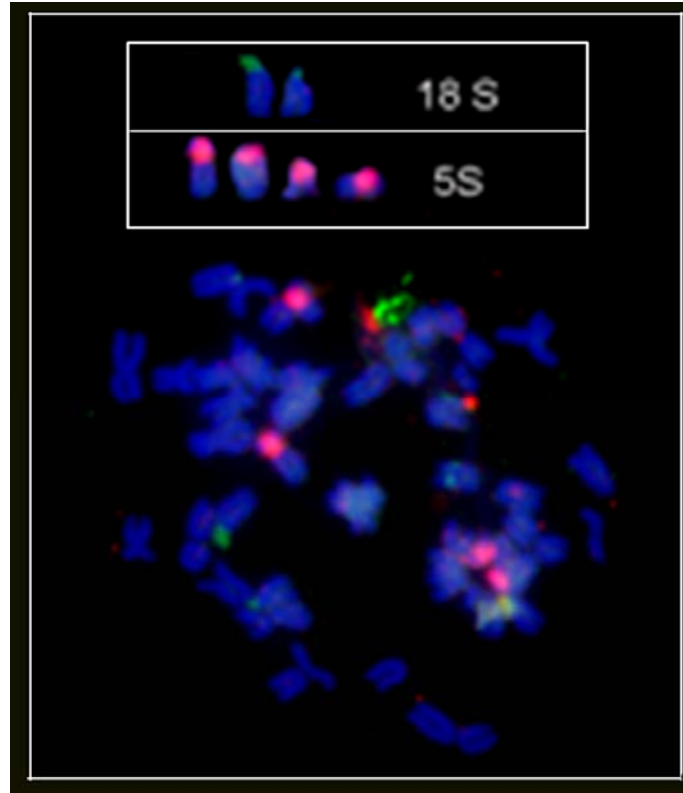


Figura 3 – Metáfase de *Hoplosternum littorale* após a hibridação *in situ* com fluorescência (FISH), com sondas de DNAr 18S(verde) e 5S(vermelho) (double FISH). No Box os cromossomos com os cístons ribossômicos.

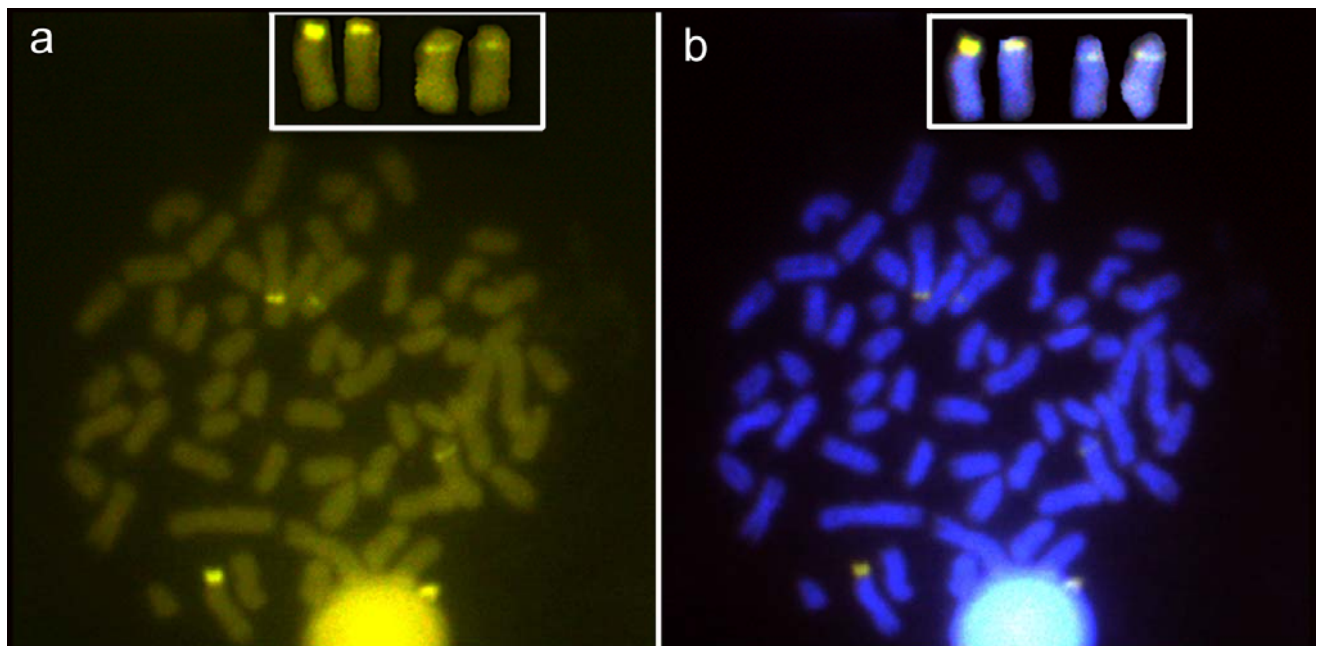


Figura 4 – Metáfases de *H. littorale* após tratamento com fluorocromos CMA₃ e DAPI. Em (a) cromossomos com sítios CMA₃; em (b) sobreposição de CMA₃/DAPI.

