



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

MARCELÉIA RUBERT

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DAS TRIBOS
HYPOSTOMINI E ANCISTRINI (LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)”**

SÃO CARLOS

2011

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DAS TRIBOS
HYPOSTOMINI E ANCISTRINI (LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)”**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

MARCELÉIA RUBERT

**“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DAS TRIBOS
HYPOSTOMINI E ANCISTRINI (LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)”**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética e Evolução, da
Universidade Federal de São Carlos, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, área de concentração:
Genética e Evolução.**

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

*Co-orientadora: Prof. Dr^a. Lucia Giuliano
Caetano*

SÃO CARLOS

2011

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

R895ec

Rubert, Marceléia.

Estudos citogenéticos em espécies das tribos
Hypostomini e Ancistrini (Loricariidae, Hypostominae) /
Marceléia Rubert. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
111 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Citogenética de peixes. 2. Citotaxonomia. 3. Cariótipo.
4. Bandamentos cromossômicos. 5. Topótipos. I. Título.

CDD: 597.087322 (20^a)


FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELÉIA RUBERT

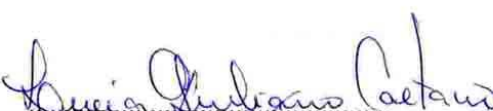
“ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DAS TRIBOS HYPOSTOMINI E ANCISTRINI (LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação, para obtenção do título de doutor
em Ciências, Área de concentração Genética e Evolução
Universidade Federal de São Carlos.
São Carlos, 02 de setembro de 2011.

Orientador:

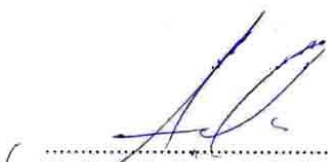

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
(Universidade Federal de São Carlos)

Co-Orientadora:


Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano
(Universidade Estadual de Londrina)

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo
(Universidade Federal de São Carlos)


Prof. Dr. Anderson Luis Alves
(EMBRAPA Pesca e Aquicultura - TO)


Profa. Dra. Ana Lúcia Dias
(Universidade Estadual de Londrina)


Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki
(Universidade Estadual de Maringá)

**Dedico este trabalho ao meu marido Jyann,
meu companheiro, amigo e amor, que me
ajudou tanto nesta fase e esteve sempre ao
meu lado**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas grandes oportunidades na vida e as que ainda virão.

Aos meus pais Olmardiles e Nilva, pelo amor incondicional, que mesmo estando distantes sempre foram minha base e inspiração, e sempre me apoiaram em tudo, aos meus irmãos Cesar e Sílvia por toda a força e carinho. Amo vocês!

Ao meu marido, meu amor e melhor amigo, Jyann, por toda a compreensão em todo esse tempo de Pós Graduação, por todo o carinho incondicional sempre, nos piores e melhores momentos. Amo você!!!

À minha orientadora e “mãezinha” científica Lucinha, por não medir esforços nas coletas (quase do Oiapoque ao Chuí) e tornar possível todo esse trabalho, por todo o apoio, pela oportunidade, troca de experiências, e principalmente pela amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho, pela oportunidade de orientação, pela troca de experiências, conselhos e toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dra. Ana Lúcia Dias, Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo e Dr. Pedro Manoel Galetti Jr, por toda a ajuda no início e durante o meu doutorado.

Aos professores, Dr. Rogério Fernandes de Souza e Dr. Laurival Vilas Boas por toda a ajuda na parte de Bioinformática; Dra. Fernanda Simões de Almeida e André L. Vanzela, por cederem seus laboratórios.

Ao técnico de laboratório, Luiz Henrique (Piuau), por toda a ajuda nas coletas sempre, essencial para a elaboração deste trabalho; e ao Pedro Gallo, pela ajuda no laboratório.

Às minhas amigas-irmãs, Renata, Larissinha e Angélica, por toda a ajuda de todas as formas, seja no laboratório ou fora dele, me apoiando tanto nos momentos alegres quanto nos difíceis... Amo todas vocês!

À minha amiga Eli, que me acolheu em São Carlos, e me ajudou em tantos momentos, e por toda a sua paciência comigo durante todos esses anos de doutorado, pelo carinho, amizade, conselhos e trocas de experiências.

Às minhas amigas inesquecíveis do coração, tia Reh, Ana Maria e Debra, que sempre me deram tanto apoio, pessoas com quem eu sempre pude desabafar. Amo vocês!

Aos meus irmãozinhos científicos, Natália e Fábio, pela ajuda em vários momentos do meu trabalho e pela descontração nos momentos engraçados.

Aos meus amigos de Laboratório, Tati, Angéliquinha, Juceli, Vivian, Larissa Lacerda, Mari, Laura, obrigada por tudo!

Aos meninos, Marcelinho, Beto e Dani, por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, ao Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Federal de São Carlos e da Universidade Estadual de Londrina, pelo suporte e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Análises citogenéticas convencionais e moleculares foram realizadas em 15 espécies da subfamília Hypostominae, compreendendo 12 espécies da tribo Hypostomini, gênero *Hypostomus* e três da tribo Ancistrini, gêneros *Ancistrus* e *Hemiancistrus*. Foi observado $2n=52$ para *Ancistrus multispinis* (14m+14sm+24st-a), *A. brevipinnis* (14m+14sm+24st-a) e *Hemiancistrus punctulatus* (14m+26sm+12st-a). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) e sítios de DNAr 18S são simples e terminais para as espécies *A. brevipinnis*, *A. multispinis* e *H. punctulatus*. Nestas espécies pode-se constatar que as RONS são também CMA₃⁺/DAPI. Quanto à heterocromatina, *H. punctulatus* apresentou pouca quantidade desse componente cromossômico, enquanto que *A. multispinis* e *A. brevipinnis* evidenciaram uma maior quantidade, com grandes blocos no braço longo de alguns pares st-a. Por sua vez, as diferentes espécies de *Hypostomus* mostraram uma variação de 64 a 82 cromossomos, com diferença na fórmula cariotípica entre as espécies. As RONS foram múltiplas para a maioria das espécies analisadas, sendo observados diferentes fenótipos quanto ao número e posição, o que foi também confirmado pela análise de FISH, evidenciando uma variabilidade interindividual e interespecífica. Em todas as espécies as RONS mostraram-se também CMA₃⁺/DAPI □. O padrão de distribuição da heterocromatina foi diferente em cada espécie, sendo outro importante marcador cromossômico. Análises citogenéticas, moleculares e de morfometria foram realizadas nas espécies *Hypostomus albopunctatus* (rio Piracicaba, SP) e *H. heraldoi* (rio Pirapitinga, GO), assim como em exemplares morfologicamente semelhantes presentes no rio Mogi Guaçu (SP). Todos os indivíduos apresentaram $2n=74$, sendo que, *H. albopunctatus* apresentou 10m+20sm+44st-a e *H. heraldoi* 8m+20sm+46st-a. As duas fórmulas cariotípicas foram encontradas na população do rio Mogi Guaçu. Fenótipos distintos de Ag-RONs foram observados entre as três populações, confirmadas pela FISH. Quanto ao padrão heterocromático, *H. albopunctatus* apresentou bandas terminais e um bloco intersticial. Em *H. heraldoi*, a heterocromatina encontrou-se mais amplamente distribuída, nas regiões terminais e intersticiais de alguns cromossomos st-a. Nessas espécies as RONS mostraram-se também CMA₃⁺/DAPI □. Análises de RAPD e sequenciamento do gene de Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram realizadas nessas duas espécies, na população do rio Mogi Guacu e em mais três espécies, *H. regani*, *H. margaritifera* e *H. hermanni*, obtendo-se o mesmo padrão de dendrograma. Todas as espécies puderam ser diferenciadas por suas sequências COI, resultando num total de 16 haplótipos. Estas análises, aliadas aos

dados de morfometria, evidenciaram que *H. heraldoi* e *H. albopunctatus* são duas espécies válidas e que os exemplares do rio Mogi Guaçu ainda conservam algumas características de *H. albopunctatus*, sendo provisoriamente denominados como *Hypostomus* aff. *albopunctatus*. Devido ao elevado número de espécies atualmente incluídas no gênero *Hypostomus*, juntamente com a variabilidade na morfologia e padrão de coloração tanto intra quanto inter-específica, muitas vezes ocorrem problemas na taxonomia desse grupo, a qual pode ser auxiliada pelos dados citogenéticos. Este estudo forneceu novos dados cromossômicos para os Loricariidae, mostrando-se uma boa ferramenta citotaxonômica para a tribo Hypostomini. A análise conjunta de diferentes caracteres, como citogenéticos, moleculares e morfométricos, possibilitou uma caracterização mais precisa de diferentes populações de espécies de *Hypostomus*, contribuindo para esclarecer sua validade como unidades evolutivas distintas.

Palavras-Chave: Peixes Neotropicais. Citotaxonomia. Análise cariotípica. Marcadores cromossômicos. Topótipos. *Hypostomus*. *Ancistrus*. *Hemiancistrus*.

