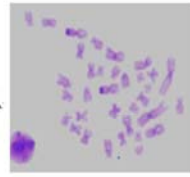
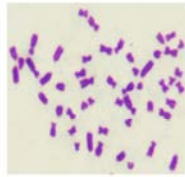




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

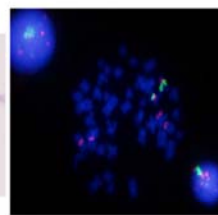
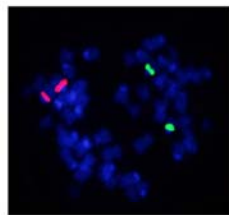
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO



SANDRA MARIOTTO

**ESTUDO CITOGENÉTICO CLÁSSICO E MOLECULAR EM
QUINZE ESPÉCIES DA TRIBO ANCISTRINI (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE) DE TRÊS BACIAS HIDROGRÁFICAS
BRASILEIRAS.**



SÃO CARLOS-SP

2008





Pós Graduação em
Genética e Evolução



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

SANDRA MARIOTTO

**ESTUDO CITOGENÉTICO CLÁSSICO E MOLECULAR EM
QUINZE ESPÉCIES DA TRIBO ANCISTRINI (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE) DE TRÊS BACIAS HIDROGRÁFICAS
BRASILEIRAS.**

SÃO CARLOS-SP

2008

Universidade Federal de São Carlos

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução

Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo Ancistrini (Siluriformes, Loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em ciências biológicas, área de concentração: genética e evolução.

Doutoranda: Sandra Mariotto

Orientador: Dr. Orlando Moreira Filho

Co-orientador: Dr. Liano Centofante, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT

São Carlos-SP, 2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M342ec

Mariotto, Sandra.

Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo Ancistrini (Siluriformes, Loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras / Sandra Mariotto. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

101 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Peixes. 2. Polimorfismo. 3. Siluriformes. 4. Loricariidae. 5. Variabilidade cromossômica. 6. Cromossomos sexuais. I. Título.

CDD: 575 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO
Via Washington Luís, Km 235 - Caixa Postal 676
CEP 13565-905 - São Carlos - SP - Brasil
<http://www.ppggev.ufscar.br>
e-mail ppggev@power.ufscar.br
Fone/Fax: (0XX16) 3351-8306



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **SANDRA MARIOTTO**, ex-aluna do Curso de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação, área de concentração Genética e Evolução, foi aprovada em exame público de tese no dia 19/12/2008, tendo defendido o trabalho intitulado "ESTUDO CITOGENÉTICO CLÁSSICO E MOLECULAR EM QUINZE ESPÉCIES DA TRIBO ANCISTRINI (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DE TRÊS BACIAS HIDROGRÁFICAS BRASILEIRAS", perante banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) – presidente; Prof. Dr. Liano Centofante (UFMT); Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo (UFSCar); Prof. Dr. Gilberto Moraes (UFSCar); Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG); Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG).

São Carlos, 13 de janeiro de 2009.




Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito
Coordenador do PPGGEV

ORIENTADOR:
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

CO-ORIENTADOR:
Prof. Dr. Liano Centofante

*Começou de servir outros sete anos,
dizendo: “E mais serviria se não fora
para tão longo amor tão curta a vida”*

Luís Vaz Camões

**À minha família, em qualquer grau de
parentesco e à família que o meu
coração conheceu,
meus poucos e fiéis amigos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força em todos os momentos e luz nas decisões e adversidades.

A Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Evolução pela oportunidade.

A Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pelo acesso a estrutura física que possibilitou a realização de parte deste trabalho.

Aos órgãos financiadores de pesquisa: FAPESP, CNPq e FAPEMAT por parte do suporte financeiro deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Moreira Filho que disse sim a todos os meus pedidos e decisões, podou meus devaneios, fundamentou e ampliou as boas idéias, além de valorizar meus esforços individuais.

Ao prof. Carlos Suetoshi Miyazawa, obrigada por possibilitar que eu desenvolvesse este trabalho próximo da minha família.

Ao meu amigo e co-orientador, prof. Liano Centofante, obrigada pelas preciosas colaborações, alegres coletas, espírito cooperativo e por me mostrar que devemos aguardar a hora da “colheita”, apesar das minhas ansiedades.

Aos professores doutores membros da Banca de qualificação: Silvia, Maria Tereza e Pedro pelas sugestões para a conclusão do trabalho; e aos professores doutores membros da banca de defesa: Marcelo Ricardo Vicari, Gilberto Moraes, Roberto Ferreira Artoni e Luis Antônio Carlos Bertollo. Espero que possamos estabelecer parcerias e amizades que enriqueçam nossos trabalhos.

A todos os professores da graduação e pós-graduação da UFMT e UFSCar com os quais sempre tive bons momentos de aprendizagem e amizade.

Aos professores que marcaram minha vida profissional, exemplos nos quais tentei me espelhar: Elizabete, professora de português da 8^a. Série; professora Vanda, de química do ensino médio; professora Maria Alice de biologia celular, Eva Galdino de genética, Aécio de embriologia, Duanra de imunologia, Saulo de parasitologia e Anacleto de zoologia na graduação; professora Flávia Nogueira de ecologia de ecossistemas, Germano Guarim de ecologia de campo e Marinez Marques, do mestrado; professores das disciplinas que cursei no doutorado, em especial ao Professor Gilberto (Giba), e demais educadores/mestres que, “quando realmente sábios não nos convidam aos templos do seus conhecimentos, mas sim, nos conduzem ao limiar de nossa própria mente”. Que tenham vida longa e sintam-se recompensados pelo exemplo como pessoas e educadores.

Ao técnico Francisco de Assis (essa gaúcha não é fácil), aos colegas de laboratório da UFMT: Oesley (vamos virar museus), Edson Jr., Raquel, Diones (valeu o apoio logístico) e Elisângela Dantas (nem tudo é palavrão).

Aos colegas da UFSCar: Daniel Blanco, Daniel Kantec, Welington, Elisângela Belafrente, Marcelo Bello, Rosângela, Débora, que me auxiliaram nas “corridas” incursões pelo laboratório da UFSCar.

Ao querido amigo Edson Lourenço pelas conversas animadoras, idéias e dicas; a querida amiga Lívia Mondin, minha irmã de coração: sempre trabalharemos juntas. A amiga Flávia Munin pela acolhida em sua casa, hospitalidade, amizade e confiança nessa forasteira; a Michele pela companhia, hospitalidade e amizade de sempre. Deus as abençoe.

Aos “co-orientados” de graduação e colegas de laboratório Rodrigo e Felipe que de vez em quando me faziam acreditar que eu sabia algumas coisas; e as orientadas de estágio da UNIC: Elizama, Thalita, Nilma e Jackeline. Espero ter contribuído nesse período de crescimento profissional e pessoal de vocês.

A direção, coordenação e colegas da Escola Estadual Adalgisa de Barros, especialmente ao colega e coordenador Juscelino; obrigada pelo incentivo para seguir em frente.

A UNIC e UFMT pela oportunidade maravilhosa de experiência no ensino superior, e a SEDUC/MT por permitir meu afastamento do ensino médio para desenvolver este trabalho.

Aos meus pais e irmãos que mesmo distantes rezaram e torceram de coração, obrigada.

À minha mãe, mulher mais admirável de força e coragem que conheço, pelo exemplo de perseverança e por nos mostrar que com trabalho e amor tudo é possível.

As cinco irmãs e ao meu irmão: além da família, a alegria da nossa amizade e companheirismo são as bases sólidas que nos dão força todos os dias.

Ao esposo Luiz Carlos, pelo companheirismo e ajuda nas coletas, paciência e espera nas minhas ausências e por acumular as funções de pai e mãe quando me ausentava; e as nossas filhas Maiara e Tayná, que não reclamaram pelas minhas viagens e sempre aguardaram ansiosas pelo retorno. Amo vocês.

A querida irmã, amiga e enfermeira Janderléia: partilhamos alegrias, enfrentamos momentos difíceis, mas sempre estivemos juntas. “Quando crescer quero ser como você”. Deus a abençoe.

As amigas e segundas mães das minhas filhas, que as auxiliaram nas minhas freqüentes ausências: Fátima (todo mundo quer uma madrinha assim), tia Vera, Alice, Carmela, Janderléia, Lilian e outras pessoas que de uma ou outra forma estiveram nos apoiando.

A amiga Carmela pelas sessões de massagens e acupunturas após as coletas e viagens.

Ao amigo e professor John Hall pelas animadas aulas de inglês e auxílio nos artigos.

Enfim, a todos que de uma ou outra forma contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal. Deus os abençoe!

RESUMO

A família Loricariidae é a segunda maior família de peixes de água doce com aproximadamente 700 espécies. Dentre os Loricariidae, a tribo Ancistrini se destaca com 217 espécies válidas na região neotropical. Os cascudos deste grupo medem cerca de 15 cm e possuem odontodes móveis que se invertem na região do opérculo. Estudos citogenéticos são verificados em apenas 10% das espécies até o presente. Neste trabalho, duas espécies do gênero *Lasiancistrus* e treze do gênero *Ancistrus* foram cariotipadas. Além da análise de citogenética clássica, também foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para localizar as regiões de rDNA 5S e 18S em 7 espécies do gênero *Ancistrus*. Os resultados evidenciaram uma variação dos números diplóides de $2n=34$, 40, 42, 50, 52 e 54 cromossomos nas espécies analisadas. Nas espécies do gênero *Lasiancistrus* o número diplóide foi de $2n=54$ cromossomos, RONS simples e pequenos blocos de heterocromatina constitutiva. Neste mesmo gênero não foram observadas diferenças cromossômicas entre machos e fêmeas, apenas citótipos distintos entre as espécies. Os resultados são discutidos com análises realizadas em outros gêneros do grupo Ancistrini. No gênero *Ancistrus* foi observado uma diversidade de citótipos e espécies. Na espécie *Ancistrus cuiabae* se observou um polimorfismo cromossômico e de rDNA 18S. O provável evento responsável por este polimorfismo foi uma inversão pericêntrica. Em duas outras espécies de *Ancistrus* de distintas populações foram verificados heteromorfismos cromossômicos e de heterocromatina constitutiva, sugerindo a ocorrência de cromossomos sexuais XX/XY e ZZ/ZW. As regiões organizadoras de nucléolos foram simples para todas as espécies, localizadas nas regiões terminais e intersticiais dos cromossomos. Com a técnica de FISH e sonda de rDNA 18S foi possível confirmar os dados obtidos com AgRON em sete espécies. Quanto ao rDNA 5S os resultados foram bastante diversificados, com apenas um par de cromossomos marcados, em *Ancistrus* sp 06, dois pares em *A. sp 04*, *A. sp 08* e *A. sp 13* e três pares nas espécies *A. cuiabae*, *A. sp 01*, *A. claro* e *A. cf. dubius*. Os cístrons de rDNA 5S e 18S foram sintênicos em quatro das sete espécies analisadas. Através da técnica de banda C foi possível verificar que os blocos de heterocromatina constitutiva são poucos e pequenos nas espécies com números diplóides $2n=50$ a 54, maiores e bem evidentes nas espécies com $2n=34$ a 42 cromossomos e com polimorfismos ou com prováveis

cromossomos sexuais. Além do número diplóide bastante variável, a tribo Ancistrini possui sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos; e, neste trabalho, evidenciando também a ocorrência de polimorfismo cromossômico, de rDNA 18S e de heterocromatina constitutiva. Realizadas pela primeira vez na tribo Ancistrini, as análises com hibridação *in situ* fluorescente confirmam a diversidade existente, especialmente no gênero *Ancistrus*, o mais derivado da tribo. Através destes resultados foi possível inferir que a estrutura cariotípica das espécies do gênero *Ancistrus* com números diplóides $2n=50$ a 54 cromossomos parece ser mais primitiva que aquela das demais espécies encontradas na Baixada Cuiabana e de locais com sedimentação mais intensa. Novas análises, utilizando-se de técnicas moleculares poderão auxiliar na compreensão da filogenia e evolução deste diversificado grupo de Loricariidae.

ABSTRACT

The Loricariidae Family is the second largest family of fresh water fish with approximately 700 species. Among the Loricariidae, the Ancistrini tribe distinguishes itself with 217 valid species distributed in the neotropical region. The catfish of this group measure an average of 15 centimeters in length and have moveable evertible odontodes in the operculum region. Cytogenetic studies have been made in only 10% of the species. In this study, fifteen species, two of the genus *Lasiancistrus* and thirteen of the genus *Ancistrus* were cytogenetically analyzed. Besides the classic analyses of cytogenetic, the technique of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used to locate the regions of rDNA 5S and 18S in seven species of the genus *Ancistrus*. The results showed diploid numbers of $2n=34$, 40, 42, 50, 52 and 54 chromosomes. In the species of the genus *Lasiacistrus*, the diploid number was $2n=54$ chromosomes, and there were simple NORs and some small blocks of constitutive heterochromatin. There were no chromosomal differences observed between males and females but there were distinct cytotypes among the species. The results are compared with analyses made with other genera of the Ancistrini group. In the genus *Ancistrus* diversity of species and chromosomal variation is surprising. In the species *Ancistrus cuiabae* chromosomal polymorphism and rDNA 18S were observed. The event that is probably responsible for this chromosomal polymorphism was a pericentric inversion. In four species of distinct populations chromosomal heteromorphism and constitutive heterochromatin were verified, thus suggesting that two populations possess XX/XY and ZZ/ZW sexual chromosomes. The nucleolar organizing regions (NORs) that appeared in the presence of silver nitrate were simple in all the species, located in the terminal and interstitial region of the chromosomes. With the FISH technique it was possible to confirm the data obtained with AgNOR in seven species. In respect to rDNA 5S the results were very diversified with only one pair of chromosomes marked, in *Ancistrus sp 06*; two pairs in *A. sp 04*, *A. sp 08* and *A. sp 13*; three pairs in *A. cuiabae*, *A. claro* and *A. cf. dubius*. The cistrons observed in rDNA 5S and 18S were syntenic in four of the seven species analyzed. Using technique of C band it was possible to verify the blocks of constitutive heterochromatin were few in number and small in size in the species with diploid numbers $2n=50$ to 54, but were bigger and stained in an evident manner in the species

with chromosomic polymorphisms, sexual chromosomes and $2n=34$ to 42 chromosomes. Besides the highly variable diploid number, the Ancistrini tribe has simple and multiple sexual chromosomes systems. In this study we confirmed the occurrence of chromosomic polymorphism, of rDNA 18S and of constitutive heterochromatin in new species. For the first time fluorescent *in situ* hybridization was done in the Ancistrini tribe and it confirmed the diversity existent, especially in the genus *Ancistrus*, which is the most derived of the tribe. With these results it was to infer that the species of the genus *Ancistrus* with diploid numbers $2n=50$ to 54 chromosomes are more primitive than the others founded in the Baixada Cuiabana with intense sedimentation. New analyses, using molecular techniques could help in understanding the phylogeny and evolution of this diversified group of Loricariidae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Informações sobre a citogenética atual dos Ancistrini.....	4,5
Tabela 02. Locais, número de exemplares e posição aproximada de latitude e longitude.....	13
Tabela 03. Média por população de alguns caracteres morfológicos, dos gêneros <i>Ancistrus</i> e <i>Lasiancistrus</i>	17
Tabela 04. Média por população de alguns caracteres morfológicos, do gênero <i>Lasiancistrus</i>	47
Tabela 05. Resultados das análises por espécies com sondas 5S e 18S e com AgRON, no gênero <i>Ancistrus</i>	58
Tabela 06. Espécies de acordo com as respectivas bacias hidrográficas e localização aproximada de acordo com o Igeo/MMA.....	70
Tabela 07. Resultados por espécie, em ordem crescente do número diplóide.....	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Mapa esquemático da região neotropical com recorte ampliado da área de estudo. Bacias Amazônica, Araguaia-Tocantins e Paraguai11
- Figura 02.** Fotos dos espécimes que foram analisadas de acordo com os locais definidos no mapa.....14
- Figura 03.** Fotos de alguns locais amostrados (a), (b) e (c); detalhes das rochas onde os espécimes raspam algas para se alimentarem (d) e (e).....18
- Figura 04.** Exemplar do gênero *Lasiancistrus* e do gênero *Ancistrus* com detalhes das medidas consideradas neste trabalho.....18
- Figura 05.** Pantanal view of the Arrombado bay and the sampling sites (a, b), *Ancistrus cuiabae* specimen with 110mm (c).....35
- Figura 06.** Karyotypes of *Ancistrus cuiabae*, after conventional Giemsa staining, showing the polymorphic second chromosome pair.35
- Figura 07.** Karyotypes of *Ancistrus cuiabae*, seqüencial C-banding evidencing the C-positive heterochromatin in the three cytotypes (a, b, c). In the boxes, chromosomes from the second pair after silver staining and FISH, the AgRONS and the 18S rDNA sites, respectively..... 35
- Figura 08.** Recorte do mapa do Brasil com a hidrografia dos estados de Rondônia e Mato Grosso, com os locais de coleta das espécies *Lasiancistrus cf schomburgkii* e *Lasiancistrus* sp 1, com detalhe de um espécime mostrando as vibrissas e odontodes.....45
- Figura 09.** Cariótipos de espécimes de *Lasiancistrus cf schomburgkii* do Rio Massangana, RO, em Giemsa: a) fêmea e c) macho. Banda C seqüencial com detalhe da RON no par 25, b) e d).....48

- Figura 10.** Cariótipos em Giemsa de duas fêmeas, a) e b) de *Lasiancistrus* sp 1 do Rio Cachoeira. Metáfase com banda C a') e RON sequencial, seta apontando o par que marcou com AgRON. Banda C b') e NOR em recorte no par 26.....49
- Figura 11.** Metáfases em Giemsa convencional e recorte dos cromossomos evidenciando as regiões organizadoras de nucléolos a partir da impregnação pelo nitrato de Prata59
- Figura 12.** Metáfases de espécies do gênero *Ancistrus* com sondas de rDNA 5S e 18S. *Ancistrus cuiabae* a), *Ancistrus* sp 13 b) e b'), *Ancistrus cf dubius* c), *Ancistrus* sp 08 e), *Ancistrus* sp 06 g) e g'), *Ancistrus* sp 04 e *Ancistrus claro* h) e h').....60
- Figura 13.** Idiograma dos cromossomos portadores da DNA ribossomal (a-g) 5S e 18S; e prováveis eventos que originaram os pares de cromossomos com rDNA 5S e 18S sintênicos e demais tipos de cromossomos portadores dos cístrons ribossomais.....61
- Figura 14.** Recorte do mapa da hidrografia do Brasil evidenciando as três bacias hidrográficas do Mato Grosso. Amazônica, Araguaia-Tocantins e Paraguai com destaques dos locais amostrados e as respectivas espécies do gênero *Ancistrus*.....71
- Figura 15.** Cariótipo de *Ancistrus* sp 03 a) do Córrego Pari, com RON no par 21, cariótipo de *Ancistrus* sp 01 do Córrego do Pipa b) com banda C b').....75
- Figura 16.** Cariótipos de um macho a) e de uma fêmea b), em Giemsa, da espécie *Ancistrus claro* do Rio Coxipó, com a RON no par 21. a') Banda C evidenciando poucos blocos heterocromáticos.....75
- Figura 17.** Cariótipos de macho a) e c) fêmea em Giemsa de *Ancistrus* sp 06, do Rio Matrixã. Banda C em metáfases de macho b) e fêmea b'). As setas apontam cromossomos que marcam com AgRON. Em recorte, par 21 com RON.....76
- Figura 18.** Cariótipos em Giemsa de *Ancistrus* sp 04 de Tangará da Serra, a) macho e b) fêmea. b') Banda C, em recorte, RON no par 23.....77

- Figura 19.** Cariótipos de macho a) e fêmea b) de *Ancistrus tombador* do Rio Preto, em Giemsa. B') banda C e RONS.....77
- Figura 20.** Cariótipos de fêmea a) e macho b) de *Ancistrus* sp 10, de Rondonópolis com prováveis cromossomos sexuais ZZ/ZW, em Giemsa. Banda C seqüencial c) e d) com os cromossomos portadores da RON, par 5.....78
- Figura 21.** Cariótipos de fêmea a) e macho b) de *Ancistrus* sp 11, de Cáceres, com os prováveis cromossomos sexuais, em Giemsa. Banda C seqüencial com detalhe da RON no par 15 c) e d).....79
- Figura 22.** Cariótipo de *Ancistrus* sp 12, fêmea, do Córrego Santa Cruz a) com banda C seqüencial b) e RON no par 5, em detalhe. Metáfases de um macho e uma fêmea, respectivamente, com setas apontando o par heteromórfico c), c') e par da RON.....80
- Figura 23.** Cariótipo de *Ancistrus* sp 13 do Córrego Salgadinho a) Giemsa b) com banda C seqüencial, a') e b') destacando metáfases de outros espécimes em banda C. Banda C com polimorfismo de heterocromatina c) e RON seqüencial.....80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Considerações sobre peixes neotropicais.....	1
1.2. Considerações sobre a ordem dos Siluriformes: a família Loricariidae, subfamília Hypostominae e tribo Ancistrini.....	2
1.2.1. Considerações sobre a citogenética e genética dos Loricariidae.....	3
1.3. Sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos em peixes.....	6

2. OBJETIVOS.....	9
--------------------------	----------

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da área de coleta e estudo.....	10
3.2. Material.....	12
3.2.1. Descrição morfológica dos gêneros e espécies e características gerais observadas nas coletas diurnas e noturnas.....	15
3.2.2. Parâmetros morfométricos médios dos exemplares das populações.....	16

3.3. Métodos

3.3.1. Técnicas de citogenética clássica.....	19
3.3.2. Técnicas de citogenética molecular.....	21
3.3.3. Análises cromossômicas.....	27

4. RESULTADOS

Capítulo I. Polimorfismo cromossômico e de rDNA 18S em <i>Ancistrus cuiabae</i> Knaack, 1999 (Loricariidae, Ancistrini).....	29
I.1. Introduction	31
I.2. Material and methods.....	33
I.3. Results.....	34
I.4. Discussion.....	36
I.5. References.....	41
Capítulo II. Citogenética clássica de duas espécies do gênero <i>Lasiancistrus</i> Regan, 1904 (Ancistrini, Loricariidae) das Bacias Araguaia-Tocantins e Amazônica.....	42
II.1. Introdução.....	42
II.2. Material e métodos.....	44
II.3. Resultados.....	46
II.4. Discussão.....	50
II.5. Referências bibliográficas.....	54
Capítulo III. Diversificação de sítios do DNA ribossômico 5S e 18S em sete espécies do gênero <i>Ancistrus</i> (Loricariidae, Ancistrini) de diferentes bacias hidrográficas do Mato Grosso, Brasil.....	55
III.1. Introdução.....	55

III.2. Material e métodos.....	56
III.3. Resultados.....	57
III.4. Discussão.....	62
III.5. Referências bibliográficas.....	67
Capítulo IV. Diversidade e evolução cromossômica no gênero <i>Ancistrus</i> (Loricariidae, Ancistrini) das três bacias hidrográficas do Estado do Mato Grosso.....	68
IV.1. Introdução.....	68
IV.2. Material e métodos.....	69
IV.3. Resultados.....	72
IV.4. Discussão.....	81
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Considerações sobre peixes neotropicais

A ictiofauna de água doce neotropical é a mais rica e diversificada de todo o mundo. Estimativas mais recentes sugerem que o número de espécies existentes nos diversos ecossistemas aquáticos do planeta seria entre 23.000 a 25.000 (Brum, 1995; Malabarba *et al.*, 1998), sendo que a maioria estaria em rios tropicais (Lowe-Mcconnell, 1999). De 30 a 40% de toda a ictiofauna neotropical é desconhecida, segundo Vari e Malabarba (1998). Além disso, podemos considerar a diversidade de peixes neotropicais surpreendente, não somente quanto ao número de espécies, mas, principalmente quando avaliamos em termos comparativos de densidade específica (Malabarba *et al.*, 1998). Levantamentos da diversidade de peixes de água doce da América do Sul e Central consideram que existem cerca de 4.500 espécies válidas e podem existir em torno de 1.600 ainda não descritas (Reis *et al.*, 2003).

As ordens mais representativas da ictiofauna neotropical são os Siluriformes e os Characiformes. A imensa variedade de ambientes ecológicos existentes, teria proporcionado no decorrer do tempo, às espécies destas ordens, o desenvolvimento de espetaculares irradiações adaptativas, iniciadas durante o longo período de isolamento no Terciário (Géry, 1977).

Segundo Böhlke *et al.* (1978), muitas dificuldades são relacionadas ao estudo de peixes, desde a complexidade dos sistemas fluviais e a dificuldade de acesso a todos tributários até o elevado número de espécies, a diversidade de ambientes em que estão distribuídas, o elevado custo das expedições de coletas, além das técnicas de amostragem serem limitadas.

Mesmo com as dificuldades citadas, as pesquisas a respeito da ictiofauna neotropical têm avançado significativamente nos últimos anos. A aplicação de técnicas citogenéticas bem como marcadores genéticos e moleculares visando esclarecimentos de aspectos evolutivos é indispensável para o conhecimento e a manutenção da biodiversidade.

1.2 - Considerações sobre a ordem dos Siluriformes: a família Loricariidae, subfamília Hypostominae e tribo Ancistrini

A posição taxonômica dos Siluriformes proposta por Fink & Fink (1981) pode ser assim representada: classe Osteichthyes, subclasse Actinopterygii, infraclasse Teleostei, superordem Ostariophysi, série Otophysi, ordem Siluriformes.

Os Siluriformes são considerados grupo irmão dos Gymnotiformes, sendo, portanto, mais próximos destes do que dos Characiformes (Brum, 1995). Representam o segundo maior grupo em número de espécies da região neotropical, ultrapassado apenas pelos Characiformes.

São peixes de hábito geralmente bentônico e noturno, mas com algumas espécies mais ativas. Algumas espécies apresentam o corpo nu (sem escamas), o que lhes dão a denominação de peixes de couro, mas também podem apresentar o corpo parcial ou totalmente coberto por placas ósseas (doradídeos e loricariídeos). Frequentemente, possuem três pares de barbilhões, o primeiro raio da nadadeira dorsal e das nadadeiras peitorais transformados em acúleo pungente e podem ou não apresentar nadadeiras adiposas (Britski *et al.*, 1999; Fisch-Muller, 2003).

A família Loricariidae é a que se apresenta mais amplamente distribuída pela América do Sul, dentre os Siluriformes, com aproximadamente 700 espécies. Segundo trabalhos de Armbruster (2004) e Reis *et al.* (2006) a família Loricariidae é a segunda maior família de peixes neotropicais em termos de número de espécies e está dividida em seis subfamílias: Neoplecostominae, Lithogeneinae, Hypostominae, Hypoptopomatinae, Delturinae e Loricariinae. Os indivíduos desta família são conhecidos popularmente como cascudos ou acarís. Apresentam o corpo dorso/ventralmente achatado e coberto por placas ósseas, possuem dentes dérmicos chamados odontodes e se alimentam de algas e pequenos invertebrados presentes no fundo dos rios e lagos (Britski, 1972; Isbrucker, 1980; Britski, *et al.*, 1999). São explorados como peixes ornamentais, como iscas por pescadores e servem como fonte de proteína a alguns ribeirinhos. Apesar das características morfológicas, que dificultam sua predação, estão presentes na alimentação de biguás, jacarés e outros Siluriformes de maior porte, como pintados e caxaras (Machado, 2003).

A subfamília Hypostominae compreende as tribos Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini (Armbruster, 2004). A tribo Ancistrini possui cerca de 217 espécies válidas distribuídas em 29 gêneros, sendo a maior em número de espécies dentre os loricarídeos e mais diversificada na região amazônica (Fisch-Muller, 2003). Dados mais recentes consideram os Ancistrini, no sistema hidrográfico brasileiro, com 21 gêneros, totalizando 78 espécies nominais, encontradas principalmente nos rios da Amazônia (Sarmiento-Soares & Ingenito 2007). De acordo com dados do All Catfishes Species Inventory, cerca de 130 espécies novas, somente na subfamília Hypostominae, aguardam pela descrição taxonômica.