REFERÊNCIAS

- Affonso P. R. A. M., Guedes, W., Pauls, E., Galetti Jr, P. M. 2002.** Close karyotypical relationship between two species of marine angelfishes from South Atlantic: *Pomacanthus arcuatus* and *P. paru* (Perciformes, Pomacanthidae) // *Caryologia* 55 (4): 323-329.
- Almeida-Toledo L. F., Foresti F., Toledo-Filho, S. A. 2000.** Karyotypic evolution of neotropical freshwater fishes. // Olmo E. (Org.) *Chromosomes Today*, 1 ed. Basel: Birkhauser Verlag 13: 169-182.
- Artoni R. F., Terêncio M. L., Vicari M. R., Matiello M. C. A, Cestari M. M., Bertollo, L. A. C. 2006.** Citogenética de duas espécies simpátricas de *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) do Sul do Brasil // *Brazilian Journal of Biology* 66 (1b).
- Bertollo L. A. C., Takahashi C. S., Moreira-Filho O. 1978.** Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae) // *Brazilian Journal of Genetics* 03:120.
- Bertollo L. A. C., Takahashi C. S., 1983.** Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae) // *Cytologia* 48: 1-12.
- Bertollo L. A. C., Born GG, Dergam J. A., Fenocchio A. S., Moreira-Filho O. 2000.** A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations // *Chromosome Research* 8: 603-613.
- Blanco D. R., Lui R. L., Bertollo L. A. C., Diniz D., Moreira-Filho O. 2010a.** Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) // *Fish Biology and Fisheries*, 20:1–8.
- Blanco D. R., Lui R. L., Bertollo L. A. C., Margarido V. P., Moreira-Filho O. 2010b.** Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations // *Neotropical Ichthyology*, 8:361-368.
- Carvalho R. A., Dias A. L. 2007.** Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus* // *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50 (1): 141-146.
- Centofante L., Bertollo L. A. C, Moreira-Filho O. 2006.** Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae) // *Cytogenetic Genome Research* 112:320–324.

- Cetra, M., Sarmiento-Soares, L. M., Martins-Pinheiro, R. F. 2010.** Peixes de riachos e novas Unidades de Conservação no sul da Bahia // *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 5 (1): 11-21.
- Domingues M. S., Vicari M. R., Abilhoa V., Wamser J. P., Cestari M. M., Bertollo L. A. C., Almeida M. C., Artoni R. F. 2007.** Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from upper rio Paraná basin // *Neotropical Ichthyology* 5:37-44.
- Ferraris Jr. C. J. 2007.** Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types // *Zootaxa* 1418. 628ps.
- Garcia C., Moreira-Filho O. 2008.** Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites // *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1) (suppl), 261-264.
- Garcia C., Oliveira C., Almeida-Toledo L. F. 2010a.** Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes // *Genetics and Molecular Research* 9 (1): 365-384.
- Garcia C., Almeida-Toledo, L. F. 2010b.** Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms // *Caryologia* 63 (1): 32-40.
- Hahn N. S., Almeida, V. L. L. e Luz, K. D. G. 1997.** Alimentação e ciclo alimentar diário de *Hoplosternum littorale* (Hancock) (Siluriformes, Callichthyidae) nas lagoas Guaraná e Patos da Planície do Alto Rio Paraná, Brasil // *Revista Brasileira de Zoologia* 14 (1): 57-64
- Hatanaka T., Galetti Jr., P.M. 2004.** Mapping of the 18s and 5s ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae) // *Genetica* 122: 239-244.
- Howell W. M., Black, D. A. 1980.** Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // *Experientia* 36: 1014-1015.
- Jacobina U. P., Affonso P. R. A. M., Carneiro, P. L. S., Dergam J. A. 2009.** Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil // *Neotropical Ichthyology* 7(4): 617-622.
- Jesus, C. M., Galetti, Jr., P. M., Valentini, S.R., Moreira-Filho, O. 2003.** Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes // *Genetica* 118:25-32.