ABSTRACT

Conventional and molecular cytogenetic analysis were performed on 15 species of the subfamily Hypostominae, comprising 12 species of the Hypostomini tribe, genus *Hypostomus*, and three of the Ancistrini tribe, genera *Ancistrus* and *Hemiancistrus*. The chromosome number of $2n=52$ was observed for *Ancistrus multispinis* (14m+14sm+24st-a), *A. brevipinnis* (14m+14sm+24st-a) and *Hemiancistrus punctulatus* (14m+26sm+12st-a). The nucleolar organizer regions (Ag-NORs) and 18S rDNA sites are simple and terminal for species, *A. brevipinnis*, *A. multispinis* and *H. punctulatus*. In these species, it can be seen that the NORs are also CMA3⁺/DAPI⁻. As for the heterochromatin, *H. punctulatus* showed a small amount of this chromosome component, while *A. multispinis* and *A. brevipinnis* showed a larger amount, with large blocks on the long arm of some st-a pairs. In turn, the different species of *Hypostomus* showed a variation from 64 to 82 chromosomes, exhibiting differences in the karyotype formula between species. The NORs were multiple for most species analyzed, with different phenotypes observed in the number and position, which was also confirmed by FISH analysis, showing an interindividual and interspecific variability. In all species, the NORs were also CMA3⁺/DAPI⁻. The heterochromatin pattern distribution was different in each species, being another important chromosome marker. Cytogenetic, molecular, and morphometry analysis were performed in the species *Hypostomus albopunctatus* (Piracicaba river, SP) and *H. heraldoi* (Pirapitinga river, GO), including those morphologically similar samples present in the Mogi Guaçu river (SP). All individuals had $2n=74$, whereas *H. albopunctatus* showed 10m+20sm+44st-a and *H. heraldoi* 8m+20sm+46st-a. These two karyotype formulae were found in the Mogi Guaçu river population. Distinct Ag-NOR phenotypes were observed among the three populations and confirmed by FISH. Regarding the heterochromatin pattern, *H. albopunctatus* presented terminal bands and an interstitial block. In *H. heraldoi*, the heterochromatin was found widely distributed in the terminal and interstitial regions of some st-a chromosomes. In these species, the NORs were also CMA3⁺/DAPI⁻. RAPD analysis and sequencing of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene were carried out in these two species, in the Mogi Guaçu population and in three more species, *H. regani*, *H. margaritifera*, and *H. hermanni*, obtaining the same dendrogram pattern. All species could be differentiated by their COI sequences, resulting in a total of 16 haplotypes. These analyses, combined with the morphometric data, showed that *H. heraldoi* and *H. albopunctatus* are two valid species and the specimens from

the Mogi Guaçu river still retain some characteristics of *H. albopunctatus*, and were provisionally designated as *Hypostomus* aff. *albopunctatus*. Due to the large number of species currently included in the *Hypostomus* genus, along with both the intra and inter-specific variability in morphology and color pattern, there are often problems in the taxonomy of this group, which can be assisted by cytogenetic data. This study provided new chromosomal data for Loricariidae, being a valuable cytotaxonomic tool for the Hypostomini tribe. The joint analysis of different characters, such as cytogenetic, molecular, and morphometric, allowed a more precise characterization of different populations of *Hypostomus* species, helping to clarify their validity as distinct evolutionary units.

Keywords: Neotropical Fish. Cytotaxonomy. Karyotype analysis. Chromosome marker. Topotipos. *Hypostomus*. *Ancistrus*. *Hemiancistrus*.

LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 - Espécies analisadas: **a)** *Hypostomus albopunctatus*; **b)** *H. cochliodon*; **c)** *H. commersoni*; **d)** *H. heraldoi*; **e)** *H. hermanni*; **f)** *H. iheringii*; **g)** *H. margaritifera*; **h)** *H. mutucaea*; **i)** *H. nigromaculatus*; **j)** *H. paulinus*; **k)** *Hypostomus* aff. *paulinus*; **l)** *H. regani* (rio Mogi Guaçu); **m)** *H. regani* (rio Pirapitinga); **n)** *H. strigaticeps*; **o)** *Ancistrus multispinis*; **p)** *A. brevipinnis*; **q)** *Hemiancistrus punctulatus*.....20

Figura 2 - Mapa das regiões de coleta nas bacias do Alto Paraná, Paraguai e Atlântico Sul: **a)** rio Piracicaba (Piracicaba – SP); **b)** rio Mogi Guaçu (Pirassununga – SP); **c)** rio Pirapitinga (Caldas Novas – GO); **d)** rio Claro (Chapada dos Guimarães – MT); **e)** rio Piraputanga (Cáceres – MT); **f)** rio Forquetinha (Canudos do Vale – RS); **g)** rio Carreiro (Serafina Corrêa – RS); **h)** rio Maquiné (Maquiné – RS).....21

Figura 3 – Locais de Coleta. **a)** rio Piracicaba (Piracicaba – SP); **b)** rio Mogi Guaçu – região da topava em Cachoeira de Emas (Pirassununga – SP); **c)** rio Pirapitinga (Caldas Novas – GO); **d)** rio Claro (Chapada dos Guimarães – MT); **e)** rio Piraputanga (Cáceres – MT); **f)** rio Forquetinha (Canudos do Vale – RS); **g)** rio Carreiro (Serafina Corrêa – RS); **h)** rio Maquiné (Maquiné – RS).....22

CAPÍTULO I

Figura 1 – Cariótipos corados por Giemsa de **a)** *A. brevipinnis*; **e)** *A. multispinis*; **i)** *H. punctulatus*. Em destaque estão os cromossomos com as constrições secundárias. Nos boxes, os pares das RONS com impregnação por nitrato de prata (**b, f e j**), CMA₃ (**c, g e l**) e FISH (**d, h e m**) com DNAr 18S.....41

Figura 2 – Metáfases com bandamento-C em **a)** *A. brevipinnis*; **b)** *A. multispinis*; **c)** *H. punctulatus*.....42

CAPÍTULO II

Figura 1 – Cariótipos corados por Giemsa de: **a)** *H. cochliodon*; **b)** *H. commersoni*; **c)** *H. hermanni*; **d)** *H. strigaticeps*; **e)** *H. regani* (rio Pirapitinga); **f)** *H. regani* (rio Mogi

Guaçu).....58

Figura 2 – Cariótipos corados por Giemsa de: a) *H. albopunctatus*; b) *H. nigromaculatus*; c) *H. paulinus*; d) *Hypostomus* aff. *paulinus*; e) *H. iheringii*; f) *H. mutuae*.....59

Figura 3 – Metáfases com bandamento-C coradas com Iodeto de Propídeo: a) *H. cochliodon*; b) *H. commersoni*; c) *H. hermanni*; d) *H. strigaticeps*; e) *H. regani* (rio Pirapitinga); f) *H. regani* (rio Mogi Guaçu).....60

Figura 4 – Metáfases com bandamento-C coradas com Iodeto de Propídeo: a) *H. albopunctatus*; b) *H. nigromaculatus*; c) *H. paulinus*; d) *Hypostomus* aff. *paulinus*; e) *H. iheringii*; f) *H. mutuae*.....61

Figura 5 – Idiograma com os cromossomos marcadores das espécies de *Hypostomus* analisadas no presente trabalho, com impregnação por nitrato de prata, CMA₃ e bandamento-C. a) *H. cochliodon*; b) *H. commersoni*; c) *H. hermanni*; d) *H. strigaticeps*; e) *H. regani* (rio Pirapitinga); f) *H. regani* (rio Mogi Guaçu); g) *H. albopunctatus*; h) *H. nigromaculatus*; i) *H. paulinus*; j) *Hypostomus* aff. *paulinus*; l) *H. iheringii*; m) *H. mutuae*.....62

CAPÍTULO III

Figura 1 – Metáfases com impregnação por nitrato de prata (esquerda) e FISH (direita) em: a) e a') *H. cochliodon*; b) e b') *H. commersoni*; c) e c') *H. hermanni*; d) e d') *H. strigaticeps*; e) e e') *H. regani* (rio Pirapitinga); f) e f') *H. regani* (rio Mogi Guaçu). As setas indicam os sítios de Ag-RONs e de DNAr 18S.....77

Figura 2 – Metáfases com impregnação por nitrato de prata (esquerda) e FISH (direita) em: a) e a') *H. albopunctatus*; b) e b') *H. nigromaculatus*; c) e c') *H. paulinus*; d) e d') *Hypostomus* aff. *paulinus*; e) e e') *H. iheringii*; f) e f') *H. mutuae*. As setas indicam os sítios de Ag-RONs e de DNAr 18S.....78

Figura 3 – Idiograma dos cromossomos marcadores identificados pelas técnicas de

impregnação por nitrato de prata (esquerda) e hibridação fluorescente *in situ* (direita) de: a) *H. cochliodon*; b) *H. commersoni*; c) *H. hermanni*; d) *H. strigaticeps*; e) *H. regani* (rio Pirapitinga); f) *H. regani* (rio Mogi Guaçu); g) *H. albopunctatus*; h) *H. nigromaculatus*; i) *H. paulinus*; j) *Hypostomus* aff. *paulinus*; l) *H. iheringii*; m) *H. mutuae*. Observando a correspondência ou diferença entre o número e localização destes sítios em ambas as técnicas. Os números romanos indicam os diferentes padrões observados entre os indivíduos.....79

CAPÍTULO IV

Figura 1 – Cariótipos de: **a)** *H. albopunctatus* (RPc); **b)** *H. heraldoi* (RPp); **c)** e **d)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (RMG), corados por Giemsa. Nos boxes, estão em destaque os pares das RONS com impregnação por nitrato de prata (**b, f, j e o**), CMA₃ (**c, g, l e p**) e FISH (**d, h, m e q**) com DNAr 18S.....96

Figura 2 - Idiogramas de: **a)** *H. albopunctatus* (RPc); **b)** *H. heraldoi* (RPp); **c)** Fórmula cariotípica 1 e **d)** Fórmula cariotípica 2 da população rio Mogi Guaçu.....97

Figura 3 – **a)** Dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) gerado a partir das sequências do gene COI com o modelo K2P, inferidas para as populações de *Hypostomus* conduzidas pelo MEGA5. **b)** Número de populações (K) geneticamente distintas, testadas pelo Programa Structure, utilizando o teste de mistura independente com dados de RAPD.....98