Os Ancistrini possuem boca inferior suctorial com disco áspero nos lábios que lhes permitem a raspagem de algas nas rochas e papilas adesivas para a fixação em águas lótic; o corpo é coberto com placas ósseas sendo que o focinho de muitas espécies é liso e com cirros longos e numerosos nos machos e curtos nas fêmeas; odontodes móveis na região do opérculo lhes conferem capacidade defensiva, possuem hábitos noturnos ou crepusculares, territorialistas, com cuidado parental; constroem ninhos em fendas de rochas, buracos de troncos e permanecem nestes locais e sob rochas durante o dia (Burgess, 1989; Zuanon, 1999; Fisch-Muller, 2003).

Grande parte dos espécimes da tribo Ancistrini são mais conhecidos por coletores de peixes ornamentais, especialmente exemplares raros e com colorações exóticas. O interesse acadêmico por este grupo é recente e a maior parte dos trabalhos se refere às descrições taxonômicas.

1.2.1. A citogenética e genética dos Loricariidae

Em relação a citogenética dos Loricariidae, várias espécies já foram estudadas em diferentes regiões do país, porém diante da grande diversidade do grupo, estes estudos ainda são incipientes.

Artoni & Bertollo (1996) e Artoni *et al.* (1998) analisaram diferentes espécies da subfamília Hypostominae, encontrando uma variação do número diplóide modal de $2n=68$ a $2n=80$ cromossomos. Na subfamília Hypoptopomatinae, Andreatta *et al.* (1993, 1994) mostraram que o valor diplóide modal é de $2n=54$ cromossomos na maior parte das espécies analisadas. Em Loricariinae, Giuliano-Caetano & Bertollo (1994) relataram a existência de um polimorfismo cromossômico em *Rineloricaria latirostris* e o

número diplóide ocorre desde $2n=36$ a $2n=74$. Mais tarde, Artoni & Bertollo (2001) fizeram uma revisão sobre a tendência evolutiva dos cromossomos dos Loricariidae e verificaram a ocorrência de números diplóides de 52 a 74 cromossomos em distintas espécies. Estes mesmos autores, através desta revisão, sugerem que a maioria das espécies mantêm a estrutura cariotípica relativamente conservada, com exceção do gênero *Hypostomus*.

Os trabalhos de citogenética nos Ancistrini são bastante recentes. Até 2003 apenas três trabalhos relatavam o número diplóide de $2n=52$ cromossomos nas espécies analisadas (Artoni, 1996; Lara, 1998 e Artoni & Bertollo, 2001). A partir de novas pesquisas, como exposto na tabela abaixo, a variação do número diplóide no presente é de $2n=34$ a $2n=54$ cromossomos, com espécies e números diplóides bastante distintos dos extremos (Alves *et al.*, 2003; Mariotto *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2005; Mariotto & Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al.*, 2006, 2007 e 2008).

Tabela 01. Informações sobre a citogenética atual dos Ancistrini ($2n$ =número diplóide; m=metacêntrico, sm=submetacêntrico, st=subtelocêntrico, a=acrocêntrico; C. Sex.=cromossomos sexuais; RONS=Regiões Organizadoras de nucléolos, par marcado e posição no cromossomo).

Espécie	Local / Estado	$2n=$	C. Sex	RONs	Ref.
<i>Ancistrus cuiabae</i>	Arrombado/MT	34		m,a 2. terminal, intersticial	11
<i>Ancistrus</i> n.sp.1	São Francisco/AC	38		m 5. intersticial	1
<i>Ancistrus</i> sp 1 “Balbina”		38,40	XX, XY ₁ Y ₂	m 12. terminal	10
<i>Ancistrus</i> sp 13	Salgadinho/MT	40		sm 18 terminal	12
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal/MT	42		sm 16. intersticial	2
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal/MT	42	XX/XY	sm 16. intersticial	2
<i>Ancistrus</i> sp 10	Rio Vermelho/MT	42	ZZ/ZW	m 5. intersticial	12
<i>Ancistrus</i> sp 11	Rio Araputanga/MT	42	XX/XY	sm 15. intersticial	12
<i>Ancistrus</i> sp 12	Sta Cruz/MT	42		m 5. intersticial	12
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal/MT	44	ZZ/ZW	sm 13. intersticial	3
<i>Ancistrus</i> sp.	Iguaçu/PR	48		st . terminal	4
<i>Ancistrus ranunculus</i>	Xingu/PA	48		st 15 proximal	5
<i>Ancistrus ranunculus</i>	Xingu/PA	48		st 16. intersticial	9
<i>Ancistrus</i> sp 06	Matrixã/MT	50		a 21 terminal	12
<i>Ancistrus tombador</i>	Rio Preto/MT	50		a 20 terminal	12

<i>Ancistrus multispinnis</i>	Itapocu/SC	52		st 17. terminal	1
<i>Ancistrus n. sp.2</i>	Betari/SP	52		st 24. terminal	1
<i>Hemiancistrus sp.</i>	Araguaia/MT	52		sm 9. terminal	6
<i>Hemiancistrus spinosissimus</i>	Araguaia/MT	52		sm 17.terminal	8
<i>Hemiancistrus spilomma</i>	Araguaia/MT	52	ZZ/ZW	m 29, 3; sm, 8.terminal	8
<i>Ancistrus sp "Piaguçu"</i>	Aiapuá/AM	52	ZZ/ZW	a 26. terminal	9
<i>Megalancistrus aculeatus</i>	Paraná/PR	52		sm. intersticial	4
<i>Panaque nigrolineatus</i>	cf. Araguaia/MT	52		a. terminal	6
<i>Baryancistrus niveatus</i>	cf. Xingu/PA	52		m 3. intersticial	7
<i>Baryancistrus sp.1</i>	Jarí/PA	52		sm 18. Intersticial	5
<i>Baryancistrus sp.2</i>	Xingu/PA	52		m 6. intersticial	5
<i>Baryancistrus sp.3</i>	Xingu/PA	52		m 4. intersticial	5
<i>Parancistrus sp.1</i>	Xingu/PA	52		m 8p. intersticial	5
<i>Peckoltia vittata</i>	Xingu/PA	52		sm 9. terminal	5
<i>Peckoltia sp.1</i>	Jarí/PA	52		sm 10, st 25 terminal	5
<i>Peckoltia sp.2</i>	Jarí/PA	52		sm 17; 18. terminal	5
<i>Ancistrus sp "Barcelos"</i>	Demeni//AM	52	Z ₁ Z ₁ Z ₂ Z ₂ / Z ₁ Z ₂ W ₁ W ₂	a 23. terminal	10
<i>Ancistrus sp 04</i>	Sepotuba/MT	52		a 23. intersticial	12
<i>Ancistrus claro</i>	Rio Coxipó	54		a 21. intersticial	12
<i>Ancistrus sp 01</i>	Córrego Pipa/MT	54		a 21. intersticial	12
<i>Ancistrus sp 03</i>	Córrego Pari/MT	54		a 21. intersticial	12
<i>Lasiancistrus Schomburgkii</i>	cf. Massangana/RO	54		st 25. terminal	12
<i>Lasiancistrus sp 1</i>	Cachoeira/MT	54		st 26 terminal	12

Referências: 1 Alves *et al.* (2003, 2006); 2 Mariotto *et al.* (2006); 3 Mariotto *et al.* (2004); Lara (1998); 5 Souza (2003); 6 Artoni e Bertollo (2001); 7 Souza *et al.*(2004); 8 de Oliveira *et al.* (2006); 9 de Oliveira *et al.* (2007); 10 de Oliveira *et al.* (2008); 11 Mariotto *et al.* (submetido); 12 presente estudo.

Em relação aos estudos de genética molecular em Loricariidae poucos trabalhos têm sido realizados. Destacam-se Montoya-Burgos *et al.* (1998) que analisaram seqüências mtRNA 12S e 16S de 19 espécies de loricariídeos com inferências a filogenia dos mesmos. Posteriormente, Montoya-Burgos (2003) testou se as alterações paleohidrológicas causaram a diversificação da ictiofauna neotropical através de uma hipótese hidrogeológica com base nas relações filogenéticas de 51 espécies do gênero *Hypostomus*. As análises de seqüências da região controladora do mtDNA indicaram que *Hypostomus* pode ser dividido em quatro clados monofiléticos, e permitiu a identificação de sete principais eventos cladogenéticos associados, temporalmente, a alterações hidrogeológicas. Fisch-Muller *et al.* (2001) fizeram eletroforese de aloenzimas de duas espécies alopátricas do gênero *Ancistrus*. Com esta técnica foi possível verificar os diferentes alelos nas duas populações e auxiliou na confirmação de que se tratava de espécies distintas.

1.3. Sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos em peixes

Além da diversidade morfológica e cariotípica os peixes neotropicais demonstram também uma variedade de sistemas de cromossomos sexuais, desde os sistemas mais simples até sistemas mais complexos.

Moreira Filho *et al.* (1993) relatam à ocorrência de 05 diferentes sistemas de cromossomos sexuais em peixes neotropicais: ZZ/ZW, XX/XY, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 e ZZ/ZW_1W_2 . Um novo sistema múltiplo foi descrito recentemente, $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$ por de Oliveira *et al.* (2008).

Cromossomos sexuais em Ancistrini foram relatados pela primeira vez por Mariotto *et al.* (2004) e Mariotto & Miyazawa (2006), que verificaram a existência de dois sistemas de cromossomos sexuais simples, ZZ/ZW e XX/XY, para o complexo de espécies *Ancistrus* cf. *dubius* da bacia do Paraguai. Posteriormente, de Oliveira *et al.* (2006 e 2007) descreveram a ocorrência de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW na espécie *Hemiancistrus spilomma* de um rio da bacia Araguaia-Tocantins e XX/XY em espécies do gênero *Ancistrus* da bacia Amazônica.

A maior parte das espécies de peixes neotropicais não apresentam diferenciação nos cromossomos de machos e fêmeas quando analisados com coloração convencional (Giemsa), porém, com técnicas de bandamentos é possível

verificar marcações cromossômicas em apenas um dos sexos, como ocorre em *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreatta *et al.*, 1993), *Characidium gomesi* (Maistro *et al.*, 1996), *Hypostomus* sp. (Artoni *et al.*, 1998), onde se constataram segmentos diferenciais de heterocromatina constitutiva no cromossomo W. Casos semelhantes mas que descrevem sistemas sexuais do tipo XX/XY foram encontrados em *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta *et al.*, 1992), *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2000), complexo *Ancistrus cf. dubius* (Mariotto & Miyazawa, 2006), entre outros.

Segundo Galetti *et al.* (1996) em muitos dos casos de cromossomos sexuais, a diferenciação entre X e Y, ou Z e W, ocorre através do acúmulo de heterocromatina. Entretanto, em *Ancistrus cf. dubius* (Mariotto & Miyazawa, 2006) o processo de diferenciação sexual cromossômica ocorreu pela heterocromatinização do cromossomo X enquanto o cromossomo Y, totalmente eucromático, provavelmente mantém a estrutura cromossômica ancestral. Esta e outras hipóteses sobre cromossomos sexuais em peixes foram consideradas numa revisão feita por Almeida-Toledo & Foresti (2001).

Conforme Centofante *et al.* (2002), 55 casos de cromossomos sexuais heteromórficos haviam sido registrados para a ictiofauna neotropical, dos quais 64% referiam-se a heterogametia masculina e apenas 36% a heterogametia feminina.

Na literatura encontramos muitas hipóteses para a origem dos cromossomos sexuais, como a que sugere que as regiões heteromórficas que se apresentam nos homólogos sexuais são oriundas de recombinações meióticas e poderiam isolar os genes envolvidos na determinação do sexo (Ohno, 1967).

Na diferenciação dos cromossomos sexuais simples, dos tipos XY ou ZW, o acúmulo de heterocromatina é tido como um mecanismo importante na origem dos mesmos (Galetti *et al.*, 1996). Já nos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos os rearranjos cromossômicos são citados como os mecanismos fundamentais na origem desses complexos sistemas. O padrão de bandamento C observado nos cromossomos sexuais múltiplos refere-se a porção de heterocromatina pré-existente, envolvida inicialmente na origem dos cromossomos sexuais. Assim, após a diferenciação, não ocorreria acúmulo de heterocromatina em nenhum dos elementos que compõem os multivalentes, pois poderia dificultar o pareamento dos mesmos, inviabilizando estes sistemas (Moreira-Filho *et al.*, 1993).

A heterocromatinização de cromossomos sexuais em *Ancistrus* é um evento raro mas pode ter ocorrido em outras espécies deste gênero e a presença ou ausência de mecanismos de cromossomos sexuais não pode ser interpretada, *a priori*, como uma

proximidade filogenética entre espécies (de Oliveira, 2006). Somente ampliando as pesquisas para novas populações e espécies e com o uso de outras metodologias, como análises meióticas, genética molecular, poderemos ter considerações mais concisas a respeito da evolução dos cromossomos sexuais na tribo Ancistrini.

A região Centro Oeste é caracterizada por ter uma grande diversidade de espécies da ictiofauna, composta por rios que partem para três extensas bacias hidrográficas brasileiras e, considerada como um grande dispensor de águas. Por outro lado, a diversidade de espécies e o número reduzido de trabalhos de citogenética, genética e, até o presente, a inexistência de análises de rDNA 5S e 18S nos Ancistrini, são desafios quando se pretende inferir sobre a evolução e filogenia deste táxon, e justificam a proposição deste trabalho.

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de mais informações sobre a citogenética e evolução dos Ancistrini (Loricariidae, Siluriformes); foram objetivos do presente trabalho:

- a. realizar análises citogenéticas em populações de espécies da tribo Ancistrini, presentes nos rios e córregos das três bacias hidrográficas brasileiras: Bacia do Paraguai, Bacia Araguaia-Tocantins e Bacia Amazônica, para verificar a extensão da diversidade cromossômica apresentada por esta tribo;
- b. tendo em vista a grande diversidade de sistemas de cromossomos sexuais encontrada nesse grupo de peixes, desde os sistemas mais simples como XX/XY, ZZ/ZW até os sistemas mais complexos como os múltiplos XX/XY₁Y₂ e Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂, verificar a existência desses sistemas em outras espécies ainda não analisadas, bem como identificar os prováveis rearranjos que atuaram na diversidade de cromossomos sexuais;
- c. Analisar a distribuição dos sítios de rDNA 5S e 18S, com intuito de inferir sobre a participação desses marcadores nos processos de evolução cariotípica dos Ancistrini;
- d. com base nas análises cariotípicas da localização das regiões organizadoras de nucléolos e na observação da heterocromatina constitutiva discutir alguns prováveis eventos que propiciaram a diversificação cromossômica no gênero *Ancistrus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Características dos locais de coleta

O estado do Mato Grosso é banhado por três diferentes bacias hidrográficas: Bacia do Paraguai, Bacia Amazônica e Bacia Araguaia-Tocantins. Além da diversidade de sistemas aquáticos a existência de vegetação de três ecossistemas: Amazônia, Cerrado e Pantanal favorecem a diversidade ictiofaunística nestes sistemas aquáticos. O presente trabalho se desenvolveu com coletas de exemplares da tribo Ancistrini nas bacias hidrográficas do estado de Mato Grosso e do estado de Rondônia, Brasil, especialmente córregos e pequenos rios pertencentes as três bacias, conforme a tabela 02 e figuras 01 e 02. As coletas foram realizadas em diversas épocas do ano, no período de janeiro/2006 a julho/2008, de acordo com os pontos de ocorrências das espécies, como se verifica no mapa destes estados. As latitudes e longitudes aproximadas se baseiam nos dados do site do Ministério do Meio Ambiente, Mapas I3Geo 4.0.

Os rios e córregos onde ocorreram as coletas possuem características semelhantes, na maioria; águas limpas e lólicas, na maior parte do ano, rios com muitas rochas, alguns com pequenas cachoeiras, abundância de microalgas sobre as rochas e poucos locais com assoreamento e/ou pressão antrópica intensa (fig. 03, a, b, c). Nos locais com características diferentes das supracitadas não foram encontrados espécimes desta subfamília, com exceção, apenas, da baía Arrombado que é relativamente eutrofizada no auge da seca. No entanto, neste local há abundância de microalgas e locais de refúgios nos troncos ociosos submersos e restos de pontilhões, que servem de abrigo a espécie *Ancistrus cuiabae*, única a ocupar um habitat lêntico, distinto dos demais onde as outras espécies do gênero foram encontradas.

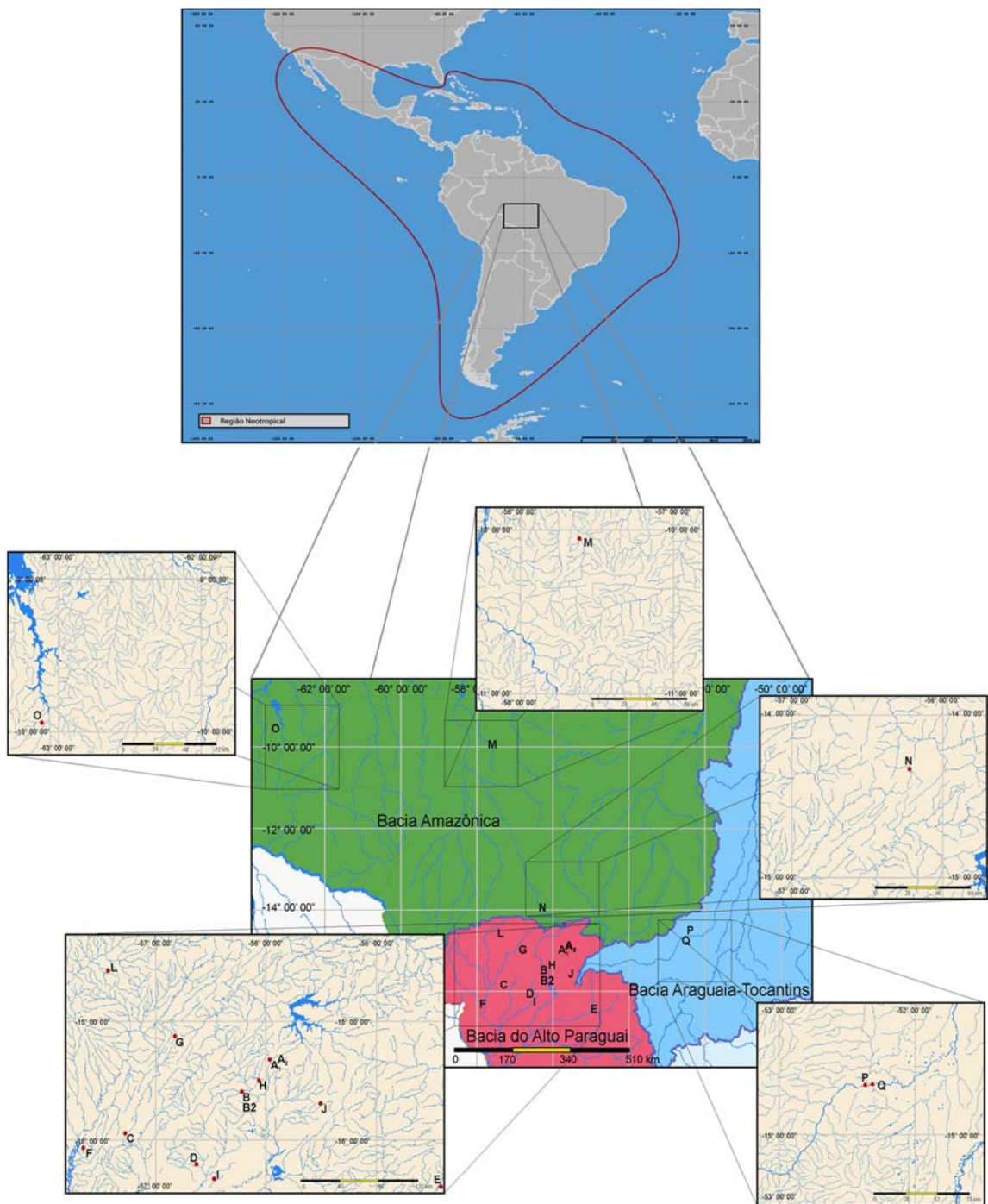


Figura 01. Mapa esquemático da região Neotropical com recorte ampliado da área de estudo. Bacia Amazônica (verde): locais M, N, O; Bacia Araguaia-Tocantins (azul): locais P, Q; Bacia do Paraguai (rosa): locais A, A2, B, B2, C, D, E, F, G, H, I, J e L. Fonte: Mapas interativos I3geo-versão 4.0. Ministério do Meio Ambiente, com adaptações.

3.2. Material

Foram analisados 224 espécimes de 15 populações de acordo com a tabela 02 e figura 01, coletados em rios e córregos pertencentes às bacias do Paraguai, bacia Amazônica e bacia Araguaia-Tocantins, nos Estado do Mato Grosso e Rondônia. Espécimes das populações estão depositados no museu (MCT) da PUC/RS e foram identificadas por Alexandre Cardoso e Tiago Carvalho. As espécies do gênero *Lasiancistrus* e a espécie *Ancistrus tombador*, coletadas recentemente, foram analisadas e classificadas de acordo com trabalhos taxonômicos específicos e recentes, bem como, por imagens e dados morfométricos enviados a Sonia Fisch-Muller, do Muséum d' Histoire Naturelle, Genève, Switzerland (comunicação pessoal).

Tabela 02. Locais, número de exemplares e posição aproximada de latitude e longitude

Bacia	Espécie	Número machos (M) e fêmeas (F)	Local/Município	Georeferenciamento aproximado de acordo com o MTSAT/SEMA
Paraguai	<i>Ancistrus cf. dubius</i>	08 M e 08 F	A. Rio Coxipó/ Chapada dos Guimarães	15°21'59"S 55°57'11"W
			B. Córrego Pari /Cuiabá	15°36'6"S 56°12'19"W
			C. Córrego Flechas/ Cáceres	15°58'7"S 57°19'7" W
			D.Córrego Fundo /Poconé	16°14'17"S 56° 37'31"W
	<i>Ancistrus sp 10</i>	06 M e 04 F	E. Rio Vermelho/ Rondonópolis	16°28'39"S 54° 35'39"W
	<i>Ancistrus sp 11</i>	03 M e 06 F	F. Rio Piraputanga/Cáceres	16°3'33"S 57° 40'33"W
	<i>Ancistrus sp 08</i>	07 M e 08 F	G. Rio Curruçupira/ Barra do Bugres	15°7'59"S 56°49'47"W
	<i>Ancistrus sp 12</i>	05 M e 06 F	H. Córrego Santa Cruz/ Cuiabá	15°36'35"S 56° 03'12"W
	<i>Ancistrus cuiabae</i>	15 M e 15 F	I. Baía Arrombado/ Poconé	16°21'21"S 56°27'55"W
	<i>Ancistrus claro</i>	11 M e 10 F	A2. Rio Coxipó/ Chapada dos Guimarães	15°21'59"S 55°57'11"W
<i>Ancistrus sp 03</i>	06 M e 06 F	B2. Córrego Pari /Cuiabá	15°36'6"S 56°12'19"W	
<i>Ancistrus sp 01</i>	06 M 07 F	J. Córrego Pipa, Serra de São Vicente	15°41'23"S 55°29'48"W	
<i>Ancistrus sp 04</i>	12 M 15F	L. Córrego São José e Rio Sepotuba/ Tangará da Serra	14°33'49"S 57°24'32"W e 14°41'35"S 57°48'14"W	
Bacia Amazônica	<i>Ancistrus sp 06</i>	9 M e 05 F	M. Rio Matrixã/ Nova Monte Verde	10°3'7"S 57°36'27" W
<i>Ancistrus tombador</i>	08 M e 05 F	N. Rio Preto/Diamantino	15°2' 12"S 56° 13' 33"W	
<i>Lasiancistrus cf. schomburgkii</i>	07M e 04 F	O. Rio Massangana/ Ariquemes	9° 56' 29"S 63° 6' 58"W	
Bacia Araguaia/ Tocantins	<i>Ancistrus sp 13</i>	11 M e 06 F	P. Córrego Salgadinho/ Nova Xavantina	14°40'14"S 52° 21'50"W
<i>Lasiancistrus sp 1</i>	02 M e 03 F	Q. Rio Cachoeira/ Nova Xavantina	14°35'54"S 52° 23'33"W	

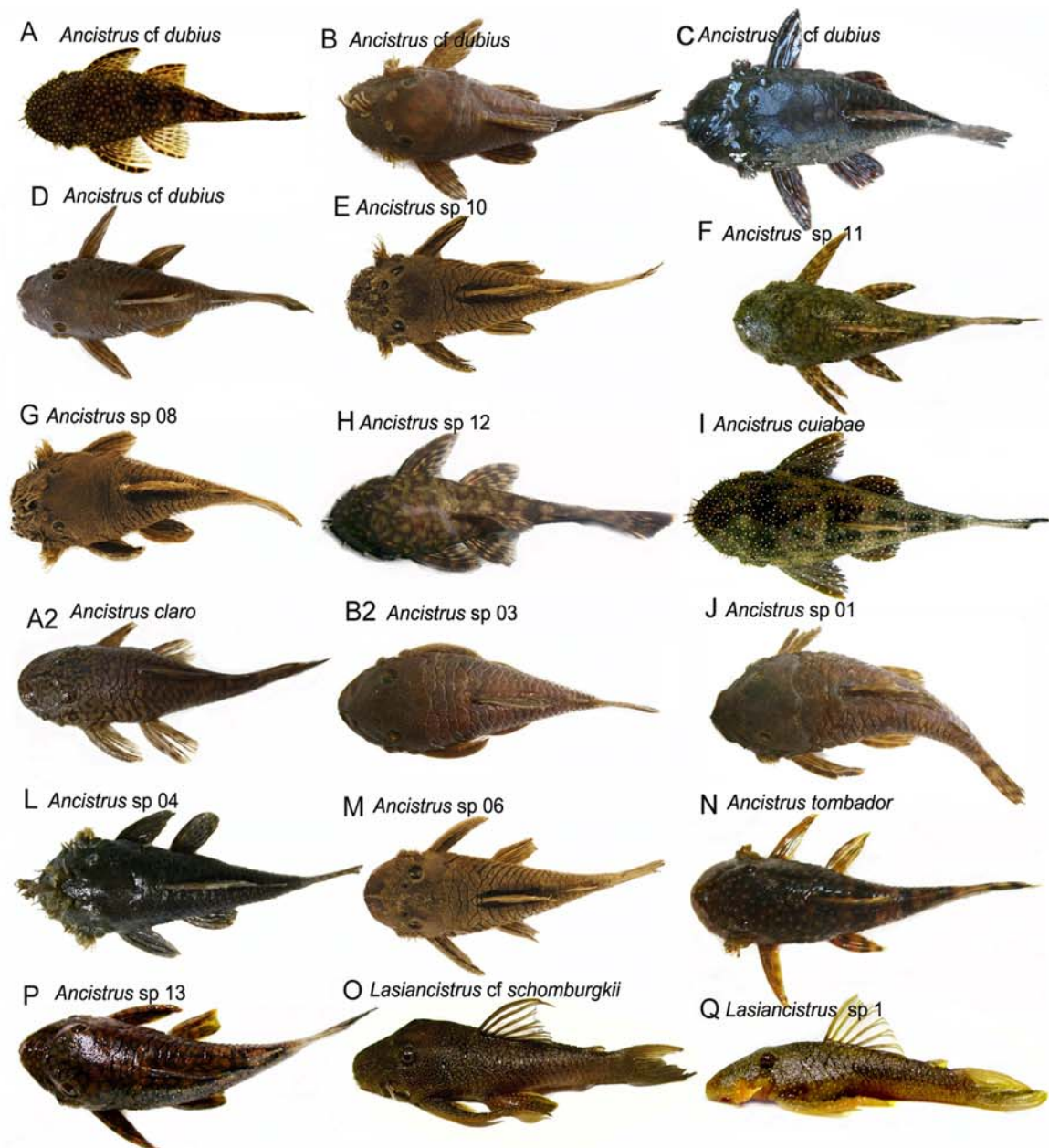


Figura 02. Fotos das espécies que foram analisadas de acordo com os locais definidos no mapa. Gênero *Ancistrus*: **A e A2** Rio Coxipó, **B e B2** Córrego Pari, **C** Córrego Flechas, **D** Córrego Fundo, **E** Rio Vermelho, **F** Rio Piraputanga, **G** Rio Currupira, **H** Córrego Santa Cruz, **I** Baía Arrombado, **J** Córrego Pipa, **L** Córrego São José e Rio Sepotuba, **M** Rio Matrixã, **N** Rio Preto, **P** Córrego Salgadinho. Gênero *Lasiancistrus*: **O** Rio Massangana, **Q** Rio Cachoeira.