- Kavalco, K., Moreira-Filho O. 2003.** Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River basin // *Caryologia* 56: 453-461.
- Lee M. R., Elder F. F. B. 1980.** Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations // *Cytogenetics and Cell Genetics* 52: 36-40.
- Mandrioli M., Manicardi G. C., Machella N., Caputo V. 2001.** Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae) // *Genetica* 110: 73-78.
- Mandrioli M., Manicardi, G. C. 2001.** Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes) // *Genetica* 111: 433-438.
- Mantovani, M., Abel, L. D. S., Moreira-Filho, O. 2005.** Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) // *Genetica* 123: 211-216.
- Martins C., Galetti Jr. P. M. 1999.** Chromosome localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) // *Chromosome Research* 7(5): 363-365.
- Martins C., Galetti Jr. P. M. 2000.** Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes // *Chromosome Research* 8(4): 353-355.
- Martins C., Wasko, A. P. 2004.** Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. Editor Williams C. R. (Org.) *Focus on Genome Research* // Nova Science Publishers: 289-318.
- Medrado A. S., Figueiredo A. V. A., Waldschmidt A. M., Affonso P. R. A. M., Carneiro P. L. S. 2008.** Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins // *Genetics and Molecular Biology* 31: 208-214.
- Menezes, N. A., Weitzman S.H., Oyakawa, O. T., Lima, F.C.T., Castro, R.M.C., Weitzman, M.J. (2007)** *Peixes de Água doce da Mata Atlântica: Lista Preliminar das Espécies e Comentários sobre a Conservação de Peixes de Água Doce Neotropicas*. São Paulo: Museu de Zoologia- Universidade de São Paulo.
- Móran, P., Martínez, J. L., Garcia-Vásquez, E. & Pendás, A. M. 1996.** Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Cytogenetic and Cell Genetic* 75: 145-150.
- Morelli S., Bertollo L. A. C., Foresti F., Moreira-Filho O., Almeida-Toledo Filho S. 1983.** Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability // *Caryologia* 36 (3): 235-244.

- Nirchio M., Pérez J., Granado A., RON, E. 2006.** Conventional Karyotype, constitutive heterocromatin, and nucleolar organizer regions, in *Hoplosternum littorale* (Pisces: Callichthyidae) from Caicara del Orinoco // *Agrobiologia* 18(2): 113- 116.
- Noieto, R.B., Vicari, M.R., Cipriano, R.R., Artoni, R.F., Cestari, M.M. 2007.** Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes) // *Genetica* 130: 133-138.
- Oliveira C., Toledo L. F. A., Foresti F., Britski H. A., Toledo Filho S. A. 1988.** Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes // *Brazilian Journal of Genetics* 11(3): 557-624.
- Oliveira C., Almeida-Toledo L. F., Toledo Filho, S. A. 1990.** Comparative cytogenetic analysis in three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) // *Cytologia* 55: 21–26.
- Oliveira C., Toledo L. F. A., Mori L., Toledo Filho, S. A. 1992.** Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) // *Journal of Fish Biology* 40: 419-431.
- Oliveira C., Toledo L. F. A., Mori, L., Toledo Filho, S. A. 1993a.** Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia* 46: 171-188.
- Oliveira C., Almeida-Toledo L. F., Mori L., Toledo-Filho S. A., 1993b.** Cytogenetica and DNA content studies on armoured catfishes of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil // *Brazilian Journal of Genetics* 16(3): 617-629
- Oliveira J. C., Moraes Jr., D. F. 1997.** Presença de *Hoplosternum* Gill, 1858 (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae) nas bacias do rios São Francisco, Paraíba do Sul e Alto Paraná: primeiro registro e comentários // *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro* 383:1-8
- Pamponet V. C. C., Carneiro P. L. S., Affonso P. R. A. M., Miranda V. S., Silva Junior J. C., Oliveira C. G., Gaiotto F. A. 2008.** A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Characidae) from Northeastern Brazil. // *Neotropical Ichthyology* 6: 621-630.
- Pazza R., Kavalco K. F., Almeida-Toledo L. F., Bertollo L. A. C. 2005.** *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA // *Caryologia* 58: 339-344.

- Pendás, A. M., Mórán, P., Freije, J. P., Garcia-Vásquez, E. 1994.** Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA // *Cytogenetic and Cell Genetic* 67: 31-36.
- Pinkel D., Straume T., Gray J. W. 1986.** Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934-2938.
- Portela A. L. B. S., Galetti Jr. P. M., Bertollo, L. A. C. 1988.** Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae) // *Brazilian Journal of Genetics* 11: 307-316.
- Porto, J. I. R., Feldberg, E. 1992.** Comparative cytogenetic study of the armored catfishes of the genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae) // *Revista Brasileira de Genética* 15: 359-367
- Porto J. I. R., Feldberg E. 1993.** Is *Callichthys* Linné (Siluriformes, Callichthyidae) a monotypic genus? // *Acta Amazonica* 24: 311–314.
- Reis R. E 1998.** Anatomy and phylogenetic analysis of 343 the Neotropical Callichthyidae catfish (Ostariophysi, Siluriformes) // *Zoological Journal of the Linnean Society* 124: 105–168.
- Rosa R. Rubert M., Bertollo L. A. C., Martins-Santos I. C., Giuliano-Caetano L. 2009.** Coexistence of cytotypes and chromosomal mosaicism in *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) // *Biological Research* 42: 289-296.
- Sanchez S., Fenocchio A. S. 1996.** Karyotypic studies and cytotaxonomic considerations on *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes) from Argentina. *Cytologia* 61: 247-252.
- Schweizer D. 1980.** Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes // *Cytogenetic Cell Genetic* 27: 190-193.
- Schweizer D., Loidl J. 1987.** A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today* 9: 61-74.
- Sczepanski T. S., Noleto R. B., Kantek D. L. Z., Cortinhas M. C. S., Cestari M. M. 2007.** Classical and molecular cytogenetics of *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atheriniformes) from South coast of Brazil // *Journal of Fish Biology* 71: 453-460.
- Shimabukuro-Dias C. K., Oliveira C., Foresti F. (2004a).** Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Corydoradinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Genetics and Molecular Biology* 27(4): 549-554.