Figura 4 - Análise dos dados morfométricos considerando os componentes principais gerados pelo Programa Shear, levando em consideração somente os componentes que apresentam maior peso na diferenciação entre as populações.....99

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1 – Relação das espécies das tribos Ancistrini e Hypostomini analisadas no presente trabalho.....	19
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis da tribo Ancistrini.....	43
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis para espécies da tribo Hypostomini.....	63
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Relação das espécies de <i>Hypostomus</i> estudadas no presente trabalho.....	74
---	----

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Análise da diversidade de nucleotídeos inter e intrapopulacional entre as espécies analisadas.....	90
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Aspectos gerais e citogenéticos da família Loricariidae e da subfamília Hypostominae	10
1.2 Bacias Hidrográficas Estudadas	12
1.2.1 A Bacia Hidrográfica do Atlântico Sul	12
1.2.2 A Bacia Hidrográfica do Alto Paraná	13
1.2.3 A Bacia Hidrográfica do Paraguai	15
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Material e Locais de Coleta	18
4.2 Metodologia	23
4.2.1 Indução ao aumento do número de mitoses pela técnica de suspensão de levedura (LEE; ELDER, 1980)	23
4.2.2 Técnica de suspensão celular para obtenção de cromossomos mitóticos - preparação direta <i>in vivo</i> (BERTOLLO et al., 1978)	23
4.2.3 Classificação cromossômica	24
4.2.4 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS) (HOWELL; BLACK, 1980)	25
4.2.5 Bandamento C (SUMNER, 1972)	25
4.2.6 Coloração pelos fluorocromos Cromomicina A ₃ (CMA ₃) e DAPI (SCHWEIZER, 1980)	25
4.2.7 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) (PINKEL et al., 1986, com modificações)	26
4.2.8 Extração de DNA a partir de Tecidos Sólidos (SAMBROOK et al., 1989), com modificações.	27
4.2.9 Análises Morfológicas	27
5. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS).	30
CAPÍTULO I	34
Resumo	34
Introdução	35
Material e Métodos	36
Resultados	37
Discussão	38
Referências Bibliográficas	45
CAPÍTULO II	49
Resumo	49
Introdução	50
Material e Métodos	51
Resultados	52

Discussão	53
Referências Bibliográficas	66
CAPÍTULO III	70
Resumo	70
Introdução	71
Material e Métodos	72
Resultados	72
Discussão	75
CAPÍTULO IV	83
Resumo	83
Introdução	84
Material e Métodos	86
Resultados	88
Discussão	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos gerais e citogenéticos da família Loricariidae e da subfamília Hypostominae

A família Loricariidae pertence à ordem Siluriformes, e é composta por peixes popularmente conhecidos como “cascudos”. A família é a segunda maior dentre os Teleostei em número de espécies, com 716 espécies distribuídas em 83 gêneros (FERRARIS JR., 2007). A identificação precisa destes peixes oferece grande dificuldade aos taxonomistas, pois, além do elevado número de espécies, o grupo apresenta uma grande variação intra - específica quanto à morfologia e ao padrão de pigmentação, o que, associado a um limitado conhecimento da sua distribuição na região Neotropical, pode resultar numa identificação errônea das espécies (REIS et al., 1990). Assim sendo, esta família é considerada muito complexa, quanto à sua taxonomia e distribuição, e várias propostas têm sido constantemente revisadas, não existindo um consenso entre os pesquisadores.

A última subdivisão taxonômica da família foi sugerida por Reis et al. (2006) onde esta é dividida em seis subfamílias: Delturinae, Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae, sendo esta última subdividida em cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini.

As espécies que compõem a subfamília Hypostominae são muito resistentes, podendo permanecer vivas fora da água por um período prolongado, visto que, além da respiração branquial, apresentam uma alta vascularização do estômago que permite uma maior oxigenação (ARMBRUSTER, 1998). Estas características, juntamente com seus hábitos alimentares, lhes permitem ocupar habitats variados, estando distribuídas na maior parte da região Neotropical, desde o norte da Costa Rica até o sul da Argentina (REIS et al., 2003).

Com exceção de *Hypostomus watwata* que vive em águas estuárias dos rios das Guianas (WEBER, 2003) e *H. papari* (ZAWADZKI, C.H., comunicação pessoal) encontrada na Lagoa Papari, as demais espécies de Hypostominae geralmente estão restritas a água doce. São espécies bentônicas que podem ser encontradas em bancos de areia ou rios rochosos. A maioria possui hábitos crepusculares e durante o dia permanecem embaixo de pedras ou troncos de árvores mortas (WEBER, 2003).

Devido ao hábito alimentar ser do tipo detritivo-herbívoros, este grupo é de grande importância ecológica, por que promove a pré-mineralização da matéria orgânica antes que esta seja reintegrada à cadeia alimentar (ANGELESCU; GNERI, 1949). Estes peixes também apresentam uma grande importância econômica, onde as espécies de grande porte são apreciadas para o consumo, sendo um importante recurso pesqueiro, enquanto que muitas espécies de pequeno porte são utilizadas como peixes ornamentais (AGOSTINHO et al., 1989).

Os casos de dimorfismo sexual em Loricariidae são mais comuns entre as espécies da tribo Ancistrini, onde os machos sexualmente maduros apresentam nadadeiras e corpo mais espinhoso e algumas modificações dos dentes (FISCH-MULLER, 2003), como *Ancistrus* onde os machos apresentam tentáculos carnosos mais desenvolvidos que as fêmeas (SABAJ et al., 1999). Na subfamília Loricariinae, o gênero *Loricariichthys* apresenta uma expansão do lábio inferior nos machos, possibilitando com que estes possam carregar os ovos durante a reprodução.

Na subfamília Hypostominae 10 gêneros possuem algum tipo de dado citogenético disponível: *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pogonopoma*, *Pterygoplichthys*, *Panaque*, *Ancistrus*, *Baryancistrus*, *Peckoltia* e *Hemiancistrus*, sendo *Hypostomus* o gênero que possui o maior número de espécies cariotipadas (KAVALCO et al., 2005).

Os dados citogenéticos disponíveis até o presente momento, mostram que o número diploide na subfamília varia de 34 em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2009) e *Ancistrus* sp. Purus INPA-25625 (OLIVEIRA et al., 2009) a 84 em *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (CEREALI et al., 2008).

Quanto à localização e número das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), para a tribo Ancistrini, a maioria é simples e estão predominantemente localizadas na região terminal ou intersticial dos cromossomos, só mudando em posição, braço curto e braço longo (ALVES et al., 2003, 2006; MARIOTTO; MYIAZAWA, 2006; MARIOTTO et al., 2004, 2009; OLIVEIRA et al., 2006, 2007, 2008, 2009); para Hypostomini a maioria apresenta RONs múltiplas e localizadas na região terminal (ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO et al., 2004, 2005).

1.2 Bacias Hidrográficas Estudadas

1.2.1 A Bacia Hidrográfica do Atlântico Sul

A Região Hidrográfica Atlântico Sul apresenta uma área de 186.080 km², com 142.178 km² situada no Rio Grande do Sul (76,4%), 36.649 km² em Santa Catarina (19,7%), 5.732 km² no Paraná (3,1%) e 1.521 km² em São Paulo (0,8 %). Está situada na porção sul do Brasil, abrange 2,2% do território nacional e corresponde a um dos dois principais sistemas de drenagem da porção sul do Brasil (BRASIL, 2006a).

Um conjunto de várias bacias independentes formam a vertente leste para o litoral, tendo como principais bacias o sistema Jacuí-Guaíba, o Alto Jacuí, o Vacacaí, o Taquari-Antas, o Caí, o Sinos e o Gravataí; o Camaquã, que desagua na Laguna dos Patos; o Piratini, que desagua no canal São Gonçalo e une as lagoas Mirim e dos Patos, o rio Jaguarão, que desagua na lagoa Mirim e faz fronteira com o Uruguai; o Itajaí-Açu, o Tijucas, o Cubatão e o Itapocú (SC), que desagua diretamente no Oceano (BRASIL, 2006a).

Esta bacia está inserida em áreas correspondentes a dois grandes biomas: Mata Atlântica e Campos Sulinos, com denominação genérica de “Pampa”, juntamente com os Campos de Cima da Serra, encontrados na porção nordeste do Rio Grande do Sul, em estreito contato com a Floresta de Araucárias e, ainda, outras áreas semelhantes a savana. Na porção correspondente ao litoral, tem-se a diversidade demarcada por costões rochosos, praias arenosas, restingas, manguezais, baías e lagoas costeiras alternando-se ao longo da costa. Mais ao norte, uma seqüência de lagoas está disposta na faixa litorânea, no trecho correspondente ao litoral norte gaúcho e o litoral sul catarinense (BRASIL, 2006a).

Estas regiões estuárias são muito utilizadas como berçários por populações de crustáceos e peixes que migram para o Rio Grande do Sul e manguezais de Santa Catarina. A maioria das espécies de peixes, crustáceos e moluscos dos ambientes estuarinos da região apresenta grande importância econômica e sociocultural (BASE DE DADOS TROPICAL, 1999).

Muitas regiões sofrem forte pressão antrópica como as enseadas estuarinas localizadas no entorno das cidades de Rio Grande, Tramandaí e Torres. A qualidade das águas

em torno destas três cidades gaúchas encontra-se bastante comprometida pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais. Por outro lado, os ecossistemas estuarinos da laguna dos Patos e Tramandaí estão seriamente ameaçados pela sobrepesca (BASE DE DADOS TROPICAL, 1999).