3.2.1. Descrição da morfologia das espécies e algumas observações levantadas durante as coletas

O gênero *Ancistrus* é caracterizado pelo focinho liso e com barbilhões moles. A maioria das espécies possuem barbilhões numerosos e bifurcados nos machos adultos, curtos e esparsos nas fêmeas e machos jovens. O dimorfismo sexual, além dos barbilhões, se apresenta na largura do focinho, que nos machos é mais largo e nas fêmeas ligeiramente estreito, caracteres difíceis para distinguir o sexo nos indivíduos jovens pois, machos e fêmeas nesta fase se assemelham muito. A espécie *Ancistrus tombador* é uma das poucas exceções no gênero. Os espécimes desta espécie possuem barbilhões vestigiais e nadadeira adiposa vestigial, caracteres raros no gênero. A coloração das espécies é variável, do preto ao marrom esverdeado. As tonalidades de coloração podem variar de acordo com o ambiente (mais ou menos luz, características da água), porém, as pintas e manchas são distintas para muitas espécies, que podem ter pintas brancas que refletem com quantidade mínima de luz (*Ancistrus cuiabae* fig.02 I), pintas douradas (*Ancistrus* cf. *dubius* fig.02 A) ou manchas (*Ancistrus* sp 12 fig.02 H).

O gênero *Lasiancistrus* possui o focinho áspero e com vibrissas que se assemelham a cerdas. Os espinhos da região do opérculo são mais longos e em maior número que no gênero *Ancistrus*, bem como o tamanho médio dos exemplares. As espécies destes dois gêneros ocupam habitats semelhantes, ou seja, com águas lólicas e transparentes na maior parte do ano, mas não foram encontradas em simpatria.

O tamanho entre as espécies de ambos os gêneros varia de alguns milímetros a poucos centímetros (tabela. 03), e as diferenças morfométricas entre as populações podem estar relacionadas às características do habitat, como disponibilidade de alimentos, longevidade dos indivíduos ou a capacidade biológica intrínseca da espécie.

Fêmeas com ovócitos maduros foram encontradas ao longo do ano, indicando que as espécies podem se reproduzir em distintas estações. Isto garantiria a manutenção de descendentes em diferentes períodos do ano. Além desta

característica, o cuidado parental é exercido pelos machos, tanto dos ovos quanto das larvas o que possibilita que a medida de fecundidade/viabilidade seja mantida, apesar das populações serem pequenas. Numa única fenda de rocha ou oco de tronco foi possível identificar um macho e em média duas fêmeas, adultos, e até seis juvenis. O que indica este cuidado parental e o domínio de um macho por micro-habitat.

As espécies se alimentam, principalmente, nos períodos crepusculares. Deslocam-se com mais frequência a noite do que durante o dia. Passam a maior parte do tempo protegidas em pequenos abrigos nas fendas de rochas, protegidas por seixos nos leitos raros dos rios ou usam restos de madeira como ocos de troncos para se protegerem de predadores, e destes abrigos deslocam-se pouco para rasparem algas nas proximidades (fig. 03. c, d).

3.2.2. Parâmetros morfométricos médios dos exemplares das populações

Algumas medidas dos exemplares foram feitas com paquímetro (fig. 04), seguindo alguns parâmetros morfológicos de acordo com Bristski (1999). Os resultados se referem às médias de cada parâmetro considerado, existentes entre os exemplares das populações. Estas médias com diferenças e similaridades entre as espécies analisadas podem ser conferidas na tabela 03.

Tabela 03. Média por população de alguns caracteres morfológicos, dos gêneros *Ancistrus* e *Lasiancistrus*.

Espécie/Local	CP (1)	LC (3)	DI (5)	DPD (2)	CC (4)	APC (7)	DDC (6)
<i>Ancistrus</i> cf <i>dubius</i> /A	5,9	1,48	0,7	1,99	1,64	0,5	1,53
<i>Ancistrus</i> cf <i>dubius</i> /B	6,78	1,61	0,86	2,39	1,91	0,65	1,62
<i>Ancistrus</i> cf <i>dubius</i> /C	10,92	2,76	1,41	4,04	3,22	0,98	2,78
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i> /D	4,92	1,57	0,8	2,34	1,84	0,51	1,58
<i>Ancistrus</i> sp 10/E	4,58	1,41	0,57	2,08	1,5	0,51	1,7
<i>Ancistrus</i> sp 11/F	5,24	1,74	0,87	2,45	1,93	0,64	1,6
<i>Ancistrus</i> sp 08/G	4,72	1,56	0,75	2,25	1,76	0,52	1,44
<i>Ancistrus</i> sp 12/H	6,7	1,59	0,84	2,32	1,88	0,62	1,58
<i>Ancistrus cuiabae</i> /I	5,08	1,61	0,86	2,4	1,97	0,61	1,54
<i>Ancistrus claro</i> /A2	5,25	1,35	0,56	1,86	1,48	0,35	1,24
<i>Ancistrus</i> sp 03/B2	6,26	1,62	0,69	2,24	1,75	0,48	1,63
<i>Ancistrus</i> sp 01/J	7,13	1,78	0,82	2,52	1,95	0,57	2,01
<i>Ancistrus</i> sp 04/L	6,41	1,62	0,75	2,44	1,9	0,49	1,71
<i>Ancistrus</i> sp 06 /M	4,4	1,36	0,55	2	1,43	0,5	1,65
<i>Ancistrus tombador</i> /N	5,13	1,52	0,69	2,26	1,86	0,56	1,84
<i>Ancistrus</i> sp 13/P	6,11	1,7	0,97	2,73	2,36	0,54	1,67
<i>Lasiancistrus</i> cf. <i>schomburgkii</i> /O	8,8	2,77	1,5	3,88	3,3	0,78	3,03
<i>Lasiancistrus</i> sp 1/Q	7	2,26	1,02	3,18	2,54	0,78	2,36

Legenda: Comprimento padrão (CP), Largura da cabeça (LC), Distância interorbital (DI), Distância pré-dorsal (DPD), Comprimento da cabeça (CC), Altura do pedúnculo caudal (APC), Distância nadadeira dorsal e início da caudal (DDC)

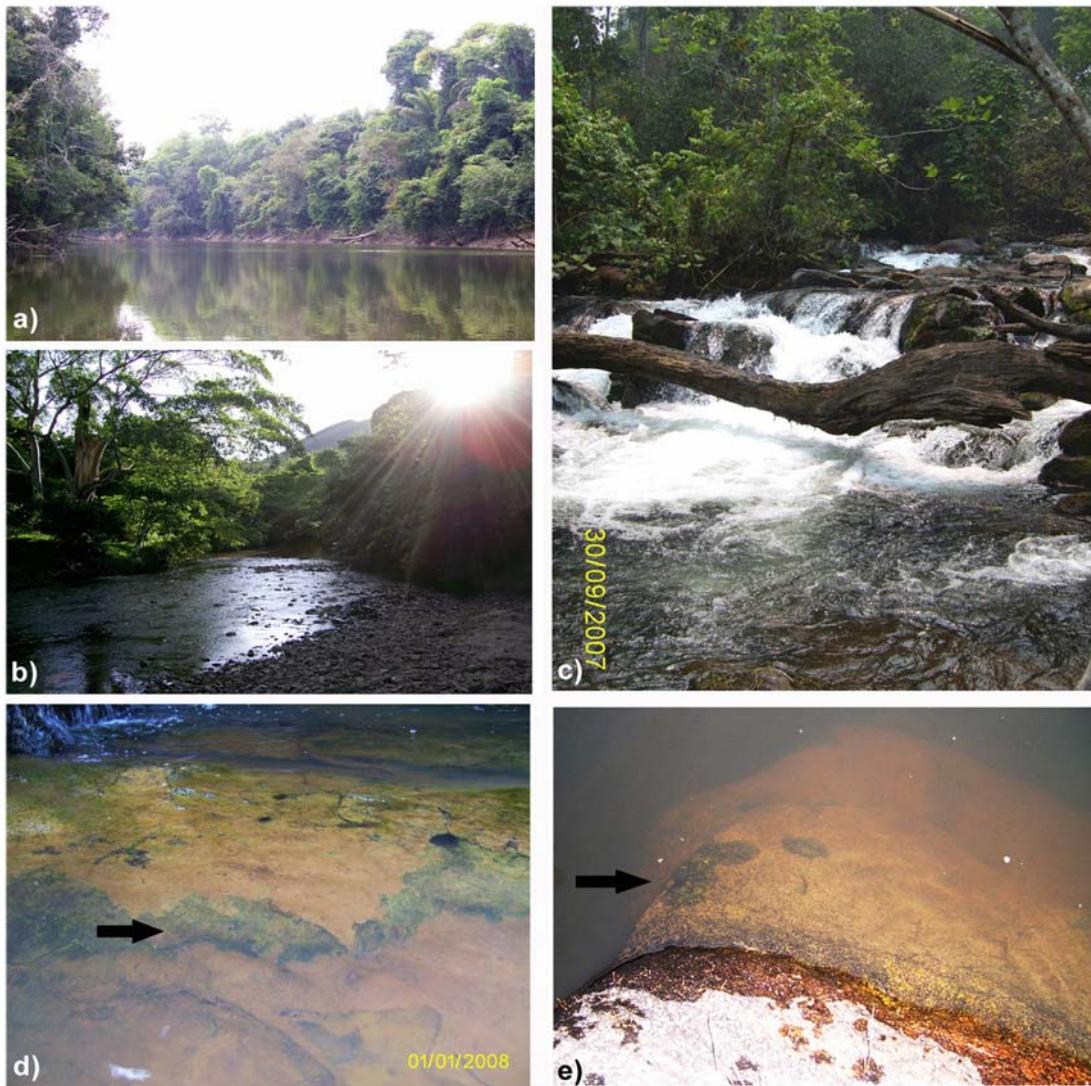


Figura 03. Fotos de alguns locais amostrados: **a)** Rio Matrixã, **b)** Córrego Flechas, **c)** Rio Preto. Detalhes das rochas onde os espécimes raspam algas para se alimentarem **d)**, **e)**.

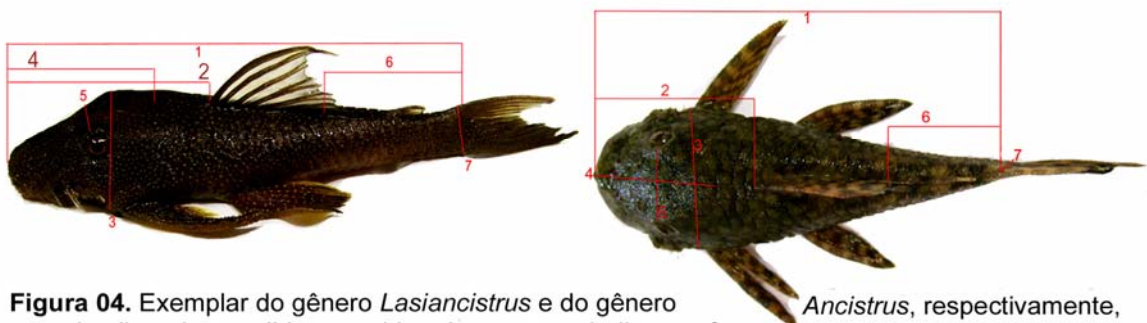


Figura 04. Exemplar do gênero *Lasiancistrus* e do gênero *Ancistrus*, respectivamente, com detalhes das medidas consideradas neste trabalho, conforme a tabela 03.
 Legend: 1 = CP, 3=LC), 5= DI, 2= DPD, 4= CC, 7= APC, 6= DDC

3. 3. Métodos

3.3.1. Técnicas de citogenética clássica

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos foram utilizadas as seguintes técnicas:

Preparação direta, adaptada por Bertollo *et al.* (1978), para estudos em peixes, com algumas variações de tempo de acordo com o grupo, com os procedimentos descritos a seguir:

1. Foi injetado intra-peritonealmente, solução aquosa de colchicina na concentração de 0,025%. A quantidade injetada corresponde a 0,1 ml/10g do animal;
2. O peixe foi mantido no aquário durante 45 minutos e depois sacrificado; retirando-se as porções anterior e posterior do rim;
3. O material foi colocado em uma solução hipotônica de KCl 0,075 M e depois dissociado com o auxílio de uma seringa hipodérmica de vidro de 10 ml sem agulha;
4. O material foi levado para uma estufa com 36 a 37C°, durante 28 minutos;
5. O material foi suspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de centrifuga;
6. Algumas gotas de fixador foram acrescentadas ao recém preparado (metanol 3: ácido acético 1), e seguiu-se o processo com centrifugação por 10 minutos, a 900 rpm;
7. O sobrenadante foi descartado com uma pipeta Pasteur. Posteriormente, adicionou-se 10 ml do fixador, tomando-se o cuidado de lavar as paredes do tubo com o mesmo. Ressuspendeu-se o material que foi colocado para centrifugar por 10 minutos a 900 rpm. Depois o sobrenadante foi descartado;
8. Repetir o item 7;
9. Adicionou-se uma quantidade suficiente de fixador para obter uma concentração de células satisfatória. Depois de ressuspender bem o material este foi então acondicionado em tubos de 1,5 ml com tampa e guardado em freezer para utilização;

10. Foram colocadas 3-4 gotas da suspensão com auxílio de uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina bem limpa, aquecida a 30 graus aproximadamente, em banho-maria;
11. O material da lâmina foi deixado para secar;
12. Logo após, corado com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato com pH 6,8 durante 8 minutos;
13. Posteriormente, a lâmina foi lavada com água destilada e deixada para secar ao ar.

Detecção da Heterocromatina Constitutiva

Para detecção da heterocromatina constitutiva foi empregada a técnica descrita por Sumner (1972) com alterações, nos tempos de tratamento nas soluções de hidróxido de Bário e 2xSSC, como descrito a seguir:

1. pingar 3 gotas da suspensão de células em uma lâmina nova e limpa;
2. o material da lâmina foi tratado com ácido clorídrico (HCl) 0,2N a temperatura ambiente, durante 15 minutos e posteriormente lavado com água destilada;
3. a preparação, colocada em solução de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_{28}\text{H}_2\text{O}$) a 5%, recém preparada e filtrada, a 60°C, durante 30 segundos a 3 minutos, dependendo da espécie estudada;
4. para interromper a ação do bário, a lâmina foi submersa rapidamente em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavada com água destilada;
5. posteriormente a lâmina foi imersa em solução salina de 2xSSC, a 60°C durante 45 a 60 minutos, dependendo da espécie analisada;
6. após, lavada com água destilada e seca ao ar;
7. para coloração foi usada a solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato pH6,8 durante 15 minutos e examinada ao microscópio.

Visualização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs) através da prata coloidal.

Na detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs), foi empregada a técnica de impregnação pelo nitrato de prata coloidal, como descrita por Howell & Black (1980). No procedimento foram feitas algumas modificações:

1. após a preparação das lâminas, como descrito anteriormente, foi colocada sobre o material uma gota de solução de gelatina (1g de gelatina/ 100ml de água destilada, + 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de nitrato de prata (0,5g de AgNO₃ em 1ml de água deionizada). Misturou-se levemente com uma lamínula, tomando-se o cuidado para não riscar a lâmina;
2. a lâmina, coberta com uma lamínula (60 x 20 mm) foi levada à estufa a 60°C;
3. depois de mantida na estufa, retirou-se para observar ao microscópio óptico, se os cromossomos e núcleos assumiram uma coloração amarelada e os nucléolos e as RONS uma coloração quase preta; em geral este tempo varia de 3 a 5 minutos. A lamínula então foi removida com jatos de água destilada e a lâmina lavada em água corrente e deixada ao ar para secar;
4. posteriormente foi observada ao microscópio.

3.3.2. Técnicas de citogenética molecular

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi empregada para localizar os genes de rDNA nos cromossomos. Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida por PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e, uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999). As sondas do rDNA 18S foram marcadas com biotina 16-dUTP, enquanto que as sondas do rDNA 5S foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP, ambas por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Roche). Estas sondas foram utilizadas para a dupla FISH de acordo com Pinkel et al. (1986); sob condição de alta estrigência (2,5 ng/μL de cada uma das sondas, 50% formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2XSSC a 37°C por 18 horas). Para a detecção do sinal foram utilizados os anticorpos avidin-FITC (Sigma) e anti digoxigenina rodamina – fab fragmentos (Roche), respectivamente. As preparações foram contra-coradas com DAPI e analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização da câmera CCD DP-71 (Olympus) com utilização do software DP-controller.

A técnica detalhada segue o seguinte o protocolo básico a seguir:

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

1. pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo:
2. x μ l água qsp;
3. x μ l sonda (1 μ g);
4. 4 μ l mix de nick;
5. completar para o volume total de 20 μ l;
6. interromper com 1 μ l de EDTA 0,5 M pH 8,0;
7. aquecer por 10 min à 65 C.

Tamanho dos fragmentos em gel

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

Marcação da sonda por PCR – digoxigenina 11 dUTP

Reagentes; Concentrações; Quantidades

Tampão da enzima; 10x; 5,0 μ l

DNA; ; Variável 10-100ng

dATP; 2mM; 1,0 μ l

dCTP; 2mM; 1,0 μ l

dGTP; 2mM; 1,0 μ l

dTTP; 2mM; 0,7 μ l

Digoxigenina 11 dUTP ; 1mM ; 0,6 μ l

Primer F; 10pM; 2,5 μ l

Primer R; 10pM; 2,5 μ l

MgCL₂; 50mM; 4,0 μ l

dH₂O; ;

Taq pol; 5U/ μ l; 0,5 μ l

Total; ; 50 μ l

Marcação da sonda por PCR – biotina 14 dATP

Reagentes; Concentrações; Quantidades

Tampão da enzima; 10x; 5,0 µl
 DNA; ; Variável 10-100ng
 dATP; 2mM; 1,0 µl
 dCTP; 2mM; 1,0 µl
 dGTP; 2mM; 1,0 µl
 dTTP; 2mM; 0,5 µl
 Biotina 14 dATP; 0,4 mM ; 2,5 µl
 Primer F; 2mM; 2,5 µl
 Primer R; 2mM; 2,5 µl
 MgCL₂; 2mM; 4,0 µl
 dH₂O; ;
 Taq pol; 5U/µl; 0,5 µl
 Total; ; 50 µl

Parâmetros para amplificação DOP-PCR

Utilizar 3 µl do primer DOP

35 ciclos {

- 90°C 3'
- 90°C 1'30"
- 52°C 1'30"
- 72°C 1'30"
- Hold 4°C

Parâmetros para amplificação 18S

Primers M13

35 ciclos {

- 94°C 5'
- 94°C 1"
- 53°C 45"
- 72°C 2'
- Hold 72 C 5'
- Hold 4°C

OBS. A razão de nucleotídeo marcado para não marcado pode variar de 1:20 a 3:7 dependendo do tamanho e número de repetições da sonda a ser hibridizada.

- Checar o produto da PCR em gel de agarose 0,8%.

- precepitar o produto da PCR com 1/10 do volume da reação com acetato de sódio - 3M e duas vezes o volume total da reação com de etanol PA gelado;

- incube a -20°C overnight;
- centrifugue a 14.000 rpm por 10 min;
- descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50 μl etanol 70%;
- centrifugar a 14.000 rpm 5 min;
- descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em x μl de água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).

Fluorescent in situ hybridization – Protocolo p/ 10 lâminas

Tratamento com RNase

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

Solução RNase

- 5 μl RNase 10mg/ml
 - 975 μl 2xSSC
4. Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
 5. Lavar durante 5 min em PBS 1x.

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

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

Solução de formaldeído

- 10 mL de PBS 10x
 - 5 mL de MgCl_2 1 M
 - 1 mL de formaldeído
 - Completar para 100 ml com H_2O dest.
7. Lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker);
 8. Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 min cada;

Pré-hibridação

9. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
10. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min;

Solução Formamida 70%

- 70 mL de formamida
- 30 mL de 2xSSC

11. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada. Obs. A série alcoólica deverá estar a -20°C;

Hibridação

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

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

- 200 µl Formamida (50% de Formamida);
- 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40 µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 8 µl DNA de placenta 10mg/ml (1µl/ lâmina);
- 36 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda A
- 36 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda B
- Volume final 400 µl.

Lavagens – Segundo dia

14. Lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10min cada (Shaker);

Solução formamida 15%/0,2xSSC

- 30 mL de formamida
- 20 mL de 2xSSC
- 150 mL de H₂O dest.

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

Solução de Tween 0,5%/4xSSC

- 200 mL de 20xSSC
- 5 mL solução estoque Tween 10%; ou 500 µl Tween puro
- completar para 1L de H₂O

Bloqueio

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

Tampão 5% NFDM/4xSSC

- 20 mL de 20xSSC
- 80 mL de água milli Q
- 5 g de leite em pó molico Ca⁺⁺ desnatado

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

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

Detecção e amplificação do Sinal para sondas marcadas com biotina

19. Incubar as lâminas com 100 µl de FITC (1 µl FITC/1000 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

20. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

21. Incubar com 1000 µl de anti-avidina (10 µl anti-avidina/990 µl de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

22. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

23. Incubar as lâminas com 100 µl de FITC (1 µl FITC/1000 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.

24. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

25. Incubar com 100 µl de anti-avidina (10 µl anti-avidina/990 µl de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

26. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

27. Incubar as lâminas com 100 µl de FITC (1 µl FITC/1000 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

28. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

29. Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar);

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

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

21c. montar um mix contendo 994 μ l NFDm + 1 μ l de avidina FITC conjugada + 5 μ l de anti digoxigenina rodamina conjugada.

22c. Incubar as lâminas com 100 μ l cada do mix de anticorpos durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

23b. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

24b. Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar);

Montagem das lâminas com DAPI

30. Misturar 400 μ l de antifading mais 1 μ l de dapi (0,2 mg/mL);

31. Colocar 50 μ l da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

as preparações foram contra-coradas com DAPI e analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização da câmera CCD DP-71 (Olympus) com utilização do software DP-controller.

3.3.3. Análises cromossômicas

As preparações de citogenética clássica (Giemsa convencional, banda-C e Ag-RONs) foram analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas feitas com a objetiva de imersão (aumento de 1000X). As melhores metáfases foram fotografadas com máquina digital de uso doméstico (Mitsuca 8.1 Mp).

As melhores imagens das metáfases e dos cromossomos foram recortadas e, em seguida, os homólogos pareados e dispostos em grupos distintos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica segue o proposto por Levan *et al.* (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB): 1,00-1,70, metacêntrico (m); 1,71-3,00, submetacêntrico (sm); 3,01-7,00, subtelocêntrico (st); maior que 7,00, acrocêntrico (a).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com 2 braços cromossômicos.

As medições dos cromossomos e montagem dos cariótipos foram feitas com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0

4. RESULTADOS

Capítulo I

Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini)

Sandra Mariotto*; Liano Centofante**; Carlos S. Miyazawa**; Luiz Antonio Carlos Bertollo*; Orlando Moreira Filho*.

*Federal University of São Carlos, Genetics and Evolution Graduate Program (PPGGEv), São Carlos, São Paulo. mariottodolina@bol.com.br

**Federal University of Mato Grosso, Biosciences Institute, Animal Cytogenetics and Genetics Laboratory, Cuiabá, Mato Grosso. lianocentofante@yahoo.com.br

Abstract

Cytogenetic analyses were performed in 30 *Ancistrus cuiabae* specimens from a bay near the town of Poconé, in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. The observed diploid number was $2n=34$ chromosomes for both sexes and three distinct karyotypic formulae were found, namely cytotype A (20m, 8sm, 6st, Fundamental Number/FN=68; 6 males and 11 females), cytotype B (19m, 8sm, 6st, 1a, FN=67; 8 males and 4 females) and cytotype C (18m, 8sm, 6st, 2a, FN=66; a single male). NORs's analyses showed that these regions were located in distinct sites on the NOR-bearing chromosome pair, according to cytotypes. Thus, in cytotype A, NORs were located in the terminal region of the short arm of the second metacentric chromosome pair; in cytotype B, they were detected in the short arm of the metacentric chromosome and interstitially on the acrocentric chromosome and, in cytotype C, NORs were observed in the interstitial region of the acrocentric chromosome pair. C-positive heterochromatic bands were

adjacent to the rDNA sites in the corresponding chromosomes. Thus, the chromosomal polymorphism of

A. cuiabae was probably originated through a pericentric inversion in chromosome pair no. 2 involving the NOR sites, which represents a novelty in the Ancistrini tribe. The results also broaden the knowledge of the chromosomal evolution in *Ancistrus*, the most derived genus of the Ancistrini tribe.

Foram Analisados, com técnicas convencionais de citogenética e FISH, 30 exemplares da espécie *Ancistrus cuiabae* da baía Arrombado, próximo a Poconé, Pantanal do Mato Grosso. Foram observadas metáfases com número diplóide $2n=34$ cromossomos para ambos os sexos e três fórmulas cariotípicas distintas, aqui denominadas de citótipo A, verificado em 06 machos e 11 fêmeas (20m, 8sm, 6st, Número Fundamental, NF=68); citótipo B, em 08 machos e 04 fêmeas (19m, 8sm, 6st, 1a, NF=67) e citótipo C em apenas 01 macho (18m, 8sm, 6st, 2a, NF=66). As NORs confirmaram os distintos citótipos verificados, além de evidenciar que os cromossomos portadores de rDNA são os que representam o polimorfismo na espécie *Ancistrus cuiabae*. No citótipo A, as NORs foram verificadas na região terminal do braço curto do segundo par de cromossomos metacêntricos; no citótipo B, foram evidenciadas no segundo par, heteromórfico, no braço curto do cromossomo metacêntrico e intersticial no seu homólogo acrocêntrico; no citótipo C as NORs foram observadas na região intersticial num par de cromossomos acrocêntricos. A análise da heterocromatina constitutiva evidenciou blocos discretos adjacentes ao rDNA no segundo par de cromossomos de ambos os citótipos. Uma provável inversão pericêntrica é a hipótese proposta para a origem deste polimorfismo na espécie *Ancistrus cuiabae*. Estes resultados ampliam o

conhecimento sobre o gênero *Ancistrus*, o mais derivado da tribo, contribuem para o conhecimento sobre este grupo de peixes e para inferir sobre a evolução cromossômica dos Ancistrini.

Key words: Siluriformes, Cytogenetics, NOR, pericentric inversion.

I.1. Introduction

The Ancistrini tribe is composed of 29 genera, totaling 217 nominal species, with four genera being represented by monotypical species (Fisch-Muller, 2003). Considering only the Brazilian hydrographic system, this tribe comprises 21 genera and 78 nominal species found mainly in the Amazonian rivers (Sarmiento-Soares & Ingenito, 2007). *Ancistrus* corresponds to the most diversified genus, presenting 21 described species (Sarmiento-Soares & Ingenito, *op. cit.*). This group is characterized by a smooth snout and may present a sexual dimorphism in many species, with numerous long and forked barbells in males and sparse and short ones in females. However, new species are being recognized and waiting to be described. In fact, the number of described Loricariidae species has risen significantly as a whole in the last years, due to the intensification and refinement of the studies in this family.