- Shimabukuro-Dias C. K., Oliveira C., Foresti F. 2004b.** Karyotype variability in eleven species of the genus *Corydoras* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae) // *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 15: 135-146.
- Shimabukuro-Dias C. K., Oliveira C., Foresti F. (2005).** Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Caryologia* 58(2): 102-111.
- Sumner, A. T. (1972).** A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Swarça A. C., Fenocchio A. S., Cestari M.M., Dias A. L. 2009.** Localization and Characterization of the 5S rDNA Bearing Chromosome in Two *Steindachneridion* Species by Means of Different Cytogenetic Techniques // *Cytologia* 74 (3): 323-327.
- Turner B. J., DiffooT N., Rasch E. M. 1992.** The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex // *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 3: 17-23.
- Vicari M. R., Noieto R. B., Artoni R. F., Moreira-Filho O., Bertollo L. A. C. 2008.** Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences // *Genetics and Molecular Biology* 31:173-179.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho pôde evidenciar em duas espécies de Callichthyidae da região Nordeste, especialmente do Estado da Bahia, características cromossômicas frequentemente encontradas em outras populações na família. Entretanto, também foram observados dados peculiares e de importância para inferências futuras no estudo deste grupo de peixes. De um modo geral, pode-se destacar as seguintes considerações sobre o presente estudo:

1. As populações de *Callichthys callichthys* e *Hoplosternum littorale* apresentaram, respectivamente, 54 e 60 cromossomos.
2. *C. callichthys* de ambas as localidades analisadas, apresentou um cromossomo B completamente eucromático semelhante ao primeiro par do complemento A, consistindo no primeiro relato deste tipo de cromossomo para o $2n=54$ na espécie.
3. As RONS em *C. callichthys* apresentaram-se extremamente polimórficas, com variação de número, tipo e localização dos cromossomos portadores dos sítios Ag-RONS, inclusive com detecção de acentuado heteromorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos, enquanto que em *H. littorale*, estas regiões foram simples, heteromórficas e coincidentes com a constrição secundária observadas na região terminal do braço curto do par 6.
4. As regiões ricas em pares de bases GC também foram bastante polimórficas em *C. callichthys*, onde a maioria dos sinais fluorescentes foram coincidentes com as RONS, sendo localizados alguns sítios CMA_3^+ não relacionados às RONS. Enquanto que *H. littorale* evidenciou constantemente dois pares de cromossomos acrocêntricos com sinais GC, sendo que destes, um par apresentou marcação terminal coincidente com as RONS e o outro marcação intersticial, provavelmente associada à heterocromatina.
5. Regiões $DAPI^+$ observadas no centrômero de alguns cromossomos de ambas as populações de *C. callichthys*, mostrou associação entre heterocromatina e regiões AT ricas e em *H. littorale* o DAPI não evidenciou marcações fluorescentes.
6. A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S confirmou os sinais Ag-RONS nas duas espécies analisadas, assim como o heteromorfismo de tamanho em alguns cromossomos; além de evidenciar sítios de DNAr que estavam inativos em *C. callichthys*.

7. A utilização da sonda de DNAr 5S mostrou múltiplos sinais em cromossomos distintos dos detectados pela sonda de DNAr 18S em ambas as espécies, sendo que *C. callichthys* apresentou sítios terminais e intersticiais e em *H. littoralle*, apenas sítios terminais foram observados.
8. Os dados aqui apresentados, além de promover o aumento da documentação cariotípica para ambas espécies, vêm enfatizar a diferença existente entre elas. Enquanto *Hoplosternum littorale* seguiu o padrão descrito anteriormente em outras populações, mostrando uma homogeneidade cariotípica, *C. callichthys* apresentou acentuado polimorfismo, sendo caracterizada como uma espécie com grande diversidade cromossômica, o que provavelmente deva estar associado a ocorrência de um complexo de espécies.