Ecorregião Laguna dos Patos: inclui as bacias de todos os rios que formam a laguna dos Patos, desde riachos de cabeceira do planalto, rios pedregosos de encosta, curso baixo de rios e sistema lagunar. Abrange as áreas do Brasil meridional e Uruguai oriental drenando os declives meridionais da formação Serra Geral, no Rio Grande do Sul para o sistema da laguna dos Patos. O sistema principal é formado pela laguna dos Patos e lagoa Mirim, nas quais a maioria dos rios da região deságua. Conectado à porção mais setentrional da laguna dos Patos está o Lago Guaíba, que recebe o rio mais longo deste sistema, o Jacuí e seus principais tributários, Taquari, Caí e Sinos. Outros importantes contribuintes ao sistema são o rio Camaquã, que deságua na laguna dos Patos e o Piratini. A região metropolitana de Porto Alegre, com cerca de 30% de toda a população da Região Hidrográfica Atlântico Sul, está localizada nessa ecorregião (BRASIL, 2006a).

Ecorregião Tramandaí-Mampituba: inclui a área entre as bacias de drenagem dos rios Araranguá e Tramandaí, com as lagoas costeiras associadas. Esta área abrange o extremo norte da planície costeira do Rio Grande do Sul e o extremo meridional de Santa Catarina e é caracterizada por bacias com nascentes em *canyons* que atravessam curta extensão na planície costeira do RS e SC. Os principais rios são: Maquiné e Três Forquilhas, ambos desaguando em lagoas que formam a drenagem do Tramandaí (BRASIL, 2006a).

1.2.2 A Bacia Hidrográfica do Alto Paraná

Segundo dados do Documento Base de Referência do Plano Nacional de Recursos Hídricos (PNRH-DBR, 2005), a Região Hidrográfica do Alto Paraná apresenta 879.860 km², sendo 24,1% pertencentes à área do Estado de São Paulo, 20,9% do Paraná, 19,3% do Mato Grosso do Sul, 18% de Minas Gerais, 16,1% de Goiás, 1,2% de Santa Catarina e 0,4% do Distrito Federal, que equivale a 10,3% do território nacional. Compreende o trecho brasileiro de uma das unidades hidrográficas da Bacia do Rio da Prata, o Alto Paraná, a qual corresponde à área de drenagem da Bacia do rio Paraná até a foz, no rio Iguaçu, na

tríplice fronteira Brasil – Argentina – Paraguai. Corresponde a aproximadamente 59% da Bacia do Rio Paraná e 29% da Bacia do Rio da Prata como um todo (BRASIL, 2006b).

A Região Hidrográfica do Alto Paraná é dividida em seis unidades hidrográficas principais: Grande, Iguazu, Paranaíba, Paranapanema, Paraná e Tietê. O rio Paraná tem por principais formadores os rios Paranaíba e Grande, que se juntam para formar o Paraná no tríplice limite entre os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006b).

Originalmente, esta região era dominada pelos Biomas Mata Atlântica e Cerrado, com cinco tipos de cobertura vegetal: Cerrado, Mata Atlântica, Floresta com Araucária, Floresta Estacional Decídua e Floresta Estacional Semidecídua. Atualmente, o Cerrado ocupa a maior extensão da região, cobrindo desde as nascentes do rio Paraná até o interior do Estado de São Paulo, limitando-se com o Pantanal Mato-Grossense, o qual é integrado por um mosaico de ecossistemas, muitos dos quais constituem prolongamento dos cerrados (BRASIL, 2006b).

Dividida em duas ecorregiões, Iguazu e Alto Paraná. Na bacia do Alto Paraná o rio Paraná é o principal rio da bacia, sendo que desde sua nascente na Serra da Mata da Corda (MG) até a Usina Hidrelétrica de Itaipu, percorre 1.879 km, drenando uma área de quase 900.000 km² (AGOSTINHO; JÚLIO JR., 1999).

O rio Mogi-Guaçu, que é tributário do rio Grande, e faz parte da drenagem do alto Paraná, nasce no estado brasileiro de Minas Gerais, na cidade de Tocos do Moji, na serra da Mantiqueira. O rio nasce a 1.650m de altitude no sul de Minas Gerais, e suas águas percorrem a região central e nordeste do estado de São Paulo, até desaguar a 470m de altitude no Rio Pardo. A bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu compreende uma área de 14.463 km² em quarenta municípios. O rio atravessa zonas urbanas das cidades de Mogi Guaçu, Porto Ferreira, o Distrito de Cachoeira de Emas em Pirassununga e zona rural de Santa Rita do Passa Quatro, que tem aproximadamente 200km de distancia da nascente; na sequência passa pelo norte do município de Descalvado, posteriormente a nordeste e norte do município de São Carlos, prosseguindo em direção a Guataparã e Barrinha (BRASIL, 2006b).

O rio Piracicaba é o maior afluente em volume de água do rio Tietê. É também um dos mais importantes rios paulistas e responsável pelo abastecimento da Região Metropolitana de Campinas e parte da Grande São Paulo (BRASIL, 2006b).

A bacia hidrográfica do rio Piracicaba estende-se por uma área de 12.531 km², situada no sudeste do Estado de São Paulo e extremo sul de Minas Gerais. O rio Piracicaba nasce da junção dos rios Atibaia e Jaguari, no município de Americana. Após atravessar a

cidade de Piracicaba, recebe as águas de seu principal afluente, o rio Corumbataí. O rio Piracicaba percorre 250 km de sua formação até a sua foz no rio Tietê entre os municípios de Santa Maria da Serra e Barra Bonita. A bacia hidrográfica do rio Piracicaba localiza-se numa das regiões mais desenvolvidas do estado de São Paulo, abrangendo importantes municípios como Bragança Paulista, Campinas, Limeira, Americana, Atibaia, Rio Claro, Santa Bárbara d'Oeste e Piracicaba (BRASIL, 2006b).

1.2.3 A Bacia Hidrográfica do Paraguai

A bacia do Paraguai, uma das doze macro bacias hidrográficas do Brasil, possui uma área de 1,1 milhão de km², situando-se nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, bem como em outros países vizinhos do Brasil, como a Argentina, o Paraguai e a Bolívia. A bacia do Paraguai pode ser dividida em duas regiões distintas: o Planalto, com terras acima de 200 m de altitude, e o Pantanal, de terras com menos de 200 m de altitude e sujeitas a inundações periódicas. Os biomas predominantes na bacia são o Cerrado e o Pantanal (BRASIL, 2006c).

O principal rio da bacia é o Paraguai, que nasce no Estado do Mato Grosso e desemboca ao sul no rio Paraná, após receber vários tributários, principalmente da margem esquerda (BRASIL, 2006c).

A bacia hidrográfica formada pelo rio Cuiabá subdivide-se em Alto, Médio e Baixo Cuiabá. Abrangendo cerca de 100.000 km², percorrendo 828 km até chegar ao rio Paraguai. O rio tem suas nascentes nas encostas da Serra Azul, município de Rosário Oeste, na junção dos rios Cuiabá da Larga e Cuiabá Bonito. No município de Nobres, mais caudaloso pela afluência do rio Manso, passa a se chamar rio Cuiabá. Com largura média de 150 m, seus principais afluentes são o ribeirão Pari e os rios Manso, São Lourenço e Coxipó. Este último, cortando o município de Cuiabá, tem sua cabeceira no Parque Nacional de Chapada dos Guimarães e embocadura próxima à comunidade de São Gonçalo Beira-Rio (BRASIL, 2006c).

2. JUSTIFICATIVA

O grande número de espécies de Loricariidae, assim como sua ampla distribuição e diversidade morfológica e de coloração, contribuem para a ocorrência de problemas taxonômicos neste grupo. Assim sendo, a análise cromossômica de espécies pertencentes a diferentes bacias hidrográficas, bem como o estudo das espécies em sua localidade tipo, possibilita a obtenção de marcadores citogenéticos, que são subsídios úteis para a taxonomia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo analisar, por parâmetros citogenéticos, as relações entre as espécies do gênero *Hypostomus*, coletadas em várias localidades de diferentes bacias hidrográficas do Brasil e dos gêneros *Ancistrus* e *Hemiancistrus*. Com estas análises, pretende-se esclarecer problemas taxonômicos e elaborar um modelo de diferenciação cariotípica para o grupo.

3.2 Objetivos Específicos

- (a) Determinar o número e a morfologia cromossômica de diferentes espécies e populações do gênero *Hypostomus* pertencentes a diversas populações estudadas;
- (b) Identificar marcadores cromossômicos utilizando métodos da citogenética clássica e molecular, em espécies representativas da tribo Ancistrini.
- (c) Avaliar os mecanismos de diferenciação e evolução cariotípica em espécies de *Hypostomus*, pela aplicação das técnicas de coloração (i) convencional, (ii) bandamento cromossômico e (iii) hibridação fluorescente *in situ*;
- (d) Identificar os eventos cromossômicos possivelmente associados ao processo evolutivo desses grupos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e Locais de Coleta

Este estudo foi fundamentado em exemplares pertencentes às tribos Ancistrini e Hypostomini (Tabela 1), com ênfase em espécies dos gêneros: *Hypostomus*, *Ancistrus* e *Hemiancistrus* (Fig. 1). Para algumas espécies, este estudo se focou em alguns topótipos, como: *H. albopunctatus*, *H. heraldoi*, *H. hermanni*, *H. iheringii* e *H. paulinus*. As quais foram coletadas pelas equipes de citogenética de peixes da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Universidade Estadual de Londrina (UEL) e de sistemática de peixes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Essas espécies foram coletadas em diferentes localidades (Tabela 1) pertencentes a três bacias hidrográficas: Atlântico Sul, Alto Paraná e Paraguai (Fig. 2 e 3).