Cytogenetics and molecular genetics have been useful tools for clarifying doubts concerning the identification of some species, as well as for proposing phylogenies for a few fish groups. In *Ancistrus*, these analyses have showed a prominent numerical chromosome diversity, from $2n=34$ in *Ancistrus* sp 1 and *Ancistrus* sp 2 in Amazonian rivers (de Oliveira, 2006), to $2n=52$ in *Hemiancistrus* sp. and *Panaque cf. nigrolineatus* (Artoni & Bertollo, 2001).

Among Neotropical fish, chromosomal variations directly related to the number and/or size of the nucleolar organizer regions (NORs) are known for many groups, such as Gymnotiformes (Foresti *et al.*, 1981; Almeida-Toledo, 1985), Parodontidae (Moreira-Filho *et al.*, 1984), and Serrasalminae (Galetti *et al.* 1985), among others. Recently, these variations have been confirmed by the use of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with 18S rDNA probes (Kavalco *et al.*, 2005; Mantovani *et al.*, 2005; Pazza *et al.*, 2006). However, structural polymorphisms due to other chromosomal rearrangements such as inversions and centric fusions/fissions are not very common among Neotropical fish, being known mainly among Characiformes (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1988; Cestari & Galetti Jr., 1992; Centofante *et al.*, 2002; Jorge & Moreira Filho, 2004; Pazza *et al.*, 2006). In Siluriformes, numerical and/or structural polymorphisms were observed in a few Pimelodidae (Dias & Foresti, 1993; Vasconcelos & Martins-Santos, 2000), Heptapteridae (Vissoto *et al.*, 2001; Kavalco *et al.*, 2004), Hypoptopomatinae (Andreatta *et al.*, 1994), Loricariinae (Giuliano-Caetano, 1998), and Trichomycteridae species (Borin & Martins-Santos, 2000).

In the present work, it is described a structural polymorphism in the NOR-bearing chromosomes of *Ancistrus cuiabae*, revealed by conventional cytogenetic techniques and fluorescent *in situ* hybridization with an 18S rDNA probe.

I.2. Material and methods

Fifteen male and fifteen female specimens of *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999, were cytogenetically studied. The site collection of this species is situated 36 km away from Poconé (at approximately 16°21'21"S 56°27'55"W), in the State of Mato Grosso, Brazil. This location, regionally known as Arrombado, has the characteristics of a bay in the Pantanal region, because it connects to the Bento Gomes River (Paraguay basin) in the flooding season (Fig. 05). There is still no record of this species occurring in any other locality. Voucher specimens were deposited in the fish collection at the MCT/PUC/RS (MCP 41979).

The chromosome preparations were obtained by the air drying method (Bertollo *et al.*, 1978). The C-positive band heterochromatin and the Nucleolar Organizer Regions (Ag-NORs) were detected according to Sumner (1972) and Howell & Black (1980), respectively. The chromosomes were organized into four morphological groups (m = metacentric, sm = submetacentric, st = subtelocentric, a = acrocentric) in decreasing order of size, according to the arm ratios (Levan *et al.*, 1964). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) followed the protocol described by Pinkel *et al.* (1986), using 18S rDNA probes (Hatanaka & Galetti Jr, 2004).

I.3. Results

All the specimens evidenced the diploid number $2n=34$ chromosomes in both sexes, in a sample greater than 1,000 analyzed cells. However, three karyotypic formulae were observed, here named cytotypes A, B and C.

Cytotype A, found in 6 males and 11 females, was characterized by 20m, 8sm and 6st chromosomes and FN (fundamental number or number of chromosome arms) equal to 68 (Fig. 6a). Ag-NORs were observed in the terminal region of the short arms of the second chromosome pair, characterized as metacentric. Fluorescent *in situ* hybridization results agreed with the Ag-NORs locations (Fig. 7a, box).

Cytotype B, detected in 8 males and 4 females, was characterized by 19m, 8sm, 6st, 1a chromosomes and FN=67 (Fig. 6b). Ag-NORs were evidenced in the terminal region of the short arm of a single metacentric chromosome and the interstitial region of the long arm of a single acrocentric chromosome of the karyotype, which was also corroborated by the FISH data with the 18S rDNA probe (Fig. 7b, box).

Cytotype C, detected in a single male, presented 18m, 8sm, 6st, 2a chromosomes and FN=66. (Fig. 6c). In this case, the Ag-NORs were located in the interstitial region of the long arms of the acrocentric pair, characteristic of this cytotype (Fig. 7c, box).

All cytotypes presented a discrete amount of heterochromatin in the chromosomes, with more prominent C-positive bands adjacent to the NOR regions (Fig. 7 a,b,c).



Figura 05. Fig. 1. Partial view of the "Arrombado" bay and the sampling sites (a, b). *Ancistrus cuiabae* specimen with 110 mm (c).

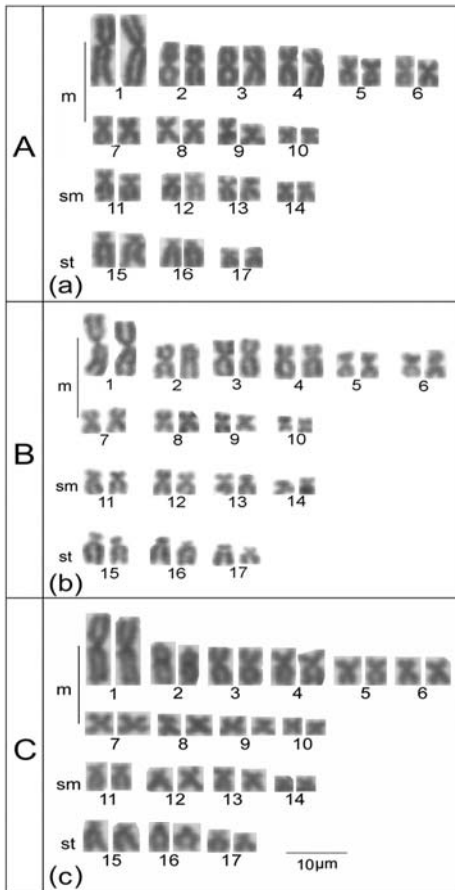


Figura 06. Karyotypes of *Ancistrus cuiabae*, after conventional Giemsa staining, showing the polymorphic second chromosome pair. Cytotype A with two metacentric chromosomes (a), B with a metacentric and an acrocentric chromosome (b), and C with two acrocentric chromosomes no. 2 (c).

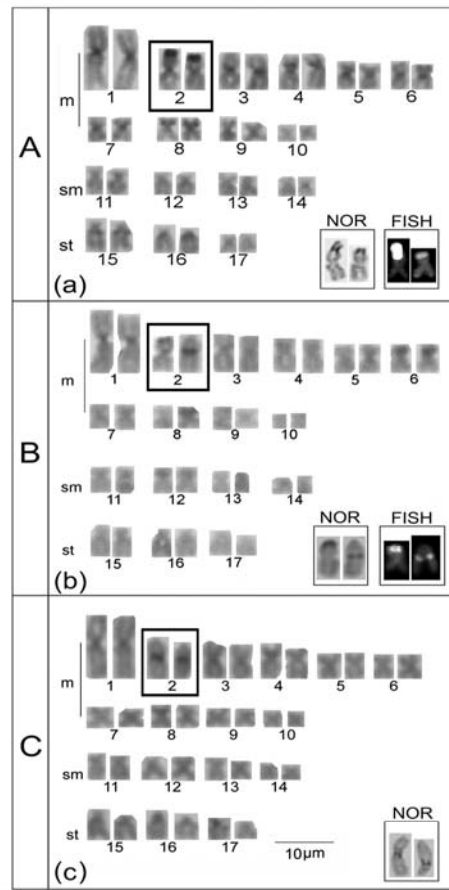


Figura 07. Karyotypes of *Ancistrus cuiabae*, sequential C-banding, evidencing the C-positive heterochromatin in the three cytotypes (a, b, c). In the boxes, chromosomes from the second pair after silver staining and FISH, the Ag-NORs and the 18S rDNA sites, respectively.

I.4. Discussion

Loricariidae fish shows a very large variation of the chromosome number as a whole, which ranges from $2n=80$ in a *Hypostomus* species (Artoni & Bertollo, 1996), to $2n=34$ in *Ancistrus* species (de Oliveira, 2006 and present work). Besides the chromosome number, the karyotypic formula is also variable, showing a differentiated karyotypic evolution throughout the speciation process of this family. Oliveira *et al.* (1988) considered that the fixation of different chromosome rearrangements would be more likely in populations with reduced vagility, as is the case of some Loricariidae species, thus promoting karyotypic variability.

Alves *et al.* (2005) suggested that the karyotypic diversity of Loricariidae could be exclusive to *Hypostomus*, since other loricariid groups seem to be characterized by a relatively conserved diploid number. This opinion was also shared by Lara (1998), Artoni & Bertollo (2001) and Souza (2003). However, as new studies were performed in Ancistrini it was pointed out that the chromosomal diversity go beyond the previously supposition for this group. Indeed, the Ancistrini tribe is characterized by a chromosomal diversification, especially in the genus *Ancistrus* where distinct karyotypic structures indicate a probable species complex (Mariotto & Miyazawa, 2006), besides the occurrence of simple and multiple sex chromosome systems (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al.*, 2007, 2008), as well as simple or multiple and interstitial or terminal NOR systems (Alves *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004; Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al.*, 2006).

The data from the present study corroborate the karyotypic diversity of *Ancistrus*. In fact, the analysis of the three cytotypes detected in *A. cuiabae* evidenced a case of structural chromosome polymorphism, associated to the NOR-bearing chromosome

pair. This way, while in cytotype A this pair is metacentric, in cytotype B it is composed of a metacentric and an acrocentric chromosome, and in cytotype C by an acrocentric pair. Cytotype A was the most frequent in the studied sample and, probably, it corresponds to the standard karyotypic form of the species, being present in 57% of the specimens. On the other hand, cytotype B was detected in 40% of the specimens, and cytotype C in only 3% of the sample. Therefore, it is likely that the observed polymorphism is due to pericentric inversions that, at the same time, modified the chromosome form (metacentric/acrocentric) and the location of the NORs on the chromosomes (terminal/interstitial). Hence, cytotype A would correspond to the basic homozygotes, cytotype B to the structural heterozygotes and cytotype C to the structural homozygotes in the population.

Chromosome polymorphism due to pericentric inversions have already been observed in some fish groups. A pericentric inversion concerning the first karyotypic pair was detected in *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae) from the Catalão Lake (Amazon basin), with absence of the structural homozygotes (Centofante *et al.*, 2002). Variations concerning the number of the acrocentric chromosomes in *Apareiodon affinis* (Parodontidae) from the Lower Paraná River (Argentina) were also probably due to pericentric inversions, since the diploid number ($2n=54$) was constant in the population (Jorge & Moreira Filho, 2004). Pericentric inversions were also considered in order to explain another few cases of structural polymorphisms, as in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Erythrinidae) from the Negro River, in the Amazon basin (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1988). On the other hand, very few cases of paracentric inversions are well known in fishes, possibly given the greater difficulty of detection by

conventional chromosome analyses. In *Apareiodon piracicabae*, for example, this rearrangement was considered to explain the occurrence of syntenic double NORs in a chromosome pair of this species (Moreira-Filho *et al.*, 1984; Jesus *et al.*, 2000).

A simple NOR system, as present in *A. cuiabae*, seems to constitute a plesiomorphic condition in Ancistrini, which also occurs in the Hypoptopomatinae, considered a close external group. Therefore, a multiple NOR system, present in a few species of this tribe, such as *Peckoltia* sp. 1, *Peckoltia* sp. 2 (Souza, 2003) and *Hemiancistrus spilomma* (de Oliveira *et al.*, 2006), may represent a derived characteristic for this group. Loricariidae generally possess little heterochromatin, as also found in *A. cuiabae*, which seems like an ancestral condition for this group. A few exceptions may occur, as in *Squaliforma emarginata* (cited with *Hypostomus emarginatus*), where larger blocks of C-positive bands were verified and coinciding with a higher diploid number, this latter also considered as a derived condition (Artoni, 1996). In *A. cuiabae*, the C-positive heterochromatin presented a pericentromeric distribution, including the acrocentric chromosomes, which corroborates the role of pericentric inversions originating the polymorphism observed in the population.

Porto-Foresti *et al.* (2004), detected a NOR polymorphism in *Oncorhynchus mykiss* from controlled breeding, suggesting that heterozygote individuals would have a greater adaptive value in relation to the homozygote ones. Even though the reduced frequency of cytotype C may be due to a sampling bias, it is tempting to correlate the distinct frequencies of the *A. cuiabae* cytotypes with a differential fitness, as suggested for *O. mykiss*. It is probable that *A. cuiabae* is restricted to the studied collection site, since it has not been found in other nearby locations or even in rivers of different

hydrographic basins. During the dry season, the water level of the bay where the population resides is drastically reduced. In this period, the *A. cuiabae* population must suffer an intensive selective pressure from inter-specific competition or predation inside the bay, which loses its connection with the Bento Gomes River. A possible greater adaptability/resistance for such conditions, presented by a specific karyotypic form, could have an important role for the survival of the species, guaranteeing its maintenance in an inhospitable habitat. This is an interesting hypothesis that could be tested in further comparative studies, by comparing the cytotypes frequencies between the favorable and the non-favorable conditions during the dry season.

Acknowledgements

The authors are grateful to Diones Krinski and John Hall for their help on the paper, and Alexandre Cardoso and Tiago Carvalho (MCT/PUC/RS) for the identification of this species. This work was partially supported by FAPEMAT, CNPq and FAPESP.

I.5. References

As referências deste capítulo estão do final da tese.

Capítulo II

Citogenética de duas espécies do gênero *Lasiancistrus* Regan, 1904 (Ancistrini, Loricariidae) das Bacias Araguaia-Tocantins e Amazônica

Sandra Mariotto & Orlando Moreira-Filho

II.1. Introdução

O gênero *Lasiancistrus* faz parte da tribo Ancistrini que possui 217 espécies nominais distribuídas em 29 gêneros (Fisch-Muller, 2003). As espécies da tribo Ancistrini, uma das cinco tribos que integram a subfamília Hypostominae, são encontrados na diversidade de rios e córregos existentes na região neotropical. O gênero com o maior número de espécies e considerado o mais derivado é o *Ancistrus* (Armbruster, 2004), com 59 espécies reconhecidas até o presente.

O gênero *Lasiancistrus* possui apenas seis espécies nominais descritas, encontradas somente na América do Sul. São caracterizados por possuírem focinho áspero, com odontodes e vibrissas, que são maiores e mais longas nos machos nupciais, possuem o corpo dorso-ventralmente comprimido e moderadamente largo, com tamanho máximo de 19 cm, a nadadeira caudal é bifurcada e a região ventral é lisa e plana. Podem ser separados de outros loricariídeos, exceto de Ancistrini e Pterygoplichthini pela presença dos odontodes ou espinhos móveis que se invertem na região do opérculo e pela presença de três raios no pedúnculo caudal (Armbruster, 2005; Ferraris, 2007).

A despeito da importância econômica dos Ancistrini na região Amazônica, especialmente como espécies ornamentais, poucos estudos científicos têm sido realizados com estas espécies (Souza *et al.*, 2004).

A citogenética em Ancistrini, até o presente, se restringe a cerca de 10% do total das espécies, com análises dos gêneros *Ancistrus*, *Hypancistrus*, *Baryancistrus*, *Peckoltia*, *Hemiancistrus*, *Parancistrus* e *Panaque*, sendo que grande parte dos trabalhos se referem ao gênero *Ancistrus*, com número diplóide que varia de $2n=34$ a $2n=54$ cromossomos (Artoni & Bertollo, 2001; Mariotto *et al.*, 2004; de Oliveira,

2006; Mariotto & Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al.*, 2007, 2008 e presente estudo). Nos demais gêneros, o número diplóide observado é de $2n=52$ cromossomos (Artoni & Bertollo, 2001; Souza, 2003; Souza *et al.*, 2004).

O número diplóide na tribo Ancistrini e a plasticidade cromossômica no gênero *Ancistrus* têm demonstrado a necessidade da ampliação dos estudos neste importante táxon de Loricariidae, que apresentam distintos sistemas de cromossomos sexuais, polimorfismos cromossômicos e fórmulas cariotípicas bastante variáveis.

Até o presente, não se tem dados sobre análises citogenéticas no gênero *Lasiancistrus* e apenas trabalhos de taxonomia das espécies são encontrados.

Assim sendo, neste trabalho estão os primeiros resultados de descrição cariotípica no gênero *Lasiancistrus*, com análises realizadas em duas populações de espécies de distintas bacias hidrográficas brasileiras.

II.2. Material e métodos

Foram analisados 07 machos e 04 fêmeas de *Lasiancistrus cf schomburgkii* (fig. 08 A), do Rio Massangana (RO), na Bacia Amazônica; 03 fêmeas e 02 machos de *Lasiancistrus* sp 1 (fig. 08 B), do Rio Cachoeira (MT), na Bacia Araguaia-Tocantins. Os exemplares testemunhos foram depositados no laboratório de Citogenética e Genética Animal da UFMT/Cuiabá. Foram identificados seguindo a chave proposta por Armbruster (2005) e a identificação foi conferida por Sonia Fisch-Muller (Muséum d' Histoire Naturelle, Genève, Switzerland). Foram tomadas medidas morfométricas de comprimento padrão (CP), largura da cabeça (LC), distância interorbital (DI), distância pré-dorsal (DPD), comprimento da cabeça (CC), altura do pedúnculo caudal (APC), distância nadadeira dorsal e início da caudal (DDC) com auxílio de paquímetro de precisão. As medidas de cada parâmetro foram obtidas para exemplares de *Lasiancistrus* das duas populações amostradas (fig 08 C).

Para a obtenção de cromossomos mitóticos, foi utilizado o protocolo adaptado para peixes por Bertollo *et al.* (1978); para visualizar as regiões heterocromáticas (Banda C) foi utilizada a técnica de Sumner (1972) e as Regiões Organizadoras de nucléolos (NORs) foram observadas com o uso de Nitrato de Prata coloidal a partir da metodologia de Howell & Black (1980).

As melhores metáfases obtidas foram fotografadas com câmera digital com resolução de 8.1 Mp em microscopia de campo claro e aumento de 1000X. Depois de fotografados, os cromossomos foram recortados e pareados seguindo a ordem de tamanho e posição do centrômero, em quatro distintos grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico) conforme Levan *et al.* (1964). Para a montagem dos cariótipos foi usado o programa Adobe Photoshop 7.0.

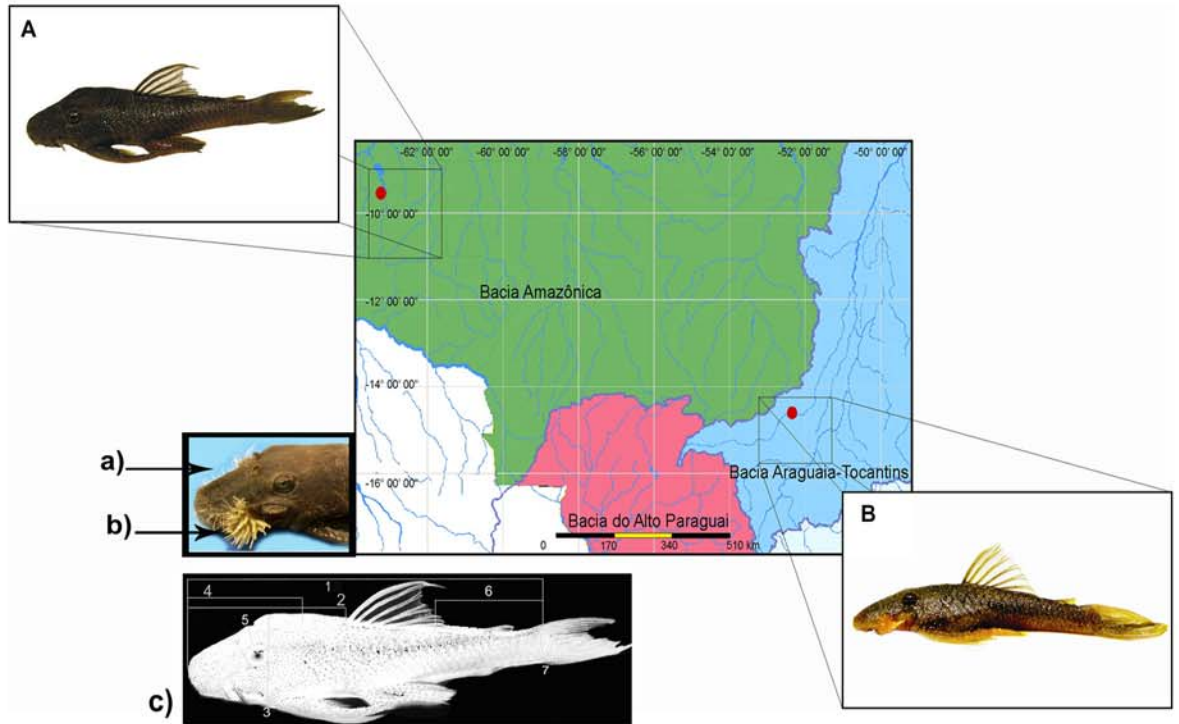


Figura 08. Recorte do mapa do Brasil (fonte: mapas I3Geo/MMA) com a hidrografia dos estados de Rondônia e do Mato Grosso, com os locais de coleta das espécies *Lasiancistrus cf schomburgkii* (A) e *Lasiancistrus sp 1* (B). Detalhe da cabeça de um espécime do gênero mostrando as vibrissas a) e ouontodes b). c) Figura esquemática mostrando os parâmetros das medidas tomadas dos espécimes de *Lasiancistrus* dos dois locais.

II.3. Resultados

Todos os espécimes analisados evidenciaram o número diplóide de $2n=54$ cromossomos, com dois braços o que resultou num número fundamental (NF) igual a 108.

A fórmula cariotípica foi um pouco diferenciada nas espécies dos dois locais: na espécie *Lasiancistrus cf schomburgkii*, da bacia Amazônica, foram observados 13 pares de cromossomos metacêntricos (m), 8 pares de submetacêntricos (sm) e 6 pares de cromossomos subteloicêntricos (st) (fig.09). Na espécie *Lasiancistrus sp 1*, da bacia Araguaia-Tocantins, 13 pares de cromossomos metacêntricos (m), 9 pares submetacêntricos (sm) e 5 pares de cromossomos subteloicêntricos (st) (fig. 10).

Alguns blocos de heterocromatina constitutiva foram observados para as duas espécies, sendo que os resultados de banda C das metáfases seqüenciais foram mais esclarecedores em *Lasiancistrus cf schomburgkii* com bandas mais destacadas nos pares 11 e 21, além de centrômeros e telômeros heterocromáticos (fig. 09 b) e d). Cromossomos com telômeros e centrômeros heterocromáticos também foram verificados em *Lasiancistrus sp 1* (fig. 10 a') e b') porém, pela baixa qualidade das imagens das metáfases após a banda C não foi possível estabelecer o cariótipo a partir das mesmas.

A partir do uso do nitrato de Prata coloidal, foram observadas as regiões organizadoras de nucléolos num par de cromossomos subteloicêntricos, no braço curto, em ambas as espécies. Na espécie *Lasiancistrus cf schomburgkii* o par 25 é portador da RON, tanto para macho quanto para fêmea (Boxes da fig. 09) e na espécie *Lasiancistrus sp 1* os cromossomos marcados com AgRON formam o par 26 de subteloicêntricos, também terminal no braço curto (boxes da fig. 10).

Em todas as metáfases de *Lasiancistrus sp 1* foi possível observar a ocorrência de um cromossomo metacêntrico maior que seu homólogo formando o primeiro par. Porém, o primeiro par de cromossomos metacêntricos na espécie *Lasiancistrus cf schomburgkii* também é relativamente maior quando comparado aos demais, porém sem diferença marcante entre os homólogos.

As espécies também apresentaram diferenças relacionadas ao comprimento padrão (tabela 04), maior em *Lasiancistrus cf schomburgkii*, e outros caracteres não mensurados, de acordo com as descrições de Armbruster (2005), como largura do

focinho, altura da cabeça e distribuição das vibrissas e odontodes (detalhe na fig. 08). Apenas a altura do pedúnculo caudal não variou. As demais medidas consideradas evidenciaram distinções entre as duas espécies, sendo *Lasiancistrus* cf. *schomburgkii* consideravelmente maior.

Tabela 4. Média por população de alguns caracteres morfológicos, do gênero *Lasiancistrus*.

Espécie	CP	LC	DI	DPD	CC	APC	DDC
	(1)	(3)	(5)	(2)	(4)	(7)	(6)
<i>Lasiancistrus</i> cf. <i>schomburgkii</i>	8,8	2,77	1,5	3,88	3,3	0,78	3,03
<i>Lasiancistrus</i> sp 1	7	2,26	1,02	3,18	2,54	0,78	2,36

Legenda: Comprimento padrão (CP), Largura da cabeça (LC), Distância interorbital (DI), Distância pré-dorsal (DPD), Comprimento da cabeça (CC), Altura do pedúnculo caudal (APC), Distância nadadeira dorsal e início da caudal (DDC)

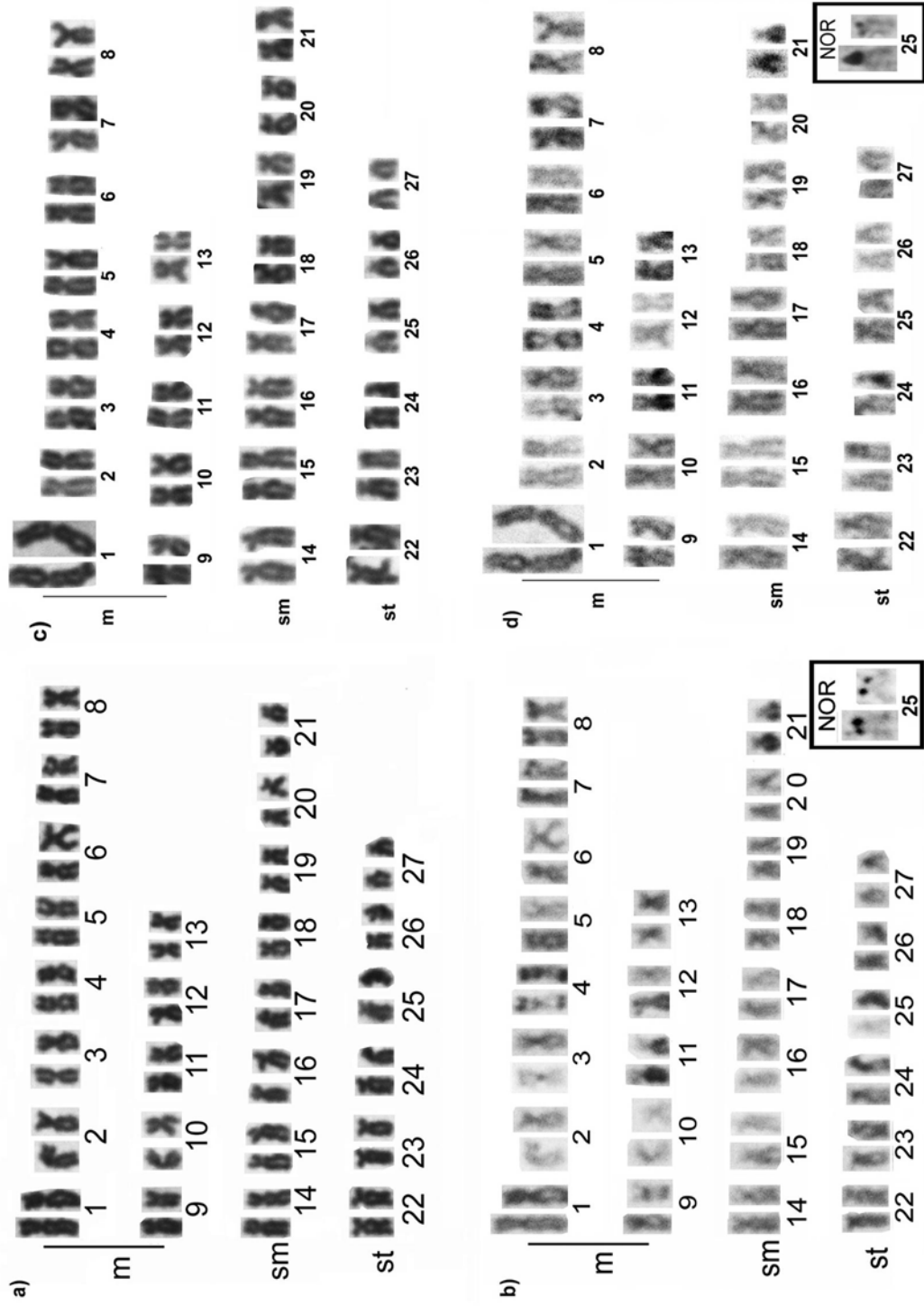


Figura 09. Cariótipos de fêmea (a, b) e macho (c, d) de *Lasiancistrus cf. schomburgkii* da Bacia Amazônica, com coloração Giemsa convencional (a, c) e bandamento C (b, d) sequencial. O par cromossômico portador da RON encontra-se em destaque.