Todas as espécies coletadas na bacia do Sistema Laguna dos Patos e Tramandaí/RS foram identificadas pelo Prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba, sistemata do Museu de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Prof. Dr. Roberto Esser dos Reis, sistemata da Pontifícia Universidade Católica (PUC/RS). Os exemplares das bacias dos rios Alto Paraná e Paraguai foram identificados pelo Prof. Dr. Cláudio H. Zawadzki, sistemata do Núcleo de Pesquisa em Limnologia Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá, PR.

Os exemplares foram depositados na coleção do NUPELIA (Centro para Pesquisa em Ictiologia, Limnologia e Aqüicultura) da Universidade Estadual de Maringá.

Tabela 1 – Relação das espécies das tribos Ancistrini e Hypostomini analisadas no presente trabalho.

Espécie	Nº	Local de Coleta	Bacia
<i>Ancistrus brevippinis</i>	10	Rio Forquetinha, Canudos do Vale, RS (29°24'22.4'' S; 52°03'19.2'' W)	Sistema Laguna dos Patos/Atlântico Sul
<i>Ancistrus multispinis</i>	15	Rio Maquiné, Maquiné, RS (29°39'10.4'' S; 50°12'31.8'' W)	Rio Tramandaí/Atlântico Sul
<i>Hemiancistrus punctulatus</i>	12	Rio Forquetinha, Canudos do Vale, RS (29°24'22.4'' S; 52°03'19.2'' W) Rio Carreiro, Serafina Correia, RS (28°42'13.5'' S; 51°50'51.9'' W) Rio Maquiné, Maquiné, RS (29°39'10.4'' S; 50°12'31.8'' W)	Sistema Laguna dos Patos; Rio Tramandaí/Atlântico Sul
<i>Hypostomus albopunctatus</i> (NUP 6430)	29	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07'' S/47°39'19'' W)	Rio Tietê/Alto Paraná
<i>Hypostomus cochliodon</i> (NUP 9723)	9	rio Piraputanga, Cáceres, MT (16°3'33'' S/57°40'33'' W)	Rio Paraguai
<i>Hypostomus commersoni</i>	12	Rio Forquetinha, Canudos do Vale, RS (29°24'22.4'' S; 52°03'19.2'' W)	Sistema Laguna dos Patos/Atlântico Sul
<i>Hypostomus heraldoi</i>	2	rio Pirapitinga, Caldas Novas, GO (17°43'37'' S/48°32'54'' W)	rio Corumbá/Alto Paraná
<i>Hypostomus hermanni</i> (NUP 6410)	42	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07'' S/47°39'19'' W)	Rio Tietê/Alto Paraná
<i>Hypostomus iheringii</i> (NUP 6428)	3	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07'' S/47°39'19'' W)	Rio Tietê/Alto Paraná
<i>Hypostomus mutucæ</i> (NUP 6642)	6	rio Claro, Chapada dos Guimarães, MT (15°20'13'' S/55°53'45'' W)	Rio Cuiabá/Paraguai
<i>Hypostomus nigromaculatus</i> (NUP 4079)	4	rio Pirapitinga, Caldas Novas, GO (17°43'37'' S/48°32'54'' W)	rio Corumbá/Alto Paraná
<i>Hypostomus paulinus</i> (NUP 6411)	24	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07'' S/47°39'19'' W)	Rio Tietê/Alto Paraná
<i>Hypostomus aff. paulinus</i>	1	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07'' S/47°39'19'' W)	Rio Tietê/Alto Paraná
<i>Hypostomus regani</i>	13	rio Mogi Guaçu – Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP (21°55'37.7'' S/47°22'02.63'' W)	Rio Grande/Alto Paraná
<i>Hypostomus regani</i> (NUP 4077)	3	rio Pirapitinga, Caldas Novas, GO (17°43'37'' S/48°32'54'' W)	Rio Corumbá/Alto Paraná
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	4	rio Mogi Guaçu – Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP (21°55'37.7'' S/47°22'02.63'' W)	Rio Grande/Alto Paraná

Fonte: Elaborado pela Autora.



Figura 1 - Espécies analisadas: **a)** *Hypostomus albopunctatus*, **b)** *H. commersoni*, **c)** *H. heraldoi*, **d)** *H. hermanni*, **e)** *H. iheringii*, **f)** *H. margaritifera*, **g)** *H. mutuae*, **h)** *H. nigromaculatus*, **i)** *H. paulinus*, **j)** *Hypostomus* aff. *paulinus*, **k)** *H. regani* (rio Mogi Guaçu), **l)** *H. regani* (rio Pirapitinga), **m)** *H. strigaticeps*, **n)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (forma I), **o)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (forma II), **p)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (forma III), **q)** *Ancistrus multispinis*, **r)** *A. brevipinnis* (♂), **s)** *A. brevipinnis* (♀), **t)** *Hemiancistrus punctulatus*. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

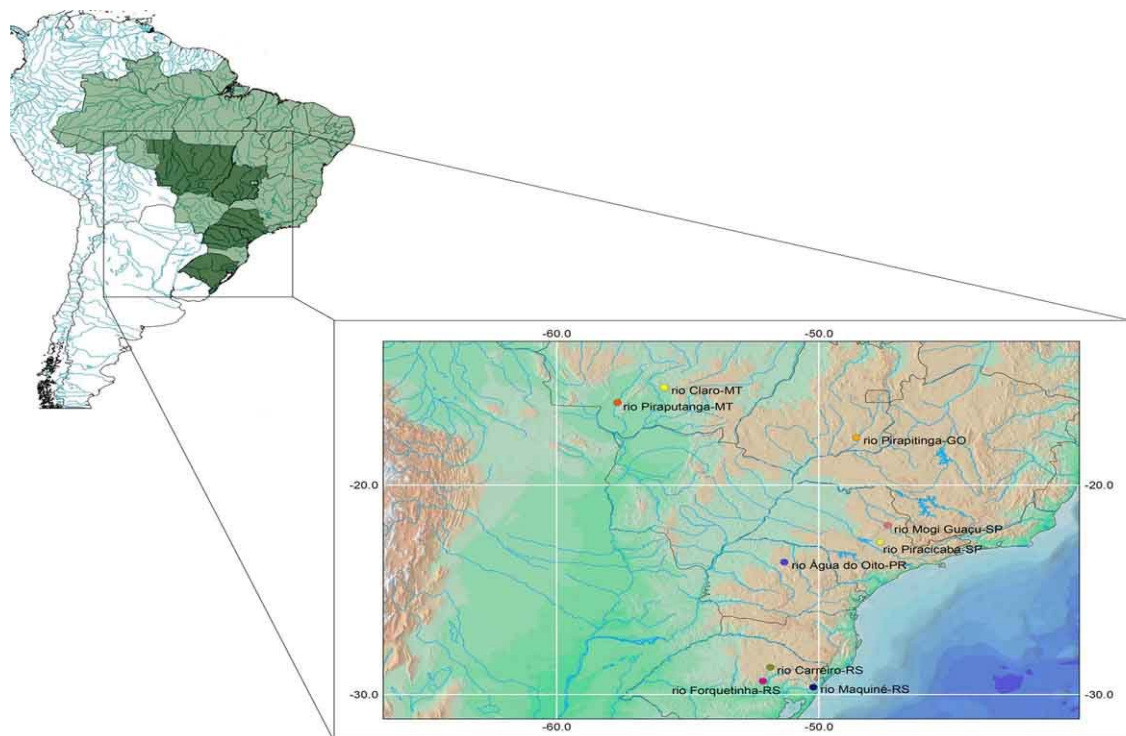


Figura 2 - Mapa das regiões de coleta nas bacias do Alto Paraná, Paraguai e Atlântico Sul: rio Piracicaba (Piracicaba – SP); rio Mogi Guaçu (Pirassununga – SP); rio Pirapitinga (Caldas Novas – GO); rio Claro (Chapada dos Guimarães – MT); rio Piraputanga (Cáceres – MT); rio Forquetinha (Canudos do Vale – RS); rio Carreiro (Serafina Corrêa – RS); rio Maquiné (Maquiné – RS). **Fonte:** Elaborado pela Autora.



Figura 3 – Locais de Coleta. **a)** rio Piracicaba (Piracicaba – SP); **b)** rio Mogi Guaçu – região da topava em Cachoeira de Emas (Pirassununga – SP); **c)** rio Pirapitinga (Caldas Novas – GO); **d)** rio Claro (Chapada dos Guimarães – MT); **e)** rio Piraputanga (Cáceres – MT); **f)** rio Forquetinha (Canudos do Vale – RS); **g)** rio Carreiro (Serafina Corrêa – RS); **h)** rio Maquiné (Maquiné – RS).
Fonte: Elaborado pela Autora.

4.2 Metodologia

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas e/ou peneiras. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas para o laboratório de Citogenética, onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção dos cromossomos.

4.2.1 Indução ao aumento do número de mitoses pela técnica de suspensão de levedura (LEE; ELDER, 1980)

Foi injetada no animal uma solução de suspensão de levedura (Fermento Biológico seco) dissolvida em água, na proporção de 1 mL/100g de peso animal. Os exemplares foram mantidos vivos em aquários durante 48 horas, após o qual se processou o material para a preparação de cromossomos mitóticos.

4.2.2 Técnica de suspensão celular para obtenção de cromossomos mitóticos - preparação direta *in vivo* (BERTOLLO et al., 1978)

Foi injetada no animal, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,0125%, na proporção de 1mL/100g de peso animal. Após 30 minutos o animal foi anestesiado em uma solução de benzocaína (1g/200 mL álcool etílico) por aproximadamente 15 minutos e sacrificado. Foi retirada porções do rim anterior e colocadas em placas de petri contendo cerca de 6-10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M). O material foi fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, para a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, a suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrífuga e incubou-se esta suspensão a 37°C, durante 30 minutos. Decorrido este tempo, o

material foi pré-fixado com 10 gotas de fixador, recém preparado (metanol; ácido acético – 3:1) e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm, descartando o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se 5-7mL de fixador, o material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento se repetiu por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1mL de fixador. Este material foi guardado em freezer, acondicionado em microtubos de 1,5 mL.

Posteriormente, para observação dos cromossomos mitóticos obtidos as lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 a 8 minutos, seguindo-se a lavagem da lâmina com água destilada e a secagem ao ar.

4.2.3 Classificação cromossômica

Os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos) conforme a relação de braços (LEVAN et al., 1964), onde o limite da relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st);

RB= >7,00, acrocêntrico (a).

Os cromossomos st-a foram agrupados conforme estudos citogenéticos anteriores em Loricariidae (ARTONI; BERTOLO, 1999; 2001; ALVES et al., 2006; RUBERT et al., 2008). O número fundamental (NF) foi determinado considerando os cromossomos st-a com um braço e m-sm com dois braços.

Os cromossomos foram analisados em microscópio Leica DM 2000. Para a captura das imagens foi utilizado o software Motic Image Plus 2.0.

4.2.4 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS) (HOWELL; BLACK, 1980)

Sobre a lâmina adicionaram-se duas gotas de solução aquosa de gelatina (1g/100mL de água destilada e 0,5 ml de ácido fórmico) juntamente com quatro gotas de solução aquosa de Nitrato de Prata (50%). A lâmina foi coberta com lamínula e incubada a 60°C por um período de aproximadamente 5-7 minutos, ou até que esta atingisse uma coloração âmbar. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi lavada em água destilada e as metáfases observadas em microscópio óptico.

4.2.5 Bandamento C (SUMNER, 1972)

As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2N a 42 °C, durante 13 minutos, posteriormente foram lavadas em água destilada e após secas foram incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 37 °C, durante 45-120 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2N e água destilada. As lâminas foram secas novamente ao ar e incubadas em solução salina 2xSSC (cloreto sódio 0,29M e citrato de sódio) a 60 °C, durante 25-30 minutos. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com Iodeto de Propídeo na proporção de 25 µL de meio de montagem DABCO para 1 µL de Iodeto de Propídeo por lâmina.

4.2.6 Coloração pelos fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI (SCHWEIZER, 1980)

Primeiramente foi colocado cerca de 40 µL da solução de Cromomicina A₃ (1mg/mL) sobre o material, cobriu-se com lamínula e foi deixada por 60 minutos no escuro. Escorreu-se a lamínula e a lâmina foi lavada em água corrente, deixando secar ao ar. Em seguida, foi

adicionada 40µL de solução de distamicina 0,1 mg/mL sobre cada lâmina e deixada por 15 minutos no escuro. Escorreu-se a lamínula e a lâmina foi lavada em água corrente, deixando secar ao ar. Posteriormente foi adicionada 40 µL de solução DAPI (0,2mg/mL) e coberta com lamínula, deixando agir por 15 minutos no escuro. A lamínula foi escorrida e a lâmina lavada em água corrente. Após secar levemente, a lâmina foi montada com 30 µL de meio de montagem glicerol/McIlvaine. As lâminas foram mantidas no escuro durante 7 dias e examinadas em microscópio de epifluorescência.

4.2.7 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL et al., 1986, com modificações)

As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation* segundo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System - Invitrogen). Os cromossomos foram incubadas em RNase (0.4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação, realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 12 µL de sonda, 30 µL de formamida (concentração final de 50%), 12 µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6 µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 45°C, por 5 minutos cada e uma vez em 1xPBS por 10 minutos a 45°C, e posteriormente incubadas em 1xPBD (200 mL 20xSSC, 6 mL Triton 100, 10g leite desnatado em pó, 800 mL de água destilada). A detecção do sinal foi realizada com 3.5 µL de FITC (diluição de 1:100) e 27 µL de BSA 5% por 1 hora a 37°C em câmara úmida, por lâmina. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 5 minutos cada, para amplificação do sinal foi utilizado uma solução de anti-avidina-biotina (Sigma) conjugada (1 µL de anti-avidina-biotina e 39 µL de 1xPBD) por lâmina, durante 20 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 5 minutos, cada lâmina foi tratada com 3.5 µL de FITC (1:100) + BSA 5%, por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens finais, os cromossomos foram corados com iodeto de propídio (50 µg/ml).

Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência com câmera Leica DFC 300FX. Para a captura das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite V 3.1.0.

4.2.8 Extração de DNA a partir de Tecidos Sólidos (SAMBROOK et al., 1989), com modificações.

Pedaços de tecido foram macerados com o auxílio de pinças; Passados para microtubos de 2mL contendo 900 µL de solução de digestão (NaCl 5M; EDTA 0,1M pH 8.0; Tris-HCl 1M; SDS 10%). Foi adicionado em cada tubo 5-10 µL de proteinase K (20 µg/µL) e os tubos foram levados ao banho-maria a 55°C por 2-3 horas. Posteriormente foi acrescentado igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e invertido suavemente por 20 minutos. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, cerca de 600 µL, foi passado para um microtubo limpo. Foi acrescentado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e invertido suavemente por 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante (500 µL) transferido para um tubo limpo. Igual volume de NaCl 1M e 2 volumes de etanol absoluto gelado foi acrescentado e os tubos foram invertidos suavemente para a precipitação do DNA e deixado a 4 °C *overnight*. Posteriormente, o material foi centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi acrescentado 200 µL de etanol 70% gelado, e centrifugado a 15.000 rpm por 5 minutos novamente o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram deixados na bancada até secar ou em estufa a 37°C. Depois foi acrescentado 50 a 200 µL de água ou TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) por tubo. Após bem eluído foi acrescentado 1-2 µL de RNase (100 µg/mL) por tudo durante 30 minutos a 37°C. E estocados em freezer a -20°C até o uso.

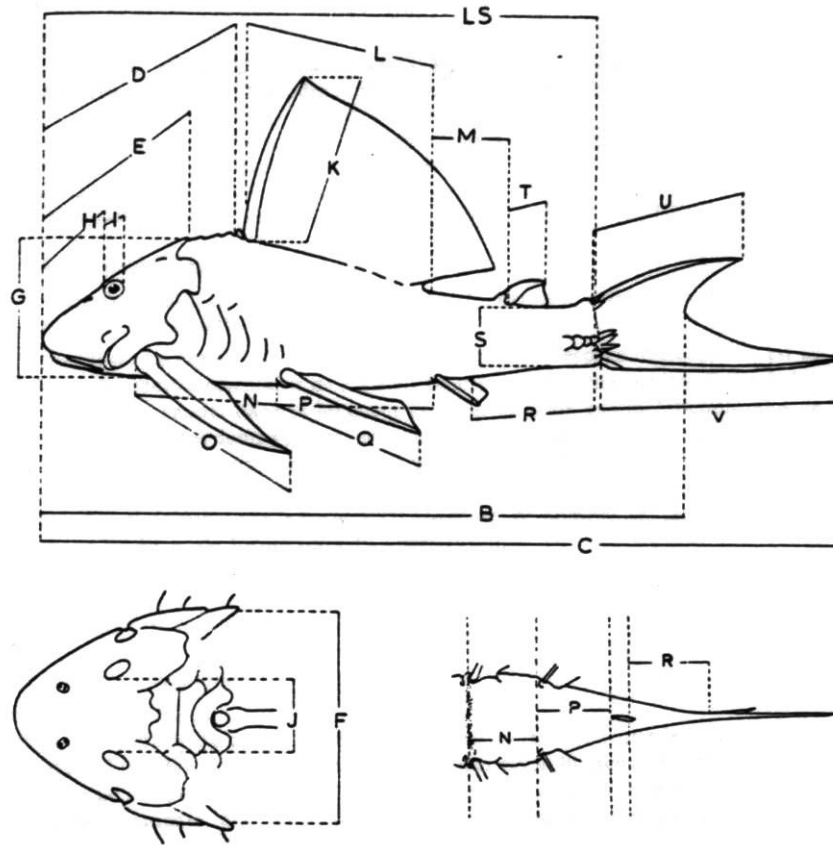
4.2.9 Análises Morfológicas

Um total de 48 espécimes foi medido: 19 exemplares de *H. heraldoi*, do rio Pirapitinga/GO, 11 de *H. albopunctatus* e 18 exemplares de *Hypostomus* aff. *albopunctatus*.

As medidas foram tomadas ponto a ponto com um paquímetro com precisão de 0,05 mm sob um microscópio estereoscópico. Os seguintes caracteres foram obtidos: SL = standard length (comprimento padrão); AL = abdominal length (comprimento abdominal) (P),

TL = total length (comprimento total) (C); PDD, HL = head length (comprimento da cabeça) (E); CTRL = cleithral width (largura cleitral) (F); HD = head depth (altura da cabeça) (G), NL, OD = orbital diameter (diâmetro orbital) (I); IW = interorbital width (largura interorbital) (J), DFBL = dorsal-fin base length (comprimento da base da nadadeira dorsal) (L), IDL (comprimento inter-dorsal), PACPL (comprimento pós anal do pedúnculo caudal), MHCP (altura mínima do pedúnculo caudal), FRDFL (primeiro raio indiviso da nadadeira dorsal), FRPECFL (primeiro raio indiviso da nadadeira peitoral), FRPELFL (primeiro raio indiviso da nadadeira pélvica), TORL (comprimento torácico), ABDL (comprimento abdominal), SRCF (raio indiviso superior da nadadeira caudal), IRCF (raio indiviso inferior da nadadeira caudal), ADPFL = adipose-fin spine length (comprimento do espinho da nadadeira adiposa), BARBL = maxillary barbell length (comprimento do barbilhão), MAXL = premaxillary ramus length (comprimento do ramo pré-maxilar); LLW (largura do lábio inferior), LLL (comprimento do lábio inferior). As letras em parênteses correspondem às medidas em Boeseman (1968), representados na figura abaixo.