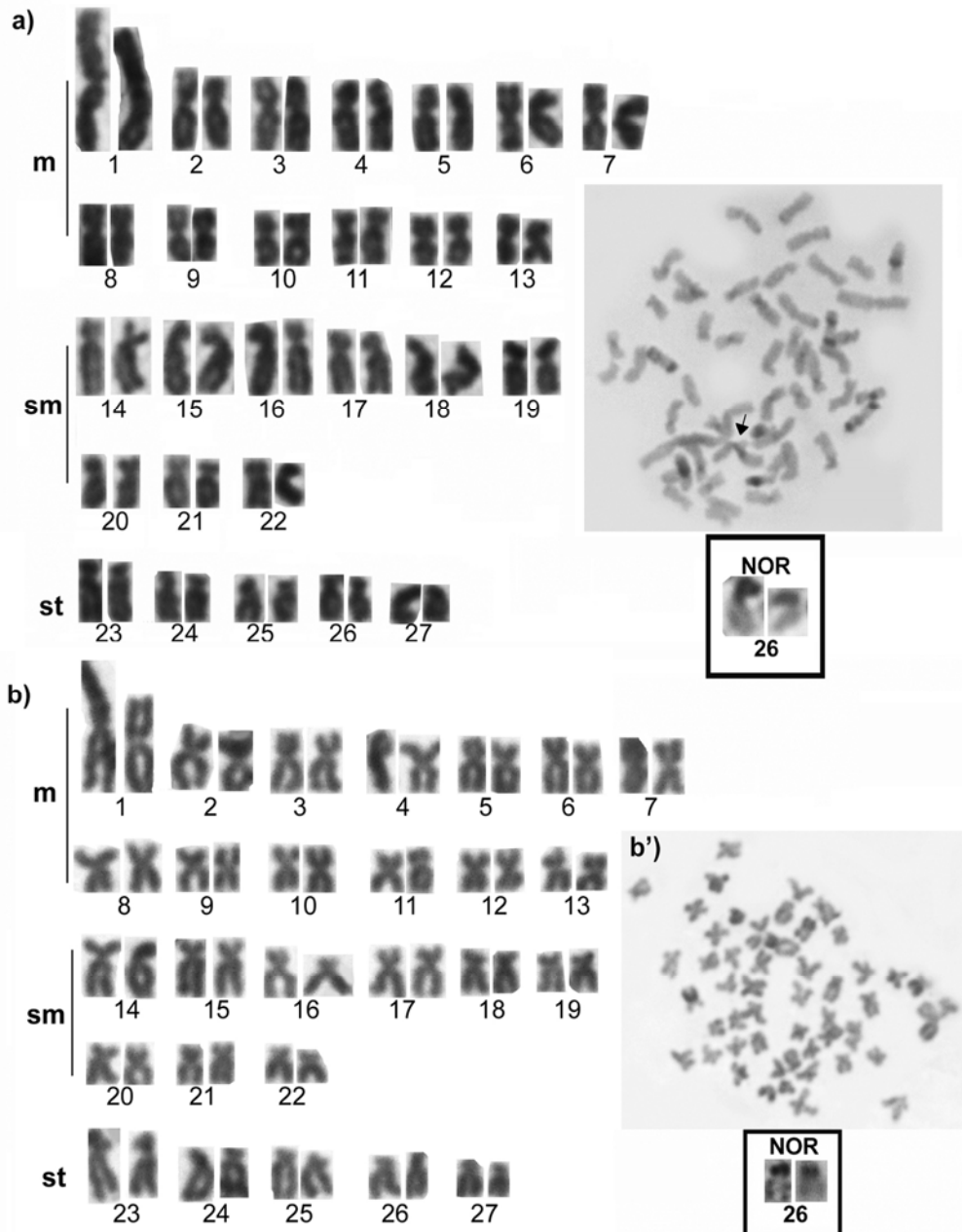


Figura 10. Cariótipos em Giemsa de duas fêmeas, a) e b), de *Lasiancistrus* sp 1 do Rio Cachoeira. Metáfase de banda C a') com NOR sequencial e seta apontando o par que marcou com AgNOR. Banda C b') e NOR em recorte no par 26.

II.4. Discussão

Estudos com citogenética de peixes fornecem subsídios para entender melhor as relações evolutivas entre espécies e populações (Almeida-Toledo *et al.*, 1993). Segundo Oliveira *et al.* (1988), a tendência de aumentar o número diplóide e número fundamental é característico para os subgrupos dos Ostariophysi ao longo da evolução. Para a família Loricariidae, estudos apontam um fenótipo cromossômico plesiomórfico com predomínio dos tipos meta e submetacêntrico e número diplóide $2n=54$ cromossomos (Andreatta *et al.*, 1993 e 1994; Artoni & Bertollo, 2001).

A tribo Ancistrini é considerada mais próxima a tribo Pterygoplichthini do que de outros loricarídeos (Armbruster, 2004) e a citogenética de algumas espécies dos Pterygoplichthini mostraram números diplóides de $2n=52$ cromossomos e fórmula cariotípica com predomínio de cromossomos de dois braços (Artoni *et al.*, 1999).

Os dados aqui obtidos com as espécies do gênero *Lasiancistrus* reforçam as hipóteses de ancestralidade cromossômica para os Loricariidae, $2n=54$, e sugerem que um cariótipo ancestral de $2n=54$ cromossomos nos Ancistrini seria o mais provável, levando em consideração os resultados encontrados em outras espécies, como ocorre em *Ancistrus claro* (presente estudo).

O número diplóide igual, $2n=54$, nas duas espécies de *Lasiancistrus*, se confirmado para outras espécies, evidenciará também uma estrutura cariotípica relativamente conservada para este gênero; como fora verificado em outros Ancistrini, onde o número diplóide que prevalece é $2n=52$ cromossomos, como nos gêneros *Panaque* e *Hemiancistrus* (Artoni & Bertollo, 2001), *Peckoltia* (Souza, 2003) e *Baryancistrus* (Souza *et al.*, 2004).

No entanto, dentre os Ancistrini, o gênero *Ancistrus* tem uma diversidade cromossômica surpreendente, não somente no número diplóide e nos diferentes citótipos, mas por apresentar cinco dos sete mecanismos de cromossomos sexuais. Os demais gêneros e espécies do grupo parecem manter características cromossômicas conservadas em relação ao gênero *Ancistrus*.

A espécie *Lasiancistrus* sp 01 apresentou diferenças no pareamento de alguns cromossomos, principalmente no primeiro par, nas metáfases analisadas. Um dos

homólogos neste par é maior e poderia sugerir um polimorfismo na população. O primeiro par de cromossomos na espécie *Lasiancistrus cf schomburgkii* é também um metacêntrico relativamente grande, mas nos espécimes analisados desta população não foram observadas diferenças significativas, entre os homólogos, no pareamento dos cromossomos.

Quanto a análise da heterocromatina constitutiva no gênero *Lasiancistrus*, na espécie *Lasiancistrus cf schomburgkii*, foram verificados blocos heterocromáticos bem evidentes em alguns cromossomos metacêntricos nas regiões teloméricas, e os braços longos dos pares 11 (m) e 21 (sm) são quase totalmente heterocromáticos.

Na espécie *Lasiancistrus* sp 1 também foram observados blocos heterocromáticos bem definidos, porém com menos qualidade final; mas as bandas de heterocromatina constitutiva não foram suficientes para discriminar uma espécie da outra.

Análises da heterocromatina constitutiva são raras nos Siluriformes, mas podem ter importância na discussão da evolução cariotípica do grupo (Kavalco *et al.*, 2004). Os resultados desta técnica foram particularmente esclarecedores, nos casos de cromossomos sexuais ZZ/ZW e XX/XY, do complexo de espécies *Ancistrus cf dubius* da bacia do Paraguai (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006)

De acordo com Fenocchio & Bertollo (1992), heterocromatina escassa e bandas discretas podem estar relacionadas a uma característica peculiar dos Siluriformes. No gênero *Hypostomus*, a heterocromatina escassa foi relacionada com a divergência no número diplóide, e espécies que podem ser consideradas mais derivadas quanto ao número cromossômico têm blocos heterocromáticos mais expressivos quando submetidas à técnica de banda C (Artoni & Bertollo, 1999).

Enquanto alguns fenótipos macro e microcariotípicos variam na maioria das espécies analisadas da tribo Ancistrini, as regiões organizadoras de nucléolos, observadas com impregnação de nitrato de prata coloidal, se mantêm simples, intersticiais ou terminais. Nas espécies do gênero *Lasiancistrus* aqui analisadas as RONS foram observadas na posição terminal no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos em ambas as espécies.

RONS terminais são menos freqüentes nos Ancistrini e foram observadas nas espécies *Ancistrus n sp.2* e *Ancistrus multispinnis* (Alves *et al.*, 2003);

Hemiancistrus sp., *Hemiancistrus spinosissimus* e *Hemiancistrus spilomma* (Artoni & Bertollo, 2001; de Oliveira *et al.*, 2006); *Peckoltia vittata*, *Peckoltia* sp.1 e *Peckoltia* sp. 2 (Souza, 2003); *Ancistrus* sp 06, *Ancistrus tombador*, *Ancistrus* sp 13 e *Ancistrus cuiabae* (presente estudo).

As RONS podem ser importantes marcadores citotaxonômicos, e Artoni (1996) sugere que sítios ribossomais na posição terminal de cromossomos metacêntricos seja um fenótipo ancestral para os Loricariidae. Isto reforça a hipótese da ancestralidade cromossômica para várias espécies desta tribo (*op.cit.*) e contribui para a hipótese de que os padrões citogenéticos verificados na maioria dos gêneros de Ancistrini são relativamente conservados, excetuando-se o gênero *Ancistrus* que até o presente tem evidenciado uma maior plasticidade cromossômica.

No entanto, a filogenia das espécies e os eventos que propiciaram a diversidade cariotípica do grupo dependem da expansão das análises para outros gêneros, bem como de comparações com a citogenética de tribos e subfamílias filogeneticamente próximas aos Ancistrini, visto que a tribo tem 27 gêneros e análises citogenéticas foram realizadas em apenas 8, incluindo o presente estudo.

Estes resultados deverão ser discutidos e expandidos com análises de espécies do gênero *Lasiancistrus* de outros locais, bem como com o uso da técnica de hibridação *in situ* fluorescente, com o objetivo de compreender melhor os aspectos citotaxonômicos e evolutivos deste gênero que integra esta importante tribo dos Hypostominae.

É possível sugerir que as espécies *Lasiancistrus cf schomburgkii* e *Lasiancistrus* sp 1 sejam duas populações da mesma espécie e as discretas diferenças morfológicas sejam resultados do tipo de habitat, e ainda, por a população do Rio Massangana estar em período reprodutivo. Quanto às variações citogenéticas encontradas no pareamento dos cromossomos, especialmente no primeiro par de cromossomos metacêntricos, poderia ser um caso de polimorfismo da população do Rio Cachoeira. Estas hipóteses poderão ser esclarecidas e testadas com a ampliação das referidas análises e com a taxonomia especializada dos espécimes.

Agradecimentos

A família Pinheiro-Soares que foi carinhosamente hospitaleira e me auxiliou nas coletas em Nova Xavantina, em especial ao Ronã; ao graduando Felipe Gomes pela coletas em Rondônia e a Sonia Fisch-Muller pelo pronto auxílio na identificação parcial das espécies.

II.5. Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas deste capítulo estão no final desta tese.

Capítulo III.

Diversificação de sítios do DNA ribossômico 5S e 18S em populações de sete espécies do gênero *Ancistrus* (Loricariidae, Ancistrini) das três bacias hidrográficas do Mato Grosso, Brasil

Sandra Mariotto¹; Liano Centofante²; Marcelo Ricardo Vicari³; Orlando Moreira-Filho¹

1. Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPGGEv), São Carlos, São Paulo. mariottodolina@bol.com.br
2. Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto de Biociências, Laboratório de Citogenética e Genética Animal, Cuiabá, Mato Grosso. lianocentofante@yahoo.com.br
3. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

III.1. Introdução

Entre os eucariotos, os genes ribossomais 5S e 18S estão arrançados em duas classes distintas, a família gênica do rDNA maior (composta pelos genes 18S, 5.8S, 28S) e a do rDNA menor, composta pelos genes 5S (Pendás *et al.*, 1994). As regiões organizadoras de nucléolos analisadas pela simples impregnação por Nitrato de Prata (Ag-RONs), têm sido utilizadas há longa data para inferências em estudos sobre a citotaxonomia e evolução dos peixes (Galetti, 1998). No entanto, a localização física nos cromossomos dos genes ribossomais 5S e 18S através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) tem se intensificado somente recentemente (Vicente *et al.*, 2001).

Nos Siluriformes, poucos trabalhos têm sido realizados para caracterizar a localização dos genes de rDNA 5S e 18S. Nesta ordem, concentram-se principalmente nos Loricariidae (Kavalco *et al.*, 2004; Centofante *et al.*, 2006; Garcia & Moreira-Filho, 2008) e alguns Pimelodidae e Pseudopimelodidae, onde foram verificadas regiões ribossomais 5S e 18S não sintênicas (Carvalho & Dias, 2007; Garcia & Moreira Filho, 2008; Marques *et al.*, 2008). Cromossomos com sítios de rDNA 5S 18S sintênicos, em Loricariidae, foram observados por Centofante *et al.* (2006) na espécie *Harttia carvalhoi*.

A escassez de dados citogenéticos, especialmente com a técnica de FISH em loricarídeos, dificultam as análises citotaxonômicas e discussão da evolução nos Ancistrini, onde são conhecidas as RONS usando-se apenas impregnação por nitrato de prata. Com intuito de realizar inferências citotaxonômicas, biogeográficas e sobre a evolução cariotípica, este estudo teve como objetivo um mapeamento físico por FISH com sondas de rDNA 5S e 18S em sete espécies de *Ancistrus*, gênero tipo da tribo Ancistrini.

III.2. Materiais e métodos

Foram analisados citogeneticamente exemplares machos (M) e fêmeas (F) de populações de sete espécies do gênero *Ancistrus* de rios e córregos das três bacias hidrográficas do estado do Mato Grosso:

- (a) na Bacia Araguaia-Tocantins, Córrego Salgadinho, *Ancistrus* sp 13 (11M e 6F);
- (b) na Bacia do Paraguai, do Rio Coxipó, *Ancistrus claro* (11M e 10F); Córrego Flechas, Córrego Fundo, Rio Coxipó e Córrego Pari (2M e 2F por população) a espécie *Ancistrus cf dubius*; Rio Currupira, *Ancistrus* sp 08 (7M e 8F); Rio Sepotuba, *Ancistrus* sp 04 (12M e 15F); baía Arrombado, *Ancistrus cuiabae* (15M e 15F); e,
- (c) na Bacia Amazônica, do Rio Matrixã, *Ancistrus* sp 06 (9M e 5F).

Exemplares testemunhos das espécies estão depositados no museu da PUC/RS e foram identificadas por Edson H. Lopes, Alexandre Cardoso e Tiago Carvalho.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (Bertollo *et al.*, 1978). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONS) foram localizadas com o emprego do Nitrato de Prata (Howell & Black, 1980).

Os genes de rDNA foram localizados por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) utilizando uma sonda de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida por PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e, uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999). As sondas do rDNA maior foram marcadas com biotina 16-dUTP,

enquanto que as sondas do rDNA menor foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP, ambas por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Roche). Estas sondas foram utilizadas em procedimento de dupla FISH de acordo com Pinkel *et al.* (1986); sob condição de alta estringência (2,5 ng/ μ L de cada uma das sondas, 50% formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2XSSC a 37°C por 18 horas). Para a detecção do sinal foram utilizados os anticorpos avidin-FITC (Sigma) e anti digoxigenina rodamina – fab fragmentos (Roche), respectivamente. As preparações foram contra-coradas com DAPI e analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização da câmera CCD DP-71 (Olympus) com utilização do software DP-controller.

Para fotografar as preparações com nitrato de prata coloidal foi utilizada câmera digital com resolução de 8.1 Mp em microscopia de campo claro.

Os cromossomos foram organizados em quatro grupos no cariótipo: metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st) e acrocêntrico (a), dependendo da sua razão de braços (Levan *et al.*, 1964).

III.3. Resultados

Nas espécies analisadas foram observados números diplóides bem distintos: $2n=34$ em *Ancistrus cuiabae*, $2n=40$ em *Ancistrus* sp 13, $2n= 42$ nas quatro populações de *Ancistrus* cf. *dubius*, $2n=44$ em *Ancistrus* sp 08, $2n=50$ em *Ancistrus* sp 06, $2n=52$ em *Ancistrus* sp 04 e $2n=54$ em *Ancistrus claro*.

As Ag-RONs e a FISH com rDNA 18S evidenciaram marcações em apenas um par de cromossomos em todas as espécies/populações de *Ancistrus* analisadas. No entanto, há uma variação interespecífica quanto ao cromossomo portador e a posição desses sítios entre as populações analisadas (tabela 05 e figuras 11, 12). A localização do rDNA 5S mostrou uma variação numérica entre as espécies: um único par cromossômico marcado na espécie *Ancistrus* sp. 06; dois pares em *Ancistrus cuiabae*, *Ancistrus* sp. 13 e *Ancistrus* sp 08 e; três pares em *Ancistrus* cf. *dubius*, *Ancistrus* sp. 04 e *Ancistrus claro*; além de uma variação interespecífica entre a morfologia e localização desses sítios marcado(s) (Tabela 05 e Figura 12).

Com a utilização de duplo FISH, foi possível observar que as espécies *Ancistrus* cf. *dubius*, *Ancistrus* sp. 08, *Ancistrus* sp 06 e *Ancistrus claro* possuem um par de cromossomos que apresenta sintenia dos sítios de rDNAs 18S e 5S, com variações interespecíficas quanto aos cromossomos portadores e a localização esses sítios.

Nas demais espécies, *Ancistrus cuiabae*, *Ancistrus* sp. 13 e *Ancistrus* sp 04 os pares portadores de rDNA 18S e 5S são independentes. Os resultados acima descritos, além da tabela 05 e figura 12, foram esquematizados na forma de idiograma na figura 13.

Tabela 05. Sítios de rDNA 5S e 18S e de AgRONs, no gênero *Ancistrus*.

Espécie	2n	Fórmula cariotípica	Ag-RON	18S rDNA	5S rDNA
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	A: 20m, 8sm, 6st; B: 19m, 8sm, 6st, 1a; C: 18m, 8sm, 6st, 2a	m,te; a, lt	m, te; a, lt	m, lt; m, lt
<i>Ancistrus</i> sp. 13	40	30m, 6sm, 4st	sm, te	sm, te	m, lt; m, lt
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	24m, 10sm, 8st	sm, lt	sm, lt	m, pc; m, lt; sm, lt
<i>Ancistrus</i> sp. 08	44	18m, 10sm, 16st/a	sm, lt	sm, lt	m, pc; sm, pc
<i>Ancistrus</i> sp. 06	50	18m, 10sm, 8st, 14a	a, te	a, te	a, Te
<i>Ancistrus</i> sp. 04	52	16m, 8sm, 6st, 22a	a, lt	a, lt	a, lt; a, lt; st, te
<i>Ancistrus claro</i>	54	14m, 8sm, 8st, 24a	a, lt	a, lt	m, pc a, lt; st, lt;

Legendas: metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st), acrocêntrico (a), intersticial (lt), terminal (te), pericentromérica (pc), número diplóide (2n).

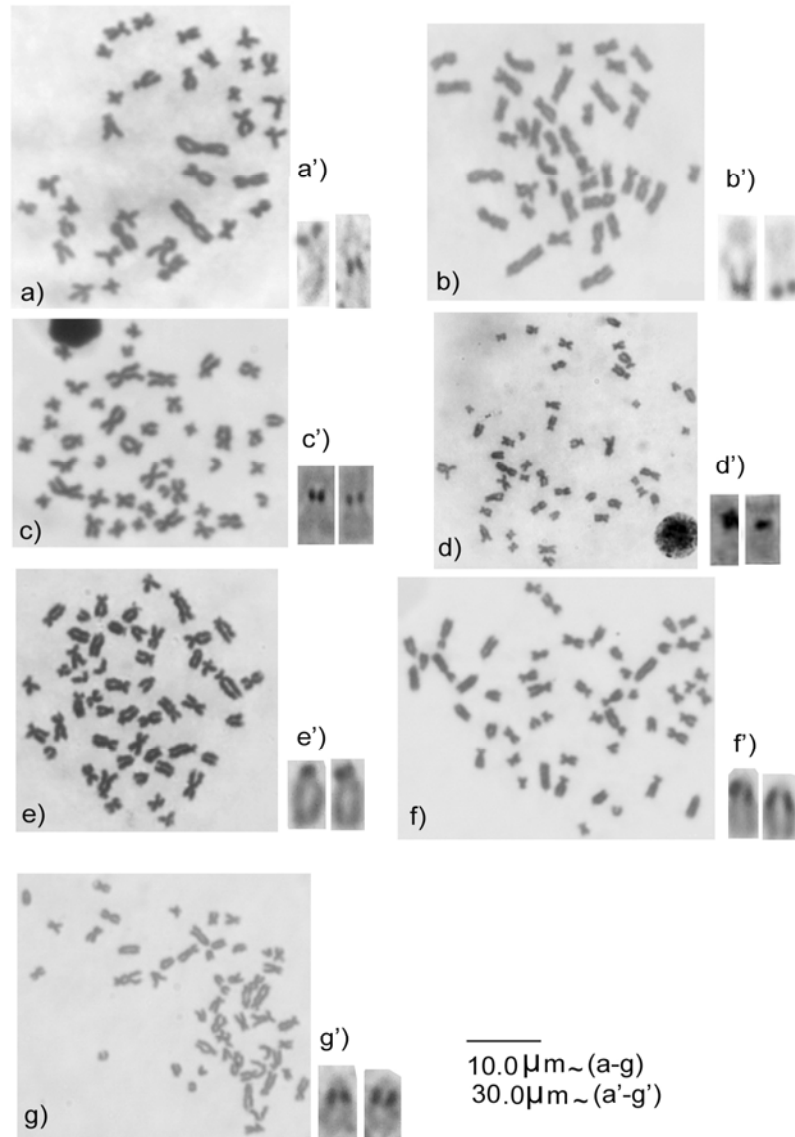


Figura 11. Metáfases em Giemsa convencional (a-g) e recorte dos cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos (a'-g') com impregnação pelo nitrato de Prata.

a) *Ancistrus cuiabae*, b) *Ancistrus* sp 13, c) *Ancistrus cf dubius*,
 d) *Ancistrus* sp 08, e) *Ancistrus* sp 04, f) *Ancistrus* sp 08, g) *Ancistrus claro*.

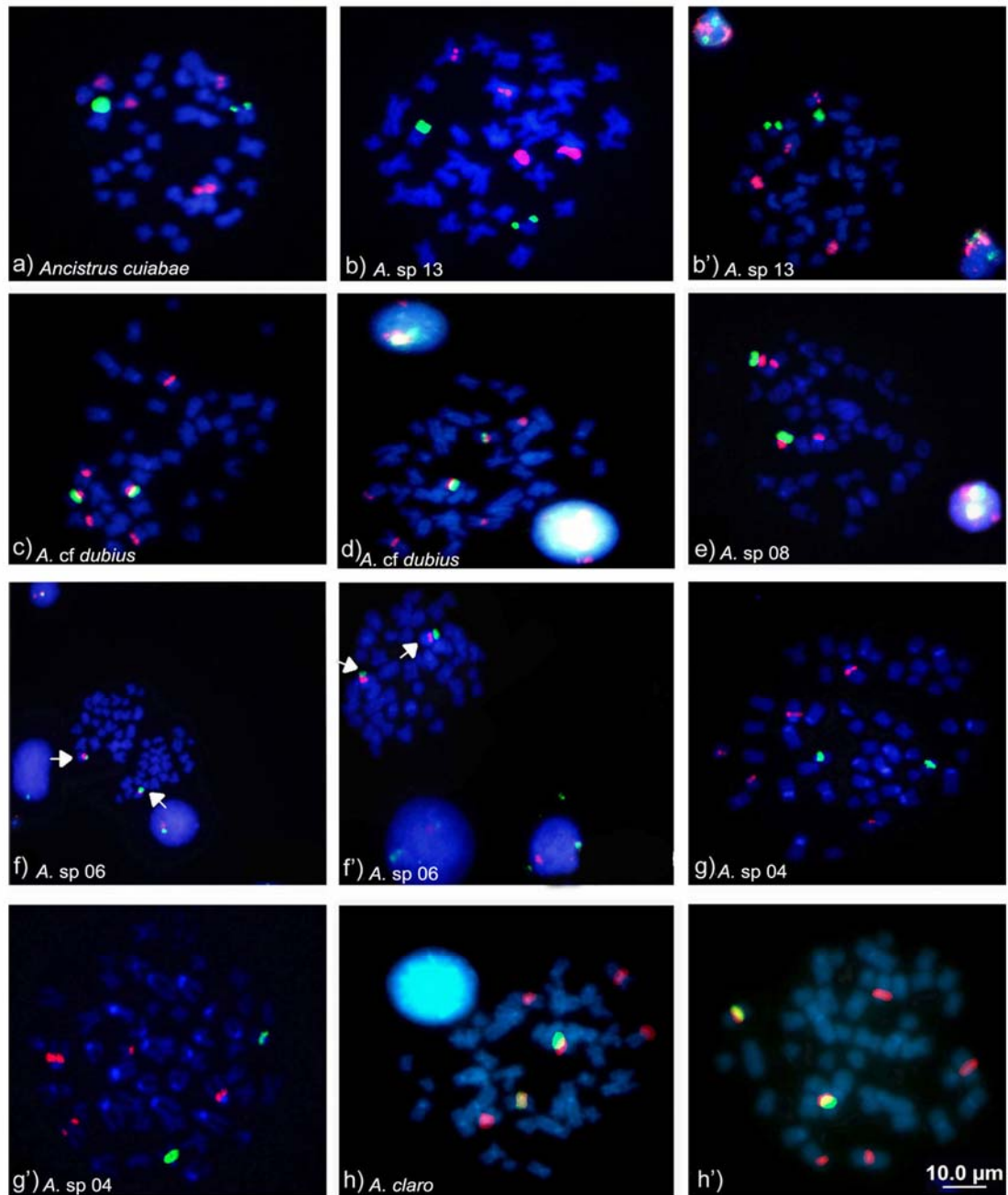


Figura 12. Metáfases das sete espécies do gênero *Ancistrus* evidenciando os sítios de rDNA 18S (verde) e 5S (rosa), todas com um par de cístrons ribossomais 18S (a-h'); quatro com 5S sintênicos ao 18S (c, d, e, f, f', h, h'); três com três pares de sítios 5S em distintos cromossomos (c, d, h, h'); quatro com dois pares de rDNA 5S em distintos cromossomos (a, b, b', e, g, g') e apenas uma com um par de cromossomos portador da região 5S (f, f').