As análises das medidas foram realizadas pelo programa PAST, analisando os componentes principais e pelo programa SHEAR, levando em consideração somente os componentes que apresentam maior peso na diferenciação entre as populações.



Fonte: Boeseman (1968).

5. REFERÊNCIAS (Introdução, Material e Métodos).

- AGOSTINHO, A. A. et al. Produção pesqueira e situação de pesca no reservatório de Itaipu. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE GRANDES BARRAGENS, 2., 1989, Foz do Iguaçu. **Anais...**Foz do Iguaçu: Comitê Brasileiro de Grandes Barragens, 1989. p. 1059-1075.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr., H. F. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-400.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae e Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, Italy, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.
- ALVES, A. L. et al. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.
- ANGELESCU, O. R.; GNERI, O. S. Adaptaciones del aparato digestivo al regimen alimenticio en algunos peces del rio Uruguay del rio de la Plata. HI tipo omnívoro y ilifago em representantes de las familias “Loricariidae”y “Anostomidae”. **Ver. Inst. Nac. Invest. Ciênc. Natur.**, v. 6, p. 159-272, 1949.
- ARMBRUSTER, J. M. Modifications of the digestive tract for holding air in Loricariid and Scoloplacid Catfishes. **Copeia**, v. 3, p. 663-675, 1998.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, p. 201-210, 2001.
- BDT. Base de Dados Tropical. Fundação André Tosello. Workshop “Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade da Zona Costeira e Marinha”. Porto Seguro – BA, 25 a 29 de outubro de 1999. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/> Acesso em junho/2011).
- BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). **Braz. J. Genet.**, v. 1, p. 103-120,

1978.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Secretaria de Recursos Hídricos. **Caderno da Região Hidrográfica Atlântico Sul**. Brasília, 2006a. 128 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Secretaria de Recursos Hídricos. **Caderno da Região Hidrográfica do Paraná**. Brasília, 2006b. 240 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Secretaria de Recursos Hídricos. **Caderno da Região Hidrográfica do Paraguai**, Brasília, 2006c. 140 p.

CEREALI, S. S. et al. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 7, p. 583-591, 2008.

FERRARIS JR., C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1-628, 2007.

FISCH-MULLER, S. Subfamily Ancistrinae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 373-400.

HAAF, T. et al. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Chrom. Res.**, v. 1, p. 77-86, 1993.

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

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

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

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

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 26, p. 36-40. 1980.

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

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C. S. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 299-304, 2006.

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

MARIOTTO, S. et al. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotrop. Ichthyol.**, v. 7, n. 4, p. 595-600, 2009.

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. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 4, n. 1, p. 93-97, 2006.

OLIVEIRA, R. R. et al. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 5, n. 3, p. 301-306, 2007.

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. **Genetica**, v. 134, p. 243-249, 2008.

OLIVEIRA, R. R. et al. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **J. Fish Biol.**, v. 75, p. 2209-2225, 2009.

PEREIRA, E. H. L. Resurrection of *Pareiorhaphis* Miranda Ribeiro, 1918 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae), and description of a new species from the rio Iguaçú basin, Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 3, n. 2, p. 271-276, 2005.

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

REIS, R. E.; WEBER, C.; MALABARBA, L. R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Rev. Suis. Zool.**, v. 97, n. 3, p. 729-766, 1990.

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

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 147, p. 277-299, 2006.

SABAJ, M. H.; ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 10, n. 3, p. 217-229, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 956 p.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 27, p. 190-193, 1980.

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

WEBER, C. Subfamily Hypostominae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 351-372.

CAPÍTULO I

Análises cromossômicas de três espécies da tribo Ancistrini (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae) da bacia do Atlântico Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

Análises citogenéticas foram realizadas em três espécies da tribo Ancistrini, endêmicas da bacia do Atlântico Sul/RS: *Ancistrus brevipinnis*, *A. multispinis* e *Hemiancistrus punctulatus*. *Ancistrus multispinis*, *A. brevipinnis* e *H. punctulatus* apresentaram $2n=52$, com diferença nas fórmulas cariotípicas e no par da constrição secundária e Regiões Organizadora de Nucléolos (RONs): $14m+14sm+24st-a$ (22° par), $14m+14sm+24st-a$ (24° par), e $14m+26sm+12st-a$ (10° par), respectivamente. As Ag-RONs foram simples para todas as espécies, confirmados pela FISH com sonda de DNAr 18S, sendo estas regiões CMA_3^+ /DAPI. Entretanto, houve diferença quanto à localização das RONS, com sítios terminais no braço curto em *A. brevipinnis*, *A. multispinis* e no braço longo em *H. punctulatus*. Também ocorreram diferenças significativas quanto ao padrão de bandamento-C, com grandes blocos heterocromáticos no braço longo de alguns pares st-a em *A. brevipinnis*, *A. multispinis*; e uma quantidade muito reduzida de bandas positivas em *H. punctulatus*. Nesta última espécie a heterocromatina foi também evidenciada na região pericentromérica de um par m-sm, além da região que provavelmente seja correspondente às RONS. Por meio dos dados obtidos neste trabalho, associados aos demais existentes para o grupo, foi possível discutir as relações citogenéticas entre as demais espécies de Ancistrini.

Palavras chaves: Sistema Laguna dos Patos. Bacia do rio Tramandaí. *Ancistrus*. *Hemiancistrus*. Marcadores cromossômicos.

Introdução

A família Loricariidae é uma das maiores famílias de peixes do mundo e possui, até a última revisão, 716 espécies descritas distribuídas na região Neotropical (FERRARIS JR., 2007). São peixes que se encontram distribuídos na América do Sul, Panamá e Costa Rica. Possuem algumas características morfológicas que os diferenciam dos demais grupos de peixes, como o corpo coberto por grandes placas ósseas, uma boca suctória ventral e barbilhões reduzidos (ARMBRUSTER; PAGE, 2006).

De acordo com estudos filogenéticos desenvolvidos por Reis et al. (2006), os quais se basearam em estudos anteriores realizado por Armbruster (2004), a família pode ser dividida em seis subfamílias: Delturinae, Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae, sendo a última subdividida em cinco tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini.

De acordo com Ferraris Jr. (2007), a subfamília Hypostominae é composta por aproximadamente 400 espécies, onde 24 gêneros formam a tribo Ancistrini, sendo 62 espécies pertencentes ao gênero *Ancistrus* e 22 à *Hemiancistrus*.

Com relação aos dados citogenéticos disponíveis para a tribo Ancistrini apenas algumas espécies de cinco gêneros foram estudados citogeneticamente: *Ancistrus*, *Baryancistrus*, *Hemiancistrus*, *Panaque* e *Peckoltia*.

Os dados citogenéticos disponíveis até o presente momento, mostram que o número diploide na tribo varia de 34 em *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (MARIOTTO et al., 2009) e *Ancistrus* sp. “Purus” INPA-25625 (OLIVEIRA et al., 2009) a $2n=52$, encontrado na maioria das espécies estudadas. Para a subfamília Neoplecostominae, há uma predominância de 54 cromossomos para todas as espécies analisadas.

Dentre as espécies da família Loricariidae estudadas, a tribo Ancistrini é a que possui o maior número de espécies com presença de sistema de cromossomos sexuais, como *Ancistrus* cf. *dubius* (MARIOTTO; MYIAZAWA, 2006), *Ancistrus* sp. “Macoari” INPA-25629, *Ancistrus* sp. “Purus” INPA-25625 (OLIVEIRA et al., 2009) com sistema XX/XY; *Ancistrus* cf. *dubius* (MARIOTTO et al., 2004), *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003 (OLIVEIRA et al., 2006), *Ancistrus* sp. “Piagaçu” e *Ancistrus ranunculus* Muller, Rapp Py-Daniel e Zuanon, 1994 (OLIVEIRA et al., 2007) todos com sistema ZZ/ZW; *Ancistrus* n.

sp. 1 com sistema XX/X0 (Alves et al., 2006); *Ancistrus* sp.1 “Balbina” com XX/XY₁Y₂ e *Ancistrus* sp.2 “Barcelos” com sistema Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂ (OLIVEIRA et al., 2007).

Os estudos citogenéticos disponíveis da ictiofauna encontrada na bacia do Atlântico Sul, principalmente do Sistema Laguna dos Patos e Tramandaí, ainda são escassos, realizados apenas em alguns grupos de peixes como: *Parapimelodus nigribarbis* (BOULENGER, 1889) e *Pimelodus maculatus* LaCépède, 1803 (TRECO et al., 2008); *Astyanax laticeps* (COPE, 1894) (ROSA et al., 2009); *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (PACHECO et al., 2010); em *Geophagus brasiliensis* (QUOY; GAIMARD, 1824), *Gymnogeophagus gymnogenys* (HENSEL, 1870) e *G. labiatus* (HENSEL, 1870) (PIRES et al., 2010); *Rineloricaria cadeae* (HENSEL, 1868) e *R. strigilata* (HENSEL, 1868) (MAIA et al., 2010), sendo estes, os únicos representantes da família Loricariidae estudados do local.

No presente estudo, foram descritas as primeiras análises citogenéticas de *Ancistrus brevippinnis* (REGAN, 1904), *A. multispinis* (REGAN, 1912), *Hemiancistrus punctulatus* Cardoso e Malabarba (1999), pertencentes à bacia do rio Tramandaí/RS e/ou do sistema Laguna dos Patos/RS. Os resultados obtidos neste trabalho foram usados para fornecer informações sobre a organização cariotípica dessas três espécies e discutir alguns aspectos das relações cromossômicas entre elas, bem como, contribuir com dados citogenéticos da ictiofauna destas bacias hidrográficas.