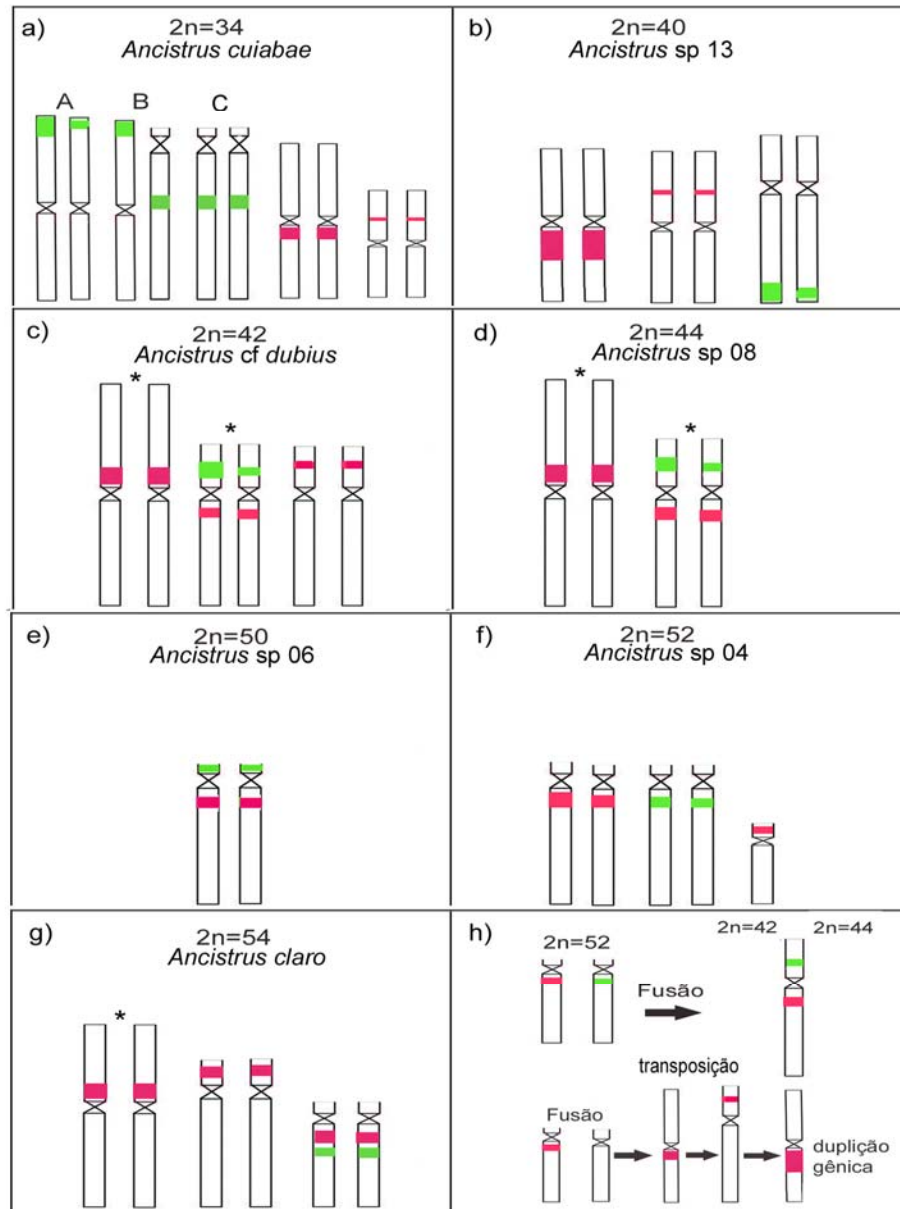


Figura 13. Idiograma dos cromossomos portadores de rDNA (a-g) 5S (rosa) e 18S (verde); A, B, C) distintos citótipos do par portador do rDNA 18S; h) prováveis fusões e transposições responsáveis pela diversidade de tipos de cromossomos marcados; *) possíveis cromossomos homeólogos.

III.4. Discussão

O tamanho das regiões organizadoras de nucléolos pode variar em muitos grupos de vertebrados, inclusive em peixes, e estas variações, possivelmente estão relacionadas ao número de cópias derivadas de permutas desiguais dos cromossomos homólogos durante a meiose (Foresti *et al.*, 1981). RONS simples e intersticiais parecem ser um caráter primitivo nos Loricariidae, caráter o qual é mantido na maioria das espécies da tribo Ancistrini, como observado nos trabalhos de Artoni & Bertollo (2001), Alves *et al.* (2003), Mariotto *et al.* (2004), Mariotto & Miyazawa (2006), de Oliveira *et al.* (2006 e 2007), Mariotto *et al.* (submetido) e presente estudo. Porém alguns grupos de peixes podem apresentar variações de tamanho, números de cromossomos e posição das regiões organizadoras de nucléolos (Foresti *et al.*, 1981; Moreira-Filho *et al.*, 1984; Almeida-Toledo, 1985; Galetti *et al.* 1985; Vicari *et al.*, 2006).

Nos Loricariidae, as variações numéricas e/ou estruturais das RONS foram verificadas em algumas espécies das subfamílias Upsilodinae e Neoplecostominae (Kavalco *et al.*, 2005), Hypoptopomatinae (Andreatta *et al.*, 1994), Loricariinae (Giuliano-Caetano, 1998 e Kavalco *et al.*, 2005), Hypostominae (Kavalco *et al.*, 2005 e Mariotto *et al.*, submetido).

RONS múltiplas, na tribo Ancistrini, foram observadas em apenas três espécies de dois gêneros: *Peckoltia* sp. 1., *Peckoltia* sp. 2. (Souza, 2003) e em *Hemiancistrus spilomma* (de Oliveira *et al.*, 2006). No entanto, nenhum registro de RONS múltiplas é descrito para o gênero *Ancistrus*.

As sondas de rDNA 18S confirmaram os dados obtidos com impregnação por nitrato de prata para as espécies aqui analisadas e evidenciaram a conservação do caráter primitivo dos Loricariidae para este cístron no cromossomo, simples e intersticial para a maioria das espécies.

Os resultados aqui obtidos permitem também inferir que as fusões cromossômicas, como já fora suposto para a tribo por Alves *et al.* (2003), devem ter reduzido o número diplóide de algumas das espécies. Além das fusões, trocas meióticas desiguais, fissões, transposições e inversões cromossômicas são hipóteses que devem ser consideradas neste táxon diversificado, porém estes rearranjos não alteraram o número de sítios dos genes ribossomais 45S. É provável

que estes sítios estejam protegidos de eventos meióticos que poderiam promover o aparecimento de NORs múltiplas no gênero.

No entanto, as prováveis fusões cromossômicas, transposições e as inversões pericêntricas poderiam ser responsáveis pela mudança completa da região gênica 45S para diferentes tipos de cromossomos, a partir de um citótipo ancestral.

Neste trabalho, a proposição de um citótipo ancestral no gênero deve ser similar ao apresentado pela espécie *Ancistrus claro*, com $2n=54$ cromossomos e rDNA 5S e 18S sintênicos, intersticiais num par de cromossomos acrocêntricos e outros dois pares de cromossomos com sítios de rDNA 5S, um metacêntrico e outro subtelocêntrico.

A análise da localização dos sítios de rDNA 5S em espécies do gênero *Ancistrus* mostraram variações no número de sítios relativos a este gene e uma diversidade de tipos cromossômicos onde estão localizadas. A maioria está na porção intersticial do braço longo ou do braço curto dos cromossomos, mas em alguns casos, como em *Ancistrus claro*, *Ancistrus cf dubius* e *Ancistrus* sp 08, marcações com rDNA 5S também são verificadas na região pericentromérica de um par de metacêntricos grande e estes parecem ser homeólogos.

A prevalência de genes ribossomais 5S na posição intersticial e pericentromérica foi observada por Garcia & Moreira Filho (2008) e segundo Martins & Galetti Jr (1999) a localização intersticial destes genes pode estar relacionada a um maior grau de proteção das seqüências de permutas e transposições, eventos freqüentes na meiose.

Nos *Ancistrus* a variação de rDNA 5S pode estar relacionada a mecanismos genéticos, como inversões pericêntricas e permutas desiguais que, diferente dos sítios ribossomais 18S, resultou na diversidade atual de números de pares e tipos de cromossomos marcados com rDNA 5S e, provavelmente estas alterações, têm sido favoráveis às diferentes espécies do gênero nos diversos habitats.

Em peixes da ordem Characiformes, de acordo com Martins & Galetti Jr (1999 e 2001) Born & Bertollo (2000), a ocorrência de rDNA 5S está, na maioria, na posição intersticial de dois pares de cromossomos e geralmente não é sintênico ao rDNA 45S. Distintos rearranjos das regiões ribossomais 5S também parecem ter contribuído na evolução e diversificação dos Anostomidae (Aguilar & Galetti Jr., 2008).

Hipóteses sobre a posição e evolução dos genes ribossomais 5S e 18S nos cromossomos de espécies da ordem Siluriformes são mais difíceis pela escassez de dados em alguns poucos grupos de espécies.

Na família Pimelodidae, alguns trabalhos utilizaram sondas rDNA 5S e 18S, como Swarça (2003) que verificou marcações de rDNA 5S em três espécies desta família e concluiu que estes genes se localizavam em cromossomos distintos dos cromossomos da NOR. Carvalho & Dias (2007) verificaram a presença de cístrons ribossomais 18S na região terminal do braço longo de um par de cromossomos subtelocêntricos na espécie *Iheringichthys labrosus*. Nesta mesma espécie os genes 5S marcaram o braço longo de um par de cromossomos subteloacrocêntrico.

Em análises de espécies das famílias Pimelodidae e Pseudopimelodidae Marques *et al.* (2008) observaram apenas um par de cromossomos marcados com sondas rDNA 18S e um par com rDNA 5S em diferentes espécies de ambas as famílias.

Em Loricariidae, na espécie *Harttia carvalhoi*, sondas de rDNA 5S e 18S evidenciaram um par de 18S sintênico ao 5S e outro par com uma marca de rDNA 5S menor (Centofante *et al.*, 2006), porém esta espécie apresenta um sistema de cromossomos sexuais múltiplos o que sugere ter um citótipo derivado.

Estes dados de grupos próximos aos Ancistrini, como os Pimelodidae, Pseudopimelodidae bem como outras espécies de Loricariidae, sugerem que o rDNA 5S simples e em pares de cromossomos diferentes do rDNA 18S podem ser uma plesiomorfia nos Siluriformes. Fenótipos com rDNA 5S múltiplos e sintênicos em outros Loricariidae, como em *Harttia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e algumas espécies de *Ancistrus* (presente estudo), pode ser uma condição derivada de transposições desses sítios, ocorridas ao longo da evolução. A posição terminal dos genes rDNA 18S em algumas espécies nos Ancistrini pode indicar a preservação deste caráter dos Siluriformes primitivos ou resultado dos rearranjos cromossômicos acima citados.

Estes resultados diferem de espécies de outros grupos taxonômicos onde o rDNA 45S é variável mas as espécies mantêm a estabilidade dos genes rDNA 5S, como é o caso do complexo *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2005) e de

outras espécies do gênero *Astyanax* (Ferro *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002).

Cístrons de rDNA 5S heteromórfios em relação ao tamanho foram observados em diversos grupos de peixes, como em espécies do gênero *Parodon* (Vicente *et al.*, 2001), *Leporinus* (Martins & Galetti, 1999) e *Schizodon* (Martins & Galetti, 2000).

Na família Pimelodidae estas marcações com sondas rDNA 5S foram observadas com menos intensidade de fluorescência em um dos dois pares de cromossomos com estes cístrons na espécie *Pimelodus fur* e os autores acreditam que isto esteja relacionado aos rearranjos cromossômicos e redução do número diplóide da espécie (Garcia & Moreira Filho, 2008). Em Loricariidae, na espécie *Harttia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) também se verificou cístrons menores de rDNA 5S. Caso semelhante foi observado na espécie *Ancistrus* sp 13, que possui dois pares de cromossomos com rDNA 5S, porém num dos pares a marcação fluorescente chega a parecer até seis vezes maior que o segundo par marcado. É possível que esta condição seja derivada de duplicações gênicas que ocorreram ao longo da evolução da espécie.

A proposição de que o rDNA 5S e 18S sintênicos são apomorfias no gênero *Ancistrus* corrobora com outras análises em espécies com características citotípicas mais derivadas, como *Ancistrus* cf *dubius* e *Ancistrus* sp 08, onde já foram verificados cromossomos sexuais, número diplóide reduzido e blocos expressivos de heterocromatina constitutiva (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006). Enquanto as espécies que mantêm características cromossômicas semelhantes às consideradas mais ancestrais no grupo, como *Ancistrus* sp 04 com $2n=52$ cromossomos, foram observados os cístrons para os dois genes em diferentes pares, não sintênicos, RONS simples e intersticiais e heterocromatina escassa (presente estudo). As mesmas considerações podem ser feitas, através desta análise, para os genes rDNA 5S e 18S não sintênicos nas espécies *Ancistrus cuiabae* com $2n=34$ cromossomos, polimorfismo cromossômico e de rDNA 18S (Mariotto *et al.*, submetido) que parece também ter características derivadas dentro do grupo; e, *Ancistrus* sp 13 com $2n=40$ cromossomos e heterocromatina constitutiva em grandes blocos nos cromossomos (presente trabalho).

A espécie *Ancistrus* sp 06 ($2n=50$), da Bacia Amazônica, é a única que apresentou a região ribossomal 5S com apenas um par de cromossomos marcados, porém também apresenta 18S e 5S sintênicos, indicando, possivelmente a perda de parte do braço curto do par após a fusão dos cromossomos portadores do rDNA. Como não foram localizados trabalhos com sondas rDNA 5S e 18S em espécies de Loricariidae na bacia Amazônica e Araguaia-Tocantins não é possível fazer comparações destas análises entre as bacias hidrográficas.

Porém, entre as espécies da bacia do Paraguai parece haver uma grande plasticidade cromossômica e a diversidade dos tipos de cromossomos com cístrons ribossomais 5S e 18S no gênero *Ancistrus* fundamentam o alto grau de diversificação cariotípica neste táxon.

Os resultados aqui apresentados mostram uma diversidade dos cromossomos marcados com rDNA 18S e 5S para espécies do gênero *Ancistrus*. Mesmo em relação ao marcador de rDNA 18S, considerado conservado, em um único par de cromossomos e de localização intersticial, na maioria, foram observadas variações de localizações de sítios nos distintos tipos de cromossomos. A diversidade maior, com variações de número e localizações de sítios foram visualizadas para o marcador de rDNA 5S, em alguns casos ocorrendo em sintonia com o rDNA 18S.

Alterações estruturais como inversões pericêntricas e fusões são as hipóteses mais prováveis para explicar a variação encontrada nos rDNAs 5S e 18S nas espécies estudadas no gênero *Ancistrus*. Estes resultados corroboram com as hipóteses para explicar a diversidade e evolução cariotípica neste grupo especioso dos Loricariidae. Podem ainda, auxiliar com relação a biogeografia do grupo e contribuir como marcadores citotaxonômicos dentro da tribo Ancistrini, a qual ainda apresenta taxonomia confusa pela extrema diversidade de formas e com variações geográficas acentuadas.

III.5. Referências bibliográficas

As referencias bibliográficas deste capítulo estão no final da tese.

Capítulo IV:

Diversidade e evolução cromossômica no gênero *Ancistrus* (Loricariidae, Ancistrini) das três bacias hidrográficas do Estado do Mato Grosso, Brasil.

Sandra Mariotto¹ Liano Centofante² Orlando Moreira Filho¹

1-Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPGGEV).

2-Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto de Biociências, Laboratório de Citogenética e Genética Animal.

IV.1.Introdução

O gênero *Ancistrus* tem o segundo maior número de espécies dentre todos os Loricariidae, com um total de 59 espécies descritas até o presente, perdendo apenas para o gênero *Hypostomus* (Ferraris, 2007). As espécies deste gênero são consideradas mais derivadas, que as pertencentes aos outros 28 gêneros conhecidos da tribo Ancistrini, grupo irmão da tribo Pterygoplichthini (Armbruster, 1997 e 2004).

Os *Ancistrus* são peixes de pequeno porte, até 15 cm de comprimento, corpo largo e deprimido, coberto de placas dérmicas, focinho liso e algumas espécies com tentáculos cutâneos longos e numerosos (Burgess, 1989).

As características cromossômicas do gênero têm surpreendido pela diversidade cariotípica, presença de sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos e polimorfismo cromossômico (Mariotto *et al*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al*, 2008; Mariotto *et al*, submetido). Mesmo assim, o número de espécies com análises citogenéticas chega somente a cerca de 10% na tribo Ancistrini e corresponde a cerca de 20% no gênero *Ancistrus*.

Rearranjos cromossômicos, como fusões, inversões pericêntricas e paracêntricas, acúmulo de heterocromatina constitutiva e/ou translocações foram importantes na evolução cariotípica e diversificação de alguns grupos de peixes de água doce da região neotropical (Giuliano-Caetano, 1998; Artoni & Bertollo, 1999; Kavalco *et al.*, 2005). Segundo Alves *et al.* (2003) e de Oliveira (2006), há um predomínio das fusões cêntricas nos rearranjos cromossômicos no gênero *Ancistrus* e uma tendência evolutiva para a redução do número diplóide neste táxon. Entretanto, outros rearranjos tais como, inversões pericêntricas e acúmulo de heterocromatina constitutiva demonstram a importância na diversificação cromossômica e contribuem para a compreensão da evolução cariotípica dos loricarídeos.

Neste trabalho, as análises feitas em 10 espécies de diferentes populações no gênero *Ancistrus*, serão discutidas e comparadas de acordo com a distribuição geográfica das mesmas.

IV.2. Materiais e métodos

As análises citogenéticas foram realizadas em 147 exemplares de dez populações de diferentes espécies (fig. 14 e tabela 06), das três bacias hidrográficas do estado do Mato Grosso: Bacia do Paraguai, Araguaia-Tocantins e Bacia Amazônica (fig.14). Exemplares testemunhos das espécies identificadas tabela 06 com asteriscos estão depositados no laboratório de Citogenética e Genética Animal da UFMT. Exemplares testemunhos das demais espécies foram depositadas no museu da PUC/RS e identificadas por Alexandre Cardoso e Tiago Carvalho, sendo que a maioria são novas (sp) para a ciência e aguardam por descrição taxonômica. As localidades foram georeferenciadas de acordo com o mapa I3geo do Ministério do Meio Ambiente (MMA), conforme a tabela 06.

As técnicas de citogenética convencional utilizadas foram: para a obtenção de cromossomos mitóticos por Bertollo *et al.* (1978); para visualizar as regiões heterocromáticas (Banda C) foi utilizada a técnica de Sumner (1972); para análise das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) com o uso de Nitrato de Prata (Howell & Black, 1980).

Depois de fotografados com câmera digital com resolução 8.1 Mp em microscopia de campo claro, os cromossomos das melhores metáfases foram recortados e pareados no programa Adobe Photoshop 7.0, seguindo a ordem de tamanho e posição do centrômero, em quatro distintos grupos: metacêntrico (m), submetacêntrico (SM), subtelocentric (st) e acrocêntrico (a) conforme Levan *et al.* (1964).

Tabela 06. Espécies de *Ancistrus* analisadas com as respectivas bacias hidrográficas e localização aproximada de acordo com o Igeo/MMA.

Sistema Hidrográfico	Espécie	Número machos (M) e fêmeas (F)	Local/Município	Latitude e Longitude aproximados
Bacia do Paraguai	<i>Ancistrus</i> sp 10	06 M e 04 F	A. Rio Vermelho/ Rondonópolis	16°28'39"S 54°35'3"W
	<i>Ancistrus</i> sp 11	03 M e 06 F	B. Córrego /Cáceres	16°3'33"S 57°40'33"W
	<i>Ancistrus</i> sp 12	05 M e 06 F	C. Córrego Santa Cruz/ Cuiabá	15°36' S 56° 03' W
	<i>Ancistrus claro</i>	11 M e 10 F	D. Rio Coxipó/ Chapada dos Guimarães	15°21' S 55°57' W
	<i>Ancistrus</i> sp 03	06 M e 06 F	E. Córrego Pari /Cuiabá	15°36' S 56°12' W
	<i>Ancistrus</i> sp 01	06 M 07 F	F. Córrego Pipa/ Serra de São Vicente	15°41'S 55°29' W
	<i>Ancistrus</i> sp 04	12 M 15 F	G. Córrego São José e Rio Sepotuba/Tangará da Serra	14°33' S 57°24' W e 14°41' S 57°48' W
Bacia Amazônica	<i>Ancistrus</i> sp 06	9 M e 05 F	H. Rio Matrixã/ Nova Monte Verde	10°3'7"S 57°36'27"W
	<i>Ancistrus tombador</i>	08 M e 05 F	I. Rio Preto/Diamantino	15°2'12"S 56°13'33" W
Bacia Araguaia/ Tocantins	<i>Ancistrus</i> sp 13	11 M e 06 F	J. Córrego Salgadinho/ Nova Xavantina	14°40'14"S 52°21'50"W

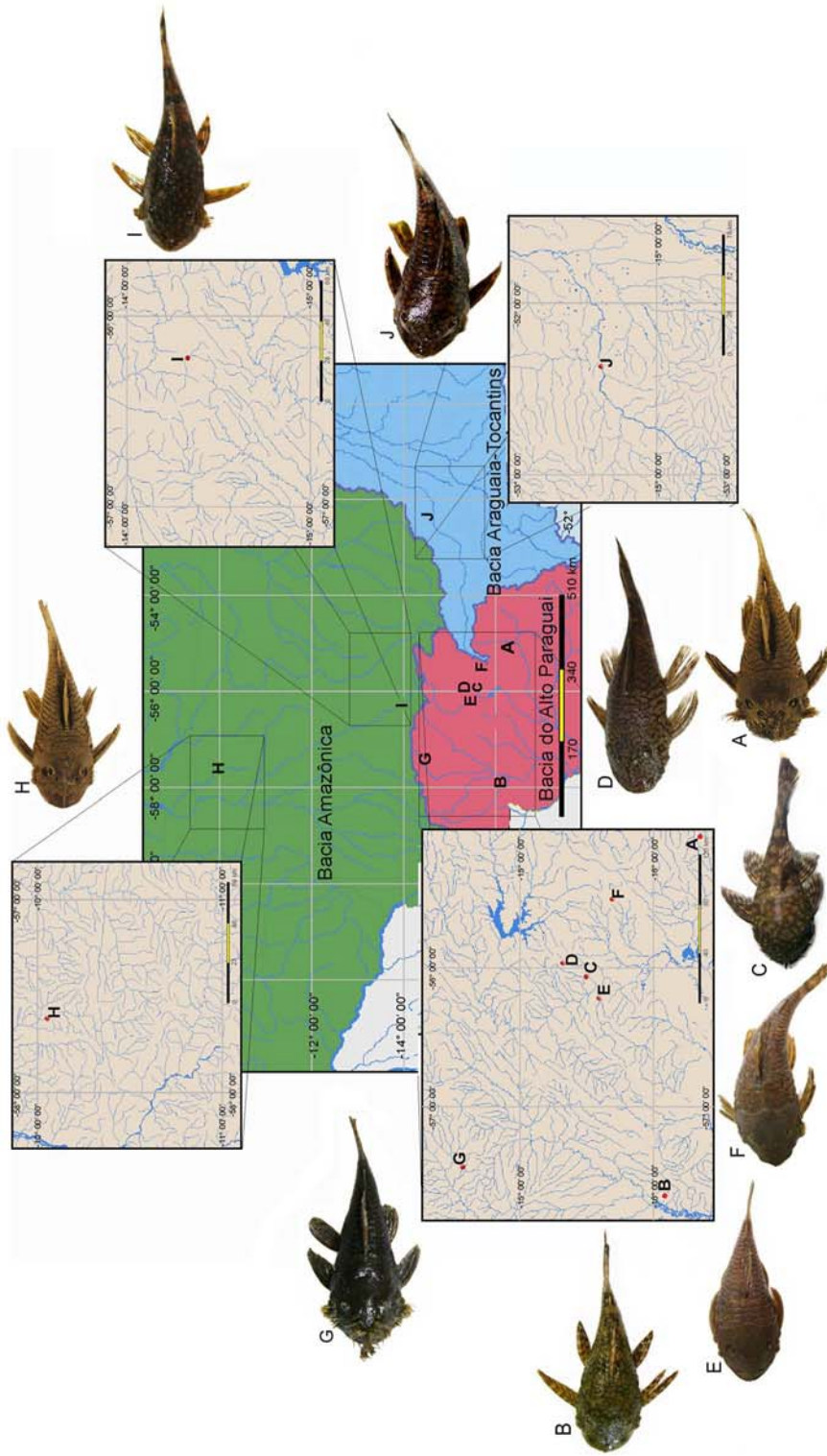


Figura 14. Recorte do mapa da hidrografia do Brasil evidenciando as três bacias hidrográficas do Mato Grosso, Amazônica, Araguaia-Tocantins e Paraguai, com destaques dos locais amostrados (fonte mapas I3Geo/MMA) e as respectivas espécies do gênero *Ancistrus*. **A** *Ancistrus* sp 03, **B** *Ancistrus* sp 10, **C** *Ancistrus* sp 11, **D** *Ancistrus* sp 12, **E** *Ancistrus* sp 04, **F** *Ancistrus* sp 06, **G** *Ancistrus* sp 13, **H** *Ancistrus* sp 01, **I** *Ancistrus* sp 02, **J** *Ancistrus* sp 05.

IV.3. Resultados

As espécies de diferentes populações foram analisadas e evidenciaram números diplóides bastante diversificados, de $2n=40$ a $2n=54$, além da diversidade na fórmula cariotípica das distintas espécies. O número Fundamental verificado foi de $NF=80$ a 86 . As diferenças no número diplóide, fórmula cariotípica, bandamento C e posição das regiões organizadores de nucléolos estão expostos na tabela 07.

Tabela 07. Dados cariotípicos nas por espécies de *Ancistrus* analisadas, em ordem crescente do número diplóide:

Espécie	Local	2n	NF	Fórmula cariotípica	Par AgRON	Variações observadas
<i>Ancistrus claro</i> , A. sp 01 e sp 03	D.E.F	54	84	14m, 8sm, 8st, 24a	21° a	
<i>Ancistrus sp 04</i>	G.	52	82	16m, 8sm, 6st, 22a	23° a	
<i>Ancistrus sp 06</i>	H.	50	86	18m, 10sm, 8st, 14a	21° a	
<i>Ancistrus tombador</i>	I.	50	84	14m, 12sm, 8st, 16a	20° a	
<i>Ancistrus sp 10</i>	A.	42	82	22m, 14sm, 4st, 2a	5° m	Cromossomos sexuais ZZ/ZW
<i>Ancistrus sp 11</i>	B.	42	84	24m, 12sm, 6st	15° sm	Cromossomos sexuais XX/XY
<i>Ancistrus sp 12</i>	C.	42	84	28m, 10sm, 4st	5° m	Polimorfismo cromossômico e heterocromático
<i>Ancistrus sp 13</i>	J.	40	80	30m, 6sm, 4st	18° sm	Polimorfismo heterocromático

Legendas: A-J= locais de coleta, conforme a tabela 06; $2n$ = número cromossômico diplóide; NF = número fundamental; m= metacêntrico, sm= submetacêntrico, st= subtelocêntrico, a= acrocêntrico; AgRONS= organizadoras de nucléolos.

Além das variações apresentadas na tabela 07, os espécimes das populações dos locais D. E. F. G. H. e I. possuem pouca heterocromatina constitutiva, com blocos pequenos e pálidos nas regiões intersticiais e pericentroméricas de alguns cromossomos. Somente no par portador das RONS, em algumas metáfases, é possível verificar blocos de heterocromatina mais corados. Estas populações não apresentaram diferenças citogenéticas entre machos e fêmeas, tanto em relação aos pequenos blocos heterocromáticos quanto à fórmula cariotípica. O único polimorfismo comum, intra-individual, é em relação ao tamanho das RONS, que mostrou marcações maiores e menores quando submetidas ao nitrato de prata, porém as RONS são simples para todas as espécies com sítios ribossomais intersticiais e terminais (Fig. 15, 16, 17, 18 e 19). Além da dificuldade na obtenção de boas metáfases em algumas espécies, nas espécies que possuem $2n=54$ foram observados cromossomos acrocêntricos muito pequenos se comparados com os cromossomos maiores e na maioria das metáfases estes ficaram sobrepostos dificultando melhores análises. A heterocromatina constitutiva escassa, com blocos diminutos e geralmente pálidos, quando submetidos a banda C inviabilizou a montagem de cariótipos a partir desta técnica em algumas espécies.

Os espécimes das populações dos locais A. B. C. e J., porém, mostram-se bastante diversificados quanto aos padrões de heterocromatina constitutiva e fórmula cariotípica, com blocos bem expressivos e número diplóide mais reduzido (fig. 20, 21, 22 e 23). Nessas populações foram observados citótipos bem distintos em *Ancistrus* sp 12 e *Ancistrus* sp 13 e entre machos e fêmeas de *Ancistrus* sp 10 e *Ancistrus* sp 11. Nos espécimes da população J., em alguns exemplares, um grande cromossomo subtelocêntrico mostrou-se com o braço longo quase totalmente heterocromático (fig.23) enquanto seu homólogo apresenta o bloco heterocromático menor. Já em *Ancistrus* sp 12 (fig. 22) foi também observado um cromossomo subtelocêntrico grande com o braço longo quase totalmente heterocromático, mas seu homólogo, além de eucromático é bem menor. Em outros exemplares da espécie as metáfases mostraram-se com um par de subtelocêntricos muito similares (fig. 22, c'), no entanto, o número de espécimes analisados e os resultados de banda C não permitem concluir se é um caso de polimorfismo intrapopulacional ou cromossomos sexuais.

Na espécie *Ancistrus* sp 10 foi verificado, nas fêmeas, um par de cromossomos acrocêntricos distintos, um deles quase totalmente heterocromático e seu homólogo, menor, eucromático. Por sua vez, nos machos foi encontrado um par de acrocêntricos grandes, bastante similares, com blocos expressivos de heterocromatina constitutiva, indicando tratar-se de um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW (fig. 20).

Na espécie *Ancistrus* sp 11, as fêmeas apresentaram um par de cromossomos subtelocêntricos similares com grande quantidade de heterocromatina constitutiva, enquanto que os machos apresentaram um par subtelocêntrico diferenciado, onde um dos cromossomos é idêntico ao observado para as fêmeas e o outro cromossomo é quase totalmente eucromático e bem menor em tamanho (fig. 21), indicando um provável sistema de cromossomos sexuais XX/XY.

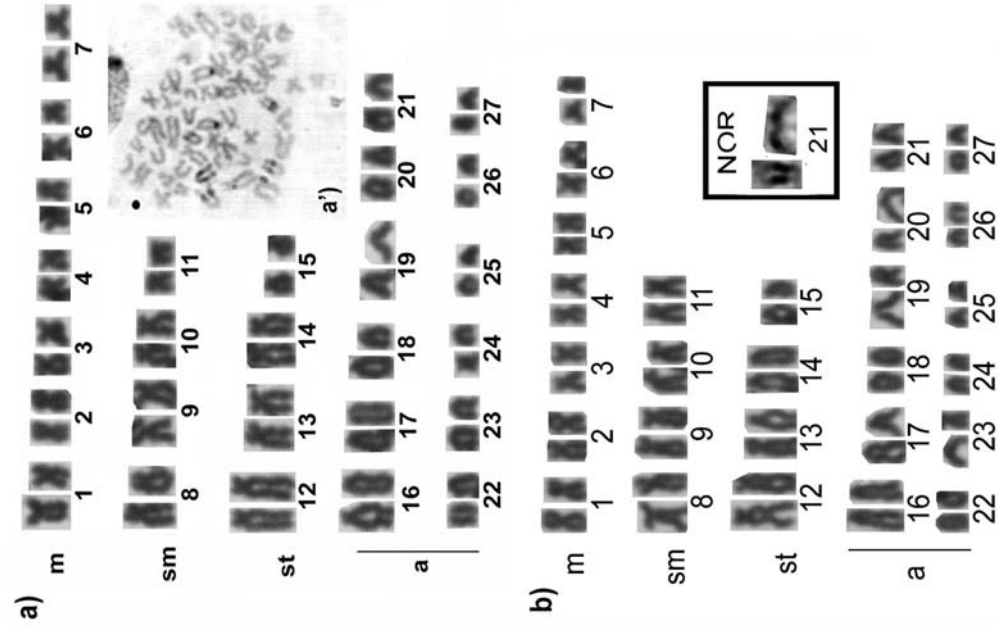


Figura 16. Cariótipo de um macho a) e de uma fêmea b), em Giemsa, da espécie *Ancistrus claro* do Rio Coxipó, com a NOR no par 21. a') Banda C evidenciando poucos blocos heterocromáticos.

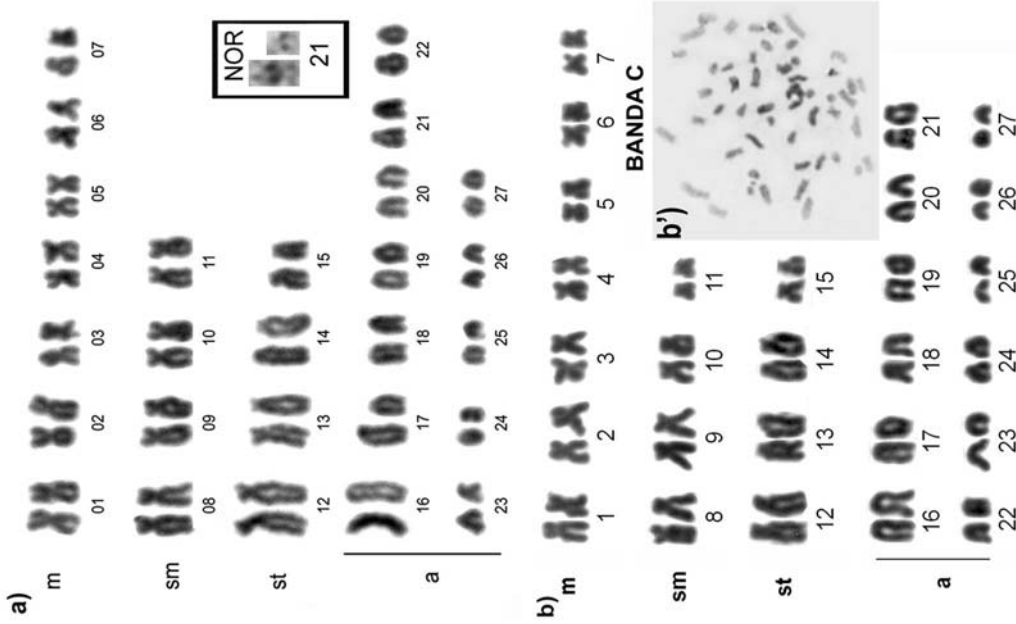


Figura 15. Cariótipo de *Ancistrus* sp 03 a) do Córrego Pari, com NOR no par 21. Cariótipo de *Ancistrus* sp 01 do Córrego do Pipa b) com banda C b').

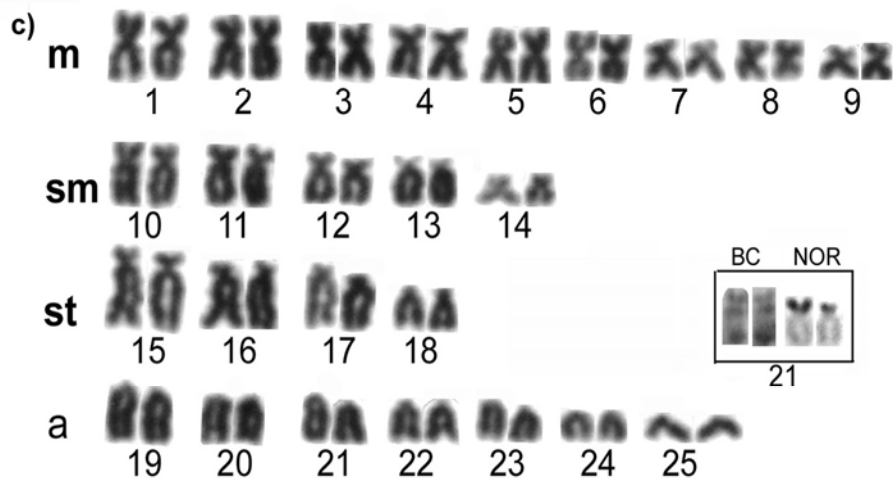
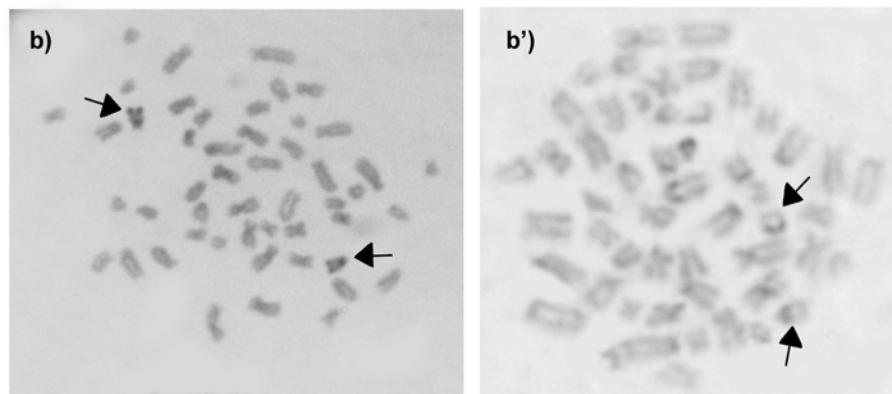
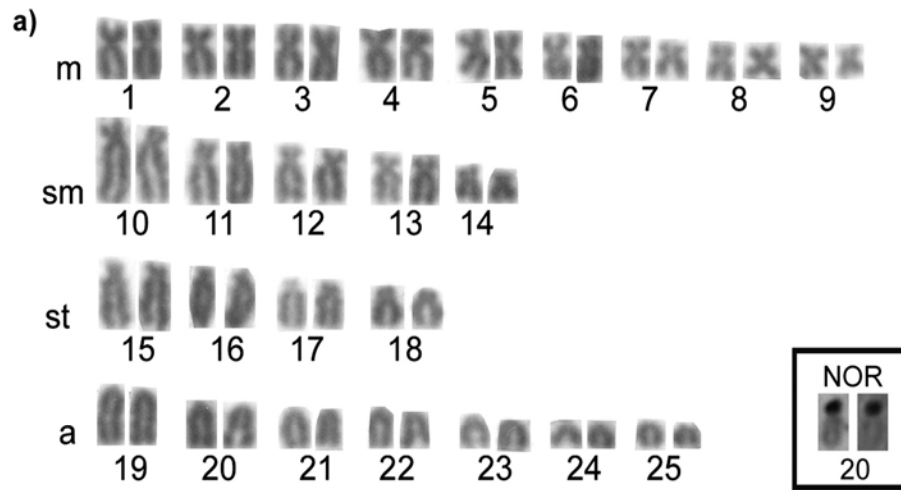


Figura 17. Cariótipo de macho a) e fêmea c) em Giemsa de *Ancistrus* sp 06, do Rio Matrixã. Banda C em metafases de macho b) e fêmea b'). As setas apontam cromossomos que marcam com AgNOR. Em recorte, par 21 com NORs.

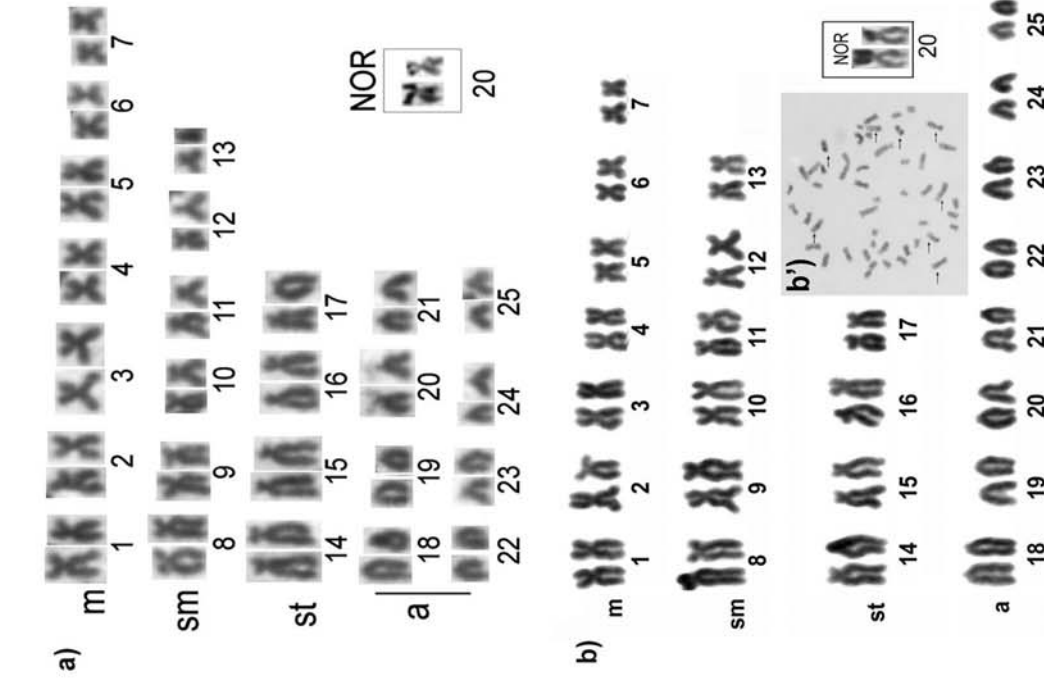


Figura 19. Cariótipo de macho a) e fêmea b) de *Ancistrus tombador* do Rio Preto, em Giemsa. b') banda C e NORs.

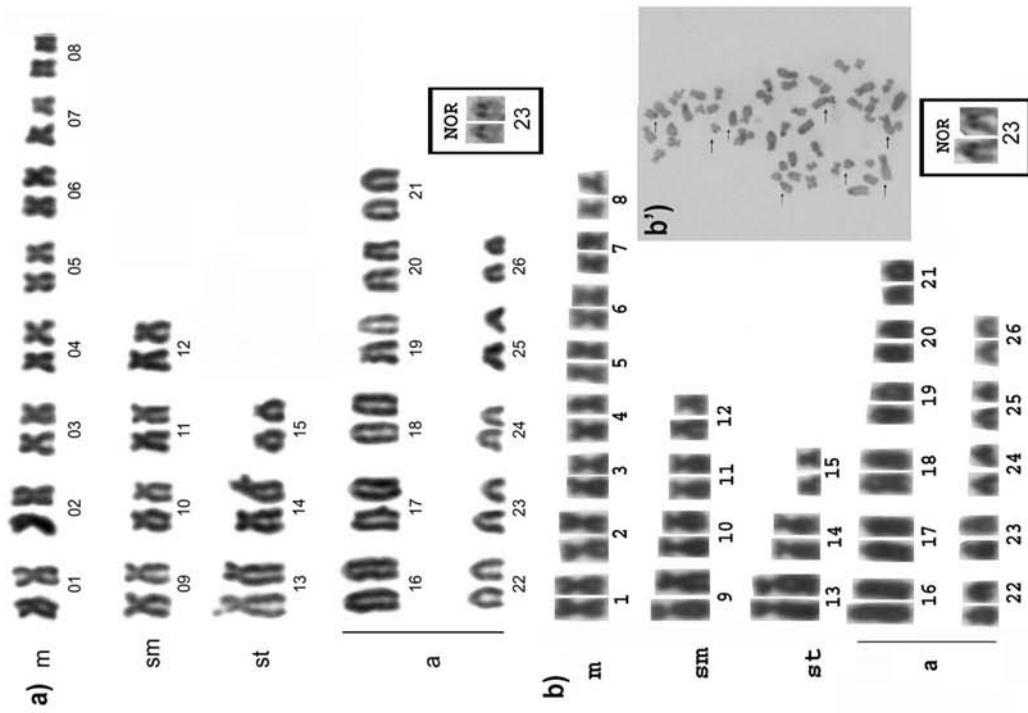


Figura 18. Cariótipo em Gimsa de *Ancistrus* sp 04 de Tangará da Serra, a) macho e b) fêmea. b') Banda C, em recorte NOR no par 23.

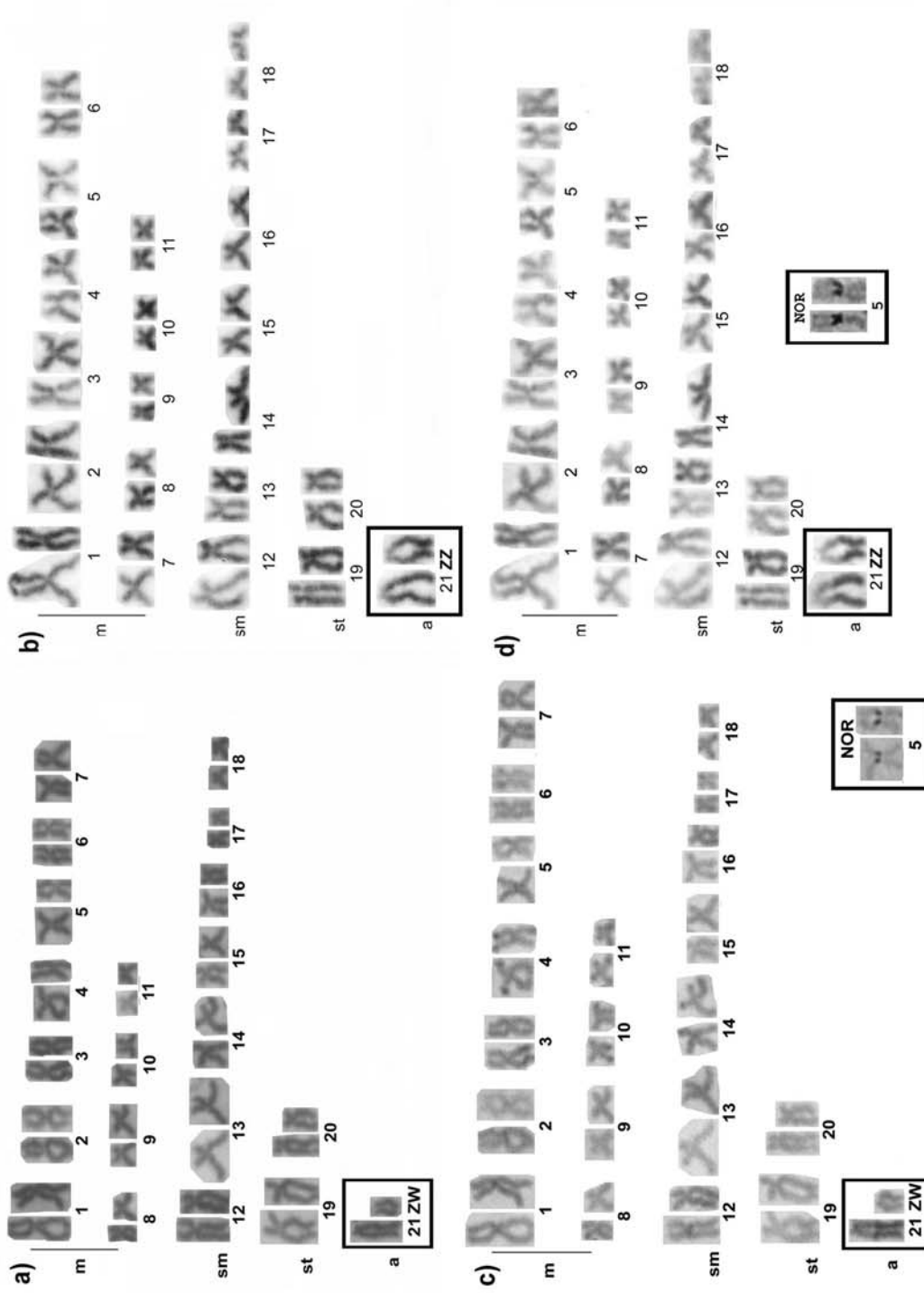


Figura 20. Cariótipo de fêmea a) e macho b) de *Ancistrus* sp 10, de Rondonópolis com prováveis cromossomos sexuais ZZ/ZW, em Giemsa. Banda C sequencial c) e d) com o cromossomo portador da NOR, par 5.

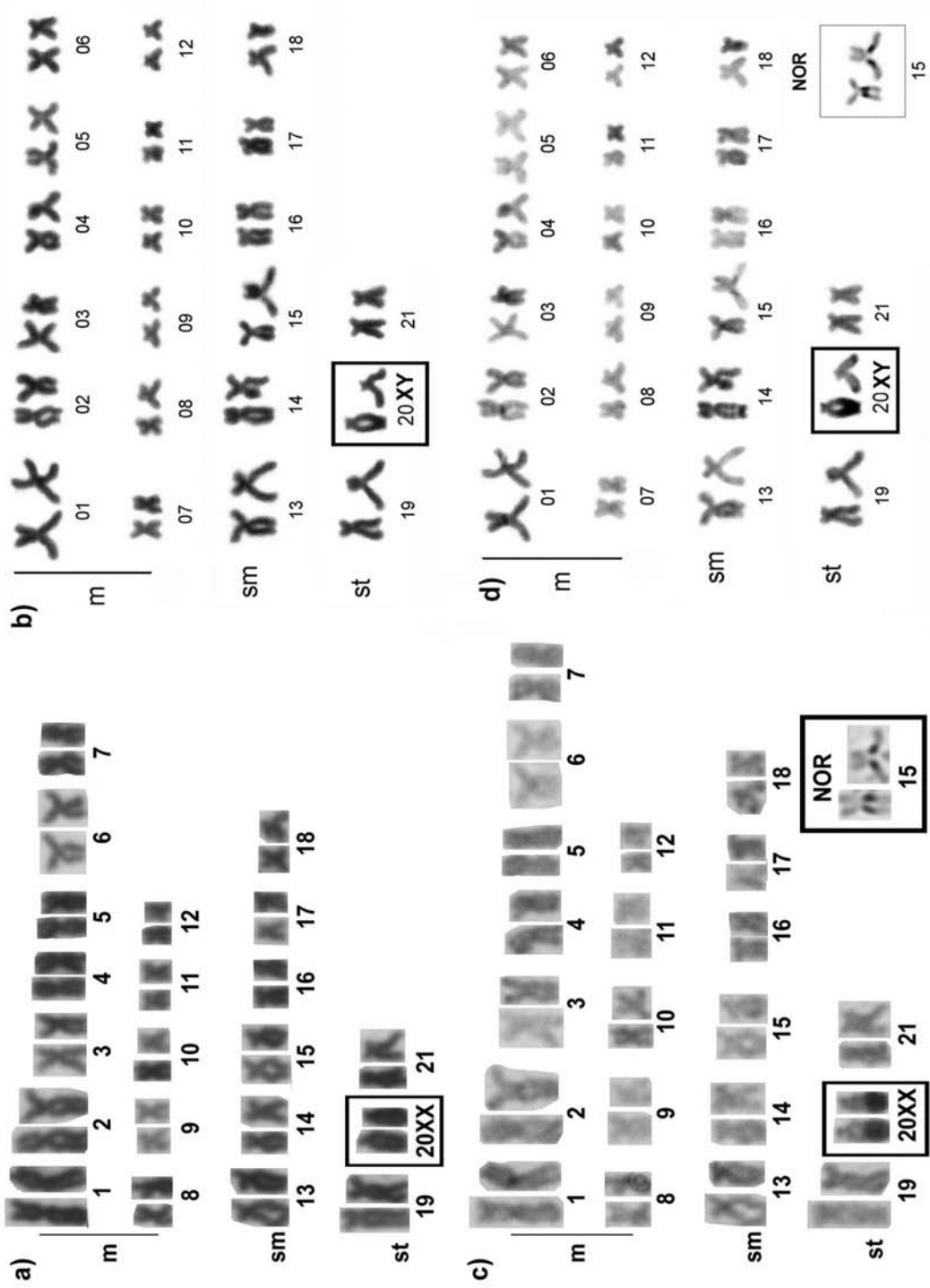


Figura 21. Cariótipo de fêmea a) e macho b) de *Ancistrus* sp 11, de Cáceres, com prováveis cromossomos sexuais, em Giemsa. Banda C sequencial com detalhe da NOR no par, 15 c) e d).

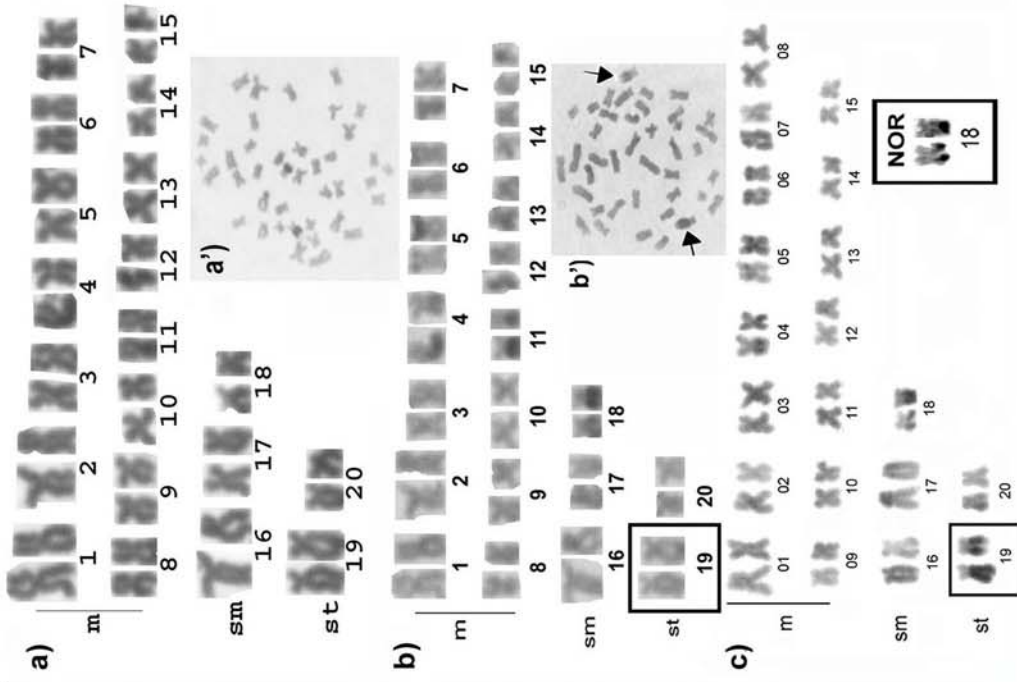


Figura 23. Cariótipo de *Ancistrus* sp 13 do Córrego Salgadinho a) Giemsa b) com banda C sequencial. a') e b') destacando metáfases de outros espécimes em banda C. Banda C com polimorfismo de heterocromatina c) e NOR sequencial.

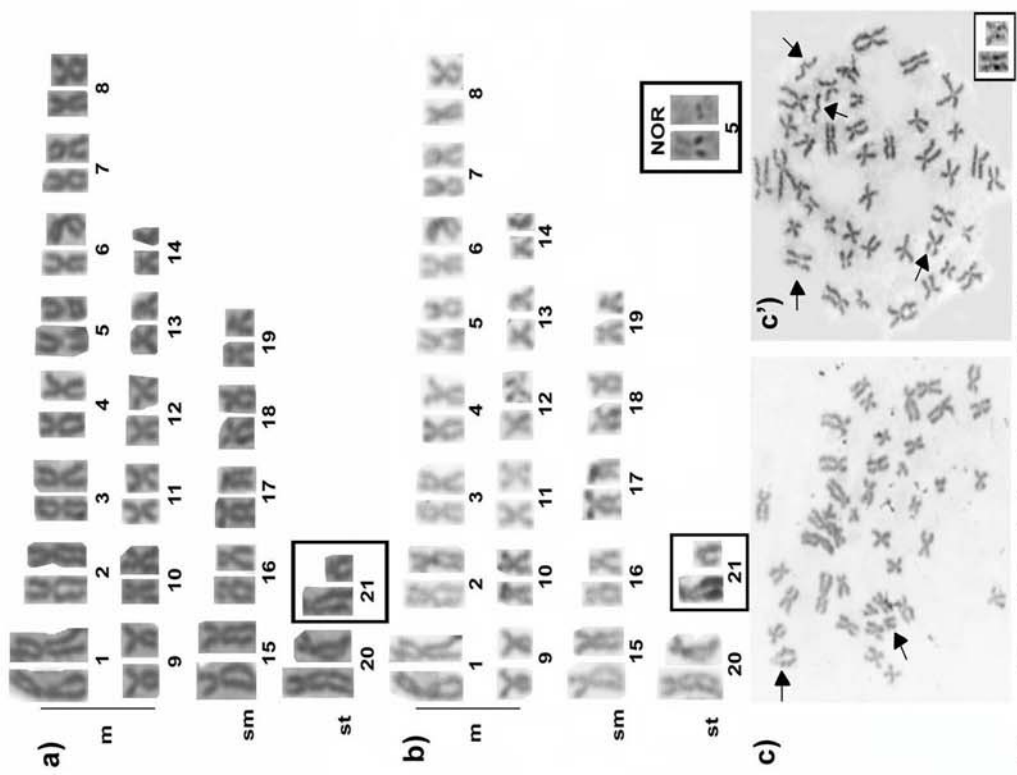


Figura 22. Cariótipo de *Ancistrus* sp 12, fêmea, do Córrego Sta Cruz a) com Banda C sequencial b) e NOR no par 5, em detalhe. Metáfases de macho e fêmea, respectivamente, com setas apontando par heteromórfico c), c') e par sequencial da NOR.

IV.4. Discussão

A divergência evolutiva dos cromossomos dos *Ancistrus* é maior que dos demais representantes, em geral, da família Loricariidae e difere de outros gêneros da tribo Ancistrini até aqui analisadas. Os *Ancistrus* apresentam evolução cariotípica bastante divergente, que contrasta com outras espécies da tribo, como as espécies dos gêneros *Baryancistrus*, *Peckoltia*, *Hemiancistrus*, *Panaque*, *Parancistrus* e *Lasiancistrus* (Artoni & Bertollo, 2001; Souza, 2003; de Oliveira *et al.*, 2006 e presente estudo); também difere de espécies de grupos taxonômicos próximos, como a maioria das espécies analisadas da subfamília Hypoptopomatinae (Andreato *et al.*, 1992, 1993, 2006) e da tribo Pterygoplichthini (Alves *et al.*, 2006).

No gênero *Ancistrus* foram descritas diversas espécies até o presente, sendo o gênero no qual encontramos populações com o menor número diplóide da tribo Ancistrini, presença de cinco dos sete diferentes sistemas de cromossomos sexuais em peixes de água doce, polimorfismos quanto à forma dos cromossomos e polimorfismos estruturais do rDNA 18S (Mariotto *et al.*, 2004, Mariotto e Miyazawa 2006, de Oliveira *et al.*, 2008 e Mariotto *et al.*, submetido).

Das 05 populações do gênero *Ancistrus* com análises citogenéticas, próximas a região do Pantanal, em 04 foram verificados heteromorfismos cromossômicos e heterocromáticos, com cromossomos sexuais dos tipos XX/XY e ZZ/ZW (Mariotto *et al.*, 2004 e Mariotto & Miyazawa, 2006). Além do gênero *Ancistrus*, outros gêneros de Loricariidae apresentaram cromossomos sexuais, como *Hypostomus* (Michele *et al.*, 1977 e Artoni *et al.*, 1998), *Microlepdogaster* e *Pseudotocinclus* (Andreato *et al.*, 1992, 1993), *Loricariichthys* (Scavone & Júlio Jr., 1995), *Hemiancistrus* (de Oliveira *et al.*, 2006) e *Harttia* (Centofante *et al.*, 2006).

Neste trabalho, pelo menos duas populações indicam heteromorfismos de cromossomos sexuais; na espécie *Ancistrus* sp 10, de Rondonópolis, do tipo ZZ/ZW e na espécie *Ancistrus* sp 11, de Cáceres, do tipo XX/XY. Nestes dois casos e no caso do complexo de espécies *Ancistrus* cf *dubius* (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006) a heterocromatinização de um dos cromossomos do par heteromórfico parece ter sido importante na fixação dos sistemas de cromossomos sexuais verificados em *Ancistrus* da bacia do Paraguai. Segundo Artoni & Bertollo (1999) e Almeida-Toledo *et al.* (2001) o acúmulo de heterocromatina constitutiva e

as mudanças relativas a sua distribuição nos cromossomos podem favorecer o heteromorfismo cromossômico e estão associadas a origem dos cromossomos sexuais em peixes. No entanto, em algumas espécies do gênero *Ancistrus*, a origem dos cromossomos sexuais parece não ter relação com a heterocromatina constitutiva, como verificado para espécies deste gênero da bacia Amazônica (de Oliveira *et al.*, 2008).

No presente estudo, as espécies analisadas provenientes de localidades com altitudes mais elevadas diferem das que estão nos locais com menores altitudes e/ou regiões que recebem sedimentos freqüentemente. Os citótipos das espécies com $2n=50$, 52 e 54 cromossomos (figuras 15 a 19) estão em áreas mais elevadas, em relação às demais, como rios e córregos de Tangará da Serra, Serra de São Vicente, Chapada dos Guimarães e pequenos afluentes da Bacia Amazônica ao norte do estado do Mato Grosso; que são consideradas áreas geomorfológicas mais antigas do que a Depressão Cuiabana e a região próxima a Nova Xavantina (ver Ribeiro, 2006). Na Baixada Cuiabana, Nova Xavantina e Pantanal, locais com maior possibilidade de sedimentação, ocorrem às espécies com $2n=34$, 40 e $2n=42$ cromossomos. Provavelmente, as espécies com números diplóides mais elevados, $2n=50$ a $2n=54$, com heterocromatina escassa e sem heteromorfismos intra-específicos, são as que apresentaram fenótipos mais plesiomórficos no gênero *Ancistrus*.

Em geral, as espécies da bacia Amazônica apresentam padrões considerados evolutivamente mais conservados se comparadas com as espécies da bacia do Paraguai. Apesar do esforço de coleta na bacia do Paraguai, até o presente, somente espécies do gênero *Ancistrus* foram encontradas. Este é mais um fator que contribui na hipótese de adaptabilidade cariotípica desse gênero nos distintos habitats, em locais que se modificam constantemente (o Pantanal, por exemplo) e na sua plasticidade evolutiva.

Os mecanismos de fusões, inversões pericêntricas, transposições e acúmulo de heterocromatina constitutiva foram, provavelmente, os principais fatores para a origem dos cariótipos derivados com cromossomos sexuais e polimorfismos. As hipóteses de fusões cromossômicas e inversões pericêntricas, especialmente, se fundamentam no número fundamental (NF) verificado, o qual foi igual (NF=84) em seis das dez espécies analisadas, especialmente se considerarmos espécies com

diferenças marcantes cromossomicamente, como em *Ancistrus claro* ($2n=54$) e *Ancistrus* sp 11 ($2n=42$).

É provável que as alterações cariotípicas, uma vez fixadas nas espécies e populações deste gênero, tenham favorecido a manutenção das espécies e sua ampla distribuição, pois é o gênero com o maior número de espécies e o mais facilmente encontrado, inclusive em habitats distintos das demais, como é o caso dos *Ancistrus cuiabae* recentemente analisados por Mariotto *et al.* (submetido). As apomorfias cromossômicas verificadas no gênero *Ancistrus* remetem as hipóteses de que as espécies deste gênero suportam melhor variações ambientais e que as espécies que ocupam habitats de serras e cabeceiras parecem manter os fenótipos cromossômicos mais primitivos para o gênero.

A hipótese de fixação de modificações genéticas em populações pequenas e com baixa vagilidade (Oliveira *et al.*, 1988), que é típico para a maioria dos Loricariidae, é mais uma vez confirmada com estes resultados nas espécies do gênero *Ancistrus*. Também o número diplóide basal de $2n=54$ cromossomos proposto para os Loricariidae (Andreatta *et al.*, 1994), parece corroborar na inferência de um cariótipo ancestral de $2n=54$ cromossomos para a tribo Ancistrini, verificado nas análises citogenéticas de diversas espécies, especialmente nas que se mostram melhor conservados cromossomicamente dentre os Loricariidae, como é o caso dos Hypoptopomatinae e Pterygoplichthini, táxons filogeneticamente próximos a Ancistrini.

Também a filogenia proposta por Armbruster (1997 e 2004), considerando o gênero *Ancistrus* mais derivado, se confirma com estes resultados de citogenética, pois é neste gênero que observamos as maiores divergências cariotípicas, em relação à estrutura cromossômica e ao número diplóide que propiciaram a diversidade cariotípica dentre os demais Ancistrini.

Análises de outras espécies, que estão distribuídas em diversos locais de diferentes bacias hidrográficas evidenciaram um número diplóide de $2n=52$ cromossomos, próximo ao sugerido como número diplóide ancestral, como verificado nos trabalhos com as espécies *Hemiancistrus* sp e *Panaque* cf. *nigrolineatus* (Artoni & Bertollo, 2001), *Ancistrus multispinnis* (Alves *et al.*, 2003), *Baryancistrus* aff *niveatus* (Souza *et al.*, 2004) e *Hemiancistrus spilomma* (de

Oliveira *et al.*, 2007), os quais também contribuem para a compreensão da biogeografia da tribo Ancistrini.

Tanto nas espécies de *Ancistrus* que apresentam cromossomos sexuais múltiplos (de Oliveira *et al.*, 2008), da bacia Amazônica, quanto naquelas em que foram verificados cromossomos sexuais simples (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006; de oliveira *et al.*, 2006, 2007 e presente estudo) se pode perceber que, dependendo da espécie e localidade, não há por enquanto, um padrão fixo dos tipos de cromossomos sexuais e heterogametia no gênero *Ancistrus*, o que confirma a recorrência e o caráter homoplásico para a presença de cromossomos sexuais na tribo Ancistrini.

As espécies da bacia do Paraguai parecem ter uma tendência ao heteromorfismo heterocromático e nas espécies que foram observados cromossomos sexuais, até o presente, estes são dos tipos subtelocêntricos e acrocêntricos.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs), nos *Ancistrus*, se apresenta bem conservada, com marcações simples em todas as espécies até aqui analisadas (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto e Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al.*, 2008 e Mariotto *et al.*, submetido e presente estudo) e nenhum caso de marcações múltiplas no gênero. Os poucos casos de NORs múltiplas foram encontrados em outros gêneros e espécies da tribo Ancistrini como em *Peckoltia* sp. 1 e sp. 2 (Souza, 2003) e *Hemiancistrus spilomma* (de Oliveira *et al.*, 2006).

A variação mais comum que foi verificada nesse e em trabalhos anteriores é quanto ao tamanho da região do rDNA 45S, que, além de observado com impregnação de nitrato de prata também foi possível confirmar com a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (presente estudo) como possíveis conseqüências de duplicações *in tandem*, em apenas um dos cromossomos. Porém, sondas de rDNA 18S em sete espécies do gênero *Ancistrus* que evidenciaram apenas um par marcado foram observadas em diferentes tipos de cromossomos nas distintas espécies, o que reforça a hipótese dos rearranjos cromossômicos por fusões e inversões pericêntricas no gênero.

Alguns autores como Hsu *et al.* (1975) consideram RONs simples uma plesiomorfia. RONs simples e na posição intersticial é, provavelmente, primitiva nos Ancistrini, de acordo com resultados nos trabalhos de Artoni & Bertollo (2001),

Alves *et al.* (2003), Mariotto *et al.* (2004), Mariotto & Miyazawa (2006), de Oliveira *et al.* (2006 e 2007), Mariotto *et al.* (submetido) e presente estudo. Porém, em algumas espécies as RONS são observadas na posição terminal dos cromossomos, como pode ser verificado em *Ancistrus* n.sp. 2 e *Ancistrus multispinnis* (Alves *et al.*, 2003); *Hemiancistrus spinosissimus* (de Oliveira *et al.*, 2006); *Ancistrus* sp. “Piaguçu”, *Ancistrus* sp. 1 “Balbina”, *Ancistrus* sp. 2 “Barcelos” (de Oliveira *et al.*, 2007); *Ancistrus* sp 06, *Ancistrus tombador*, *Lasiancistrus* cf *schomburgkii* e *Lasiancistrus* sp 1 (presente estudo). É bastante provável que a diferença de tamanho das RONS, verificadas em diversas espécies da tribo Ancistrini em seja uma característica comum da família Loricariidae.

O número reduzido de exemplares e a ocorrência de um caso de polimorfismo cromossômico na espécie *Ancistrus cuiabae* (Mariotto *et al.*, submetido) não permitem dar como encerrada a discussão em relação ao polimorfismo verificado na espécie *Ancistrus* sp 12 e sobre a possibilidade de ocorrência de cromossomos sexuais. Serão necessárias análises meióticas e ampliação destes dados para melhor compreender e inferir sobre a evolução cromossômica nesta e nas demais espécies, tendo em vista a diversidade de variações cromossômicas verificadas no gênero.

Além das fusões cêntricas sugeridas para os Ancistrini (Alves *et al.*, 2003), as inversões cromossômicas e acúmulo de heterocromatina constitutiva têm sido verificados como mecanismos de diversificação do gênero *Ancistrus*, tanto na redução do número diplóide quanto na evolução de cromossomos distintos em sexos diferentes que originaram sistemas de cromossomos sexuais e polimorfismos de cromossomos, bem como polimorfismos na distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos homólogos (*op.cit.*).

Portanto, com base nesses resultados e comparando-se com os trabalhos realizados anteriormente, é possível que o cariótipo das espécies do gênero *Ancistrus* mais primitivas seja de $2n=54$ cromossomos, bem como para a tribo Ancistrini. As RONS simples e intersticiais e a heterocromatina escassa nos citótipos de algumas espécies embasam esta hipótese que depende da expansão dos estudos, tanto em diversidade de espécies e locais quanto das técnicas utilizadas para que se possa compreender melhor a evolução e filogenia da tribo Ancistrini.

O intenso processo de diversificação na macroestrutura cariotípica, privilegiando eventos estruturais de fusão cêntrica, acompanham a magnitude do número de espécies deste gênero em relação aos demais Ancistrini.

Agradecimentos

A família Souza de Rondonópolis, em especial ao casal Edna e Jonas, pela hospitalidade e por permitir a coleta no sítio da mesma; ao Diones Krinski, Waldo Troy e Victor Rigotti pela ajuda com as coletas em Tangará da Serra, Serra de São Vicente e Cáceres.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) As espécies do gênero *Ancistrus* apresentaram uma grande diversidade cariotípica e números diplóides de $2n=34$ a $2n=54$ cromossomos, com algumas espécies que parecem manter características cromossômicas próximas umas das outras como a redução do número diplóide e a presença de blocos heterocromáticos mais expressivos.
- b) A presença de polimorfismos cromossômicos, heterocromáticos e de rDNA devem ser decorrentes de inversões pericêntricas, permutas meióticas desiguais, transposições e duplicações gênicas.
- c) Todas as espécies apresentaram DNA ribossômico 18S em apenas um par de cromossomos, mas em diferentes tipos de cromossomos. É provável que estas variações do par cromossômico sejam resultados de diversos rearranjos que mudaram a fórmula cariotípica enquanto que estas regiões gênicas mantiveram um sistema simples inalterado.
- d) As regiões ribossomais 5S, ao contrário das regiões 18S, devem ter sido expostas a rearranjos que resultaram na diversidade de tipos de cromossomos portadores destes cístrons ribossomais, assim como na sua variação numérica.
- e) Os resultados da banda C nas espécies com número diplóide $2n=50$ a 54 cromossomos foi, tecnicamente, insatisfatório, isto se deve, provavelmente a uma característica peculiar da heterocromatina nestas espécies.

- f) As espécies do gênero *Lasiancistrus* mantêm características próximas aos demais gêneros de Ancistrini, corroborando assim, que o cariótipo ancestral deve ser de $2n=54$ cromossomos na tribo Ancistrini.
- g) As espécies que indicam ser portadoras de cromossomos sexuais se assemelham morfológicamente às demais aqui analisadas, mas diferem citogeneticamente. É possível que estes cromossomos tenham se originado de forma independente, homoplasias, nessas populações alopátricas.
- h) As espécies com os menores números diplóides e encontradas na bacia no Paraguai são as que apresentaram maior diversidade citogenética com polimorfismos e cromossomos sexuais. Estas apomorfias, provavelmente, se originaram de fusões e inversões.
- i) A frequência de *Ancistrus* sp 03 ($2n=54$), simpátrica com *Ancistrus* cf *dubius* ($2n=42$), é baixa; o mesmo ocorre com *Ancistrus* cf *dubius*, em simpatria com *Ancistrus claro* ($2n=54$), indicando uma provável adaptabilidade/viabilidade diferencial em relação à altitude. Esta hipótese é corroborada pela ocorrência de *Ancistrus* sp 01 ($2n=54$), com cariótipo similar a *Ancistrus claro*, num habitat de maior altitude, e também, pela ausência de espécies com número diplóide reduzido nos córregos das serras.
- j) Todas as hipóteses e observações, aqui colocadas, deverão ser testadas em estudos posteriores, abrangendo análises meióticas, de mtDNA e o uso de outras ferramentas complementares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C. T.; GALETTI JR., P. M. Chromosome mapping of 5S rDNA genes differentiates Brazilian populations of *Leporellus vittatus* (Anostomidae, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 188-194, 2008.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. **Ciência e Cultura**, 37(3): 448-453, 1985.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica** 111:91-100, 2001.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 97, n. 3-4, p. 229-233, 2002.
- ALVES A.L.; OLIVEIRA; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, 56:57-63. 2003.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, 124:127-136. 2005.
- ALVES, A.L. et al. karyotypic relationship among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, 128:1-9. 2006.
- ANDREATA, A.A. et al. Chromosome studies in Hypoptomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. **Cytologia**, 57:369-372. 1992.
- ANDREATA, A.A. et al. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. **Cytogenetics and Cell Genetics** 63: 215-220. 1993.
- ANDREATA, A.A. et al. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. **Caryologia**, 47: 27-37. 1994.
- ANDREATA, A.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyological characterization of four Neotropical fish species of the genus *Hisonotus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae) from distinct Brazilian river basin. **Genetics and Molecular Biology**, 29,1, 62-66. 2006.

ARMBRUSTER, J. W. **Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Ancistrinae, Hypostominae, and Neoplecostominae.** 1997. 409 f. PhD. Dissertation (Philosophy) - University Illinois, Urbana-Champaign, 1997.

ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 141:1-80. 2004.

ARMBRUSTER, J.W. The Loricariid catfish genus *Lasiancistrus* (Siluriformes) with description of two new species. **Neotropical Ichthyology**, 3(4):549-569. 2005.

ARTONI, R. F. **Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no Gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluriformes).** 1996. 162 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

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

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

ARTONI, R.F. **Citogenética do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Triportheus* (Pisces, Characidae).** 1999. Tese de doutorado (Genética e Evolução). Univ. Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 1999.

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

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

BÖHLKE, J.E.; WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A. Estado Atual da Sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônica**. 8 (4): 657-677. 1978.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçu River basin in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 23(3):605-607. 2000.

Britski, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Poluição e piscicultura**. São Paulo: Cibipu 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S., **Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense**. SPI. Corumbá, MS: EMBRAPA, 184p. 1999.

BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res.** 8:111-118. 2000.

Brum, M. J. I. **Correlações entre a Filogenia e a Citogenética dos peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. p. 5-42. (Série Monografias, n. 2).

BURGESS, W.E. **An Atlas of freshwater and Marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes**. 1989. Canada. T.F.H. Publications. 784p. 1989.

CARVALHO, R. A.; DIAS, A. L. Interindividual size heteromorphism of NOR and Chromosomal location of 5S rDNA genes in *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 141-146. 2007.

CENTOFANTE, L.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from central Amazon Basin. **Caryologia**, 55:37-45. 2002.

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

CESTARI, M. M.; GALETTI JR., P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguai rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, 1992:108-112. 1992.

de Oliveira, R. 2006. **Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica**. 2006. 81 f. Dissertação de mestrado (Biologia de Água Doce e Pesca Interior) INPA/UFAM, Manaus, AM. 2006.

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

de OLIVEIRA, R.R. et al. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosomes heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes:Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, 5(3):301-306. 2007.

de OLIVEIRA, R.R. et al. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) from the Amazon Basin. **Genética**, 134:243-249. 2008.

DIAS, A.L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Revista Brasileira de Genética**, 16:585-600. 1993.

FERRARIS, JR. C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of Siluriform primary types**. New Zealand: *Zootaxa* 1418, 628 pp. 2007.

FERRO, D.A.M., et al. Nucleolar organizing region, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): population's distribution and functional diversity. **Genetica**, 110:55-62. 2001.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophyan fishes (Teleostei). **Zool. J. Soc. Lond.** 72: 297-353. 1981.

FISCH-MULLER, S.; MAZZONI, R.; WEBER, C. Genetic and morphological evidences for two new sibling species of *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) in upper rio Tocantins drainage, Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, 12(4):289-304. 2001.

FISCH-MULLER, S. **subfamily Ancistrinae. in Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 729p. 2003.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetics** 31:137-144. 1981.

GALETTI JR., P.M.; SILVA, E.B.; CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 8(3): 479-484. 1985.

GALETTI JR., P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) role of constitutive heterochromatin. **Cytogenet. and Cell Genetics**. 43: 43-46. 1986.

GALETTI JR., P. M. Chromosome diversity in neotropical fishes: RONS studies. **Ital. J. Zool.**, 65:53-56. 1998.

GARCIA, C.; MOREIRA FILHO, O. 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. Short communication. **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (suppl),261-264. 2008.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. USA:TFH publication, 672p. 1977.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Polimorfismo cromossômico diferencial entre populações de *Rineloricaria cf latirostris* (Pisces, Loricariidae). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 6., 1994, São Carlos. **Livro de resumos**. São Carlos, 1994. p. 71. 1994

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype variability in *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome Polymorphism in the Rio Negro Population (Manaus, State of Amazonas). **Revista Brasileira de Genética**, Brasil, v. 11, n. 2, p. 299-306. 1988.

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae)**. 1998. 78f. Dissertação de mestrado (Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 1998.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122:239-244. 2004.

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

HSU, T.C.; SPIRITO, S.E.; PARDUE, M.L. Distribution of 18S +28S ribosomal genes in Mammalian genomes. **Chromosoma**, 53:25-33. 1975.

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

JESUS, C.M.; MOREIRA FILHO, O. Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**, 65:397-402. 2000.

JORGE, L.C.; MOREIRA FILHO, O. Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, 57:195-199. 2004.

KAVALCO, K.F. et al. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas**, 141:237-242. 2004.

KAVALCO, K.F. et al. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, 94:180-186. 2005.

LARA, M.C.S. **Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do Rio Paraná.** 1998. 52f. Dissertação de mestrado (Biologia Celular). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 1998.

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Neotropicais.** São Paulo: EDUSP, 536p. 1999.

MACHADO, F.A. **História natural de peixes do Pantanal: com destaque em hábitos alimentares e defesa contra predadores.** 2003. Tese de doutorado (Ecologia). UNICAMP, Campinas, SP. 2003.

MAISTRO E.L., et al. 1996. Cromossomos sexuais e supernumerários em *Characidium gomesi* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **XXXII Congresso Brasileiro de Genética.** Caxambu, p.115.

MALABARBA, L.R., et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.** Porto Alegre: Edipucrs.. 603p. 1998.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 123:211-216. 2005.

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

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C.S. *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sex chromosomes of the type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**.59(4): 299-304. 2006.

MARIOTTO, S. et al. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**. (submetido).

MARQUES, M. B. A. et al.. Cytogenetical analyses in two endemic fish species from the São Francisco river basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31: 215-221. 2008

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.** 7:363-367. 1999.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chrom. Res.* 8:353-355. 2000.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species: two different genomic localizations are characterized by distinct non-transcribed spacers (NTSs). **Genome**, 44:903-910. 2001.

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

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

MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI JR., P.M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 26(5): 564-568. 1984.

MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, vol. 46, n. 2-3: 115-125. 1993.

OHNO, S. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. New York: Springer-Verlag. 192p. 1967.

OLIVEIRA, C. et al. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Braz.J.Genet**, 11:577-624. 1988.

PAZZA, R.; KAVALCO, K.F.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, Suíça, v. 112, p. 313-319. 2006.

PENDÁS, A.M. et al. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet. Cell Genet.** 67:31-36. 1994.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83: 2934-2938. 1986.

PORTO-FORESTI, F. et al. A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Genetics and Molecular Biology**, 27:51-54. 2004.

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

REIS, R.E; PEREIRA, E.L.; ARMBRUSTER, J.W. Delturinae, a new Loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revision of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zool. J. Linnean Soc.** 147:277-299. 2006.

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from de coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, 4(2):225-246. 2006.

SARMENTO-SOARES, L. M.; INGÊNITO, L. F. S. **Ancistrinae**. In: **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p. 98-102. 2007.

SCAVONE, M.D.; JULIO JR., H.F. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichtys platymetopon* (Loricariidae : Siluriformes). **Brazil J. Genet.**, 18(1):31-35. 1995.

SOUZA, A.C.P. **Descrição cariotípica de peixes dos gêneros *Baryancistrus*, *Parancistrus*, *Peckoltia* e *Ancistrus* (Ancistrinae, Loricariidae) da Bacia Amazônica**. 2003. 130p. Dissertação de mestrado (Zoologia). Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi. Pará, Brasil. 2003.

SOUZA, A.C.P. et al. Karyotypic analysis of *Baryancistrus* aff. *niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by C-banding, ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. **Caryologia**, 57(3):219-223. 2004.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, v.75, 304-306. 1972.

SWARÇA, A.C. **Contribuição à citogenética dos Pimelodidae de grande porte: estudos cariotípicos em 4 espécies do “subgrupo” Sorubiminae**. 2003. Tese de doutorado (Genética). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2003.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: **An Overview**. In: Malabarba, L. R. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 603p. 1998.

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

VICARI, M. R. et al. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 621-625, 2006.

VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; MOREIRA FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, 54(4):365-369. 2001.

VISSOTTO, P.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). **Chromosome Science**, 5:97-103. 2001.

ZUANON, J.A.S. **História Natural da ictiofauna de corredeiras do Rio Xingu, na região de Altamira, Pará**. 1999. Tese de doutorado. (Ecologia) Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 1999.