Material e Métodos

Foram analisados exemplares da tribo Ancistrini pertencentes a duas bacias do Atlântico Sul, sistema hidrográfico Laguna dos Patos e bacia do rio Tramandaí. *Ancistrus brevippinnis* (4 machos, 6 fêmeas), coletadas no rio Forquetinha, município de Canudos do Vale, RS (29°24'22.4''S; 52°03'19.2''W); *Ancistrus multispinis* (7 machos, 8 fêmeas), provenientes do rio Maquiné, município de Maquiné, RS (29°39'10.4''S; 50°12'31.8''W) e *Hemiancistrus punctulatus* (6 machos, 6 fêmeas), dos rios Forquetinha, Canudos do Vale, RS (29°24'22.4''S; 52°03'19.2''W), Carreiro, Serafina Correia, RS (28°42'13.5''S; 51°50'51.9''W) e Maquiné, Maquiné, RS (29°39'10.4''S; 50°12'31.8''W).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos das células de rim de acordo com a técnica de Bertollo et al. (1978). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos

(m), submetacêntricos (sm), subteloacêntricos (st) e acrocêntricos (a), como comumente utilizado em peixes (BERTOLLO et al., 1983; PORTELA et al., 1988, entre outros). Os cromossomos subtelo-acrocêntricos foram agrupados de acordo com os estudos citogenéticos prévios em Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 1999, 2001; ALVES et al., 2006; RUBERT et al., 2008). O número fundamental (NF) foi determinado considerando os cromossomos st-a como um braço e m-sm como dois braços. Para localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) seguiu-se o protocolo de Howell e Black (1980) e Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) de acordo com o protocolo de Pinkel et al. (1986), utilizando sondas de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (HATANAKA; GALETTI JR., 2004). Para determinar a distribuição da heterocromatina, as metáfases foram submetidas ao bandamento-C (SUMNER, 1972) e coradas com iodeto de propídeo. As regiões ricas em pares de bases GC e AT foram detectadas pela coloração com os fluorocromos base-específicos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4' 6-diamidin-2-phenylindole (DAPI), de acordo com Schweizer (1980).

Resultados

Na análise por Giemsa, *Ancistrus multispinis* (Fig. 1a), *A. brevipinnis* (Fig. 1e) e *Hemiancistrus punctulatus* (Fig. 1i) apresentaram $2n=52$, porém com diferença nas fórmulas cariotípicas entre os dois gêneros. *Ancistrus multispinis* e *A. brevipinnis* apresentaram a mesma fórmula cariotípica, $14m+14sm+24st-a$ e *H. punctulatus* apresentou $14m+26sm+12st-a$. Para as três espécies analisadas as AgRONs foram correspondentes as constrições secundárias (Fig. 1b, f e j, respectivamente) e confirmadas pela FISH com utilização da sonda de DNAr 18S (Fig. 1 d, h, l, respectivamente), entretanto, diferiram na posição e localização das mesmas. As AgRONs estavam presentes no braço curto do 22º par (st-a) para *A. brevipinnis* (Fig. 1a e b), no 24º par (st-a) para *A. multispinis* (Fig. 1e e f) e em *H. punctulatus* as RONs estavam presentes no braço longo do 10º par (sm) do complemento (Fig. 1i e j).

A coloração com fluorocromo CMA₃ revelou marcações positivas correspondentes às RONs e o DAPI apresentou marcações negativas nos cromossomos portadores das RONs para *A. multispinis*, *A. brevipinnis* e *H. punctulatus* (Fig. 1 c, g e k, respectivamente).

Quanto ao padrão de banda-C, houve uma grande diferença entre as espécies. Em *A. brevipinnis* foram observados blocos de heterocromatina nas regiões terminais de alguns cromossomos st-a, onde um destes pares apresentou duas bandas adjacentes no braço longo, e também a heterocromatina mostrou-se intercalar às RONS (Fig. 2 a). Em *A. multispinis* foram observados blocos grandes de heterocromatina presentes no braço longo de três cromossomos st-a e associada às RONS (Fig. 2 b). Em *H. punctulatus*, a heterocromatina está distribuída na região pericentromérica de um par metacêntrico e, provavelmente, associada às RONS (Fig. 2 c).

Discussão

O número diploide ($2n=52$) encontrado em *A. multispinis*, *A. brevipinnis* e *H. punctulatus*, corresponde ao número de cromossomos frequentemente encontrado para a maioria das espécies da tribo Ancistrini. Porém, outros números cromossômicos já foram reportados para o grupo, variando de $2n=34$ em *Ancistrus* sp. “Purus” INPA-25625 (OLIVEIRA et al., 2009) e *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2009) a $2n=52$, mostrando uma grande variabilidade cariotípica para os representantes desta tribo (Tabela 1). As espécies de Ancistrini apresentam uma grande variação, tanto no número cromossômico quanto na fórmula cariotípica, e parece haver uma tendência de redução numérica dos cromossomos nesse grupo, ou seja, os rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica do grupo seriam principalmente do tipo fusão cêntrica (ALVES et al., 2003, 2006).

Ancistrus multispinis e *A. brevipinnis* apresentaram um número alto de cromossomos st-a, o que não é comumente verificado em espécies com um menor número diploide, nem em representantes da tribo Ancistrini. Tal fato também foi observado por Oliveira et al. (2007) em *Ancistrus* sp. “Piagaçu”, divergindo assim da hipótese proposta para a família, onde, espécies que apresentam menor $2n$ consequentemente apresentariam um maior número de cromossomos m-sm (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Assim, possivelmente o cariótipo destas espécies em particular, evoluiu também devido a inversões pericêntricas ou mesmo por outros rearranjos como translocações.

Todas as espécies aqui analisadas divergiram quanto a posição dos cromossomos portadores de RONS no cariótipo, bem como na localização desses sítios nos

cromossomos, o que é comum na família Loricariidae. As RONS terminais são mais freqüentes em Ancistrini (ALVES et al., 2003, 2005, 2006; ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006, 2007, 2008, 2009) e menos comum a sua localização intersticial (SOUZA et al., 2004; MARIOTTO; MYIAZAWA, 2006; MARIOTTO et al., 2004, 2009). Em Ancistrini, até o presente momento, só foram relatados três casos de multiplicidade de RONS, em *Peckoltia* sp. 1 e *Peckoltia* sp. 2 (SOUZA et al., 2009) e *Hemiancistrus spilomma* (OLIVEIRA et al., 2006). Mariotto et al. (2004) observaram em *Ancistrus cuiabae*, além de três diferentes citótipos, diferentes fenótipos de RONS, sendo as amostras estudadas tratadas pelos autores como um possível complexo de espécies. Neste trabalho, nenhuma variação foi vista com relação à posição e números de RONS entre populações da mesma espécie. Por sua vez, nas três espécies de Ancistrini, as RONS são $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$, padrão este também encontrado na maioria dos Loricariidae, assim como em outros representantes da tribo Ancistrini, como *Baryancistrus* aff. *niveatus* (SOUZA et al., 2004); *Ancistrus* cf. *dubius* (MARIOTTO et al., 2004; MARIOTTO; MYIAZAWA, 2006); *Peckoltia vittata*, *Peckoltia* sp. 1 e *Peckoltia* sp. 2 (SOUZA et al., 2009).

Ancistrus brevipinnis e *A. multispinis*, mostraram blocos heterocromáticos terminais conspicuos em alguns pares de cromossomos st-a, ao contrário do observado em *H. punctulatus*, que possui bandas-C discretas. Por meio do bandamento-C, foi possível também diferenciar *Ancistrus brevipinnis* e *A. multispinis*, semelhantes no número diplóide e fórmula cariotípica. Tem sido observado que Ancistrini, com exceção de *Hemiancistrus*, apresentam heterocromatina distribuída nas regiões centroméricas, intersticiais e/ou terminais de cromossomos st-a, freqüentemente em grandes blocos (KAVALCO et al., 2004; SOUZA et al., 2004; MARIOTTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007, 2008, 2009; SOUZA et al., 2009), porém, somente neste trabalho temos relato quanto a heterocromatina em *Hemiancistrus*, sendo necessário mais espécies para uma maior discussão.

A heterocromatina é considerada um importante fator na diversificação cariotípica de peixes (ARTONI et al., 1999; MARGARIDO; GALETTI JR., 2000), e tem sido um importante marcador para a caracterização e diferenciação de diversas espécies e populações com problemas taxonômicos, principalmente relacionados ao gênero *Ancistrus* (MARIOTTO; MYIAZAWA, 2006; MARIOTTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009). Adicionalmente, a presença de diferentes sistemas sexuais, a localização e número de RONS também têm auxiliado nestas análises (ALVES et al., 2003; MARIOTTO; MYIAZAWA, 2006; MARIOTTO et al., 2004; SOUZA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007, 2008, 2009).

Foi observado no presente trabalho, que Ancistrini é um grupo muito variável, porém, esta variação está mais relacionada ao gênero *Ancistrus*. Todas essas características apresentadas pelas espécies de *Ancistrus* sugerem uma evolução divergente dos demais Loricariidae, apresentando uma tendência reducional do número diploide. Segundo Oliveira et al. (2009) a diversidade cariotípica, bem como a rápida fixação de qualquer mutação cromossômica observada, neste grupo, estaria relacionada com seu comportamento reprodutivo especializado e a preferência por microhabitats. Assim, *Ancistrus* se torna um importante modelo de estudo da evolução cariótipica que vem ocorrendo em Ancistrini e para os demais representantes da família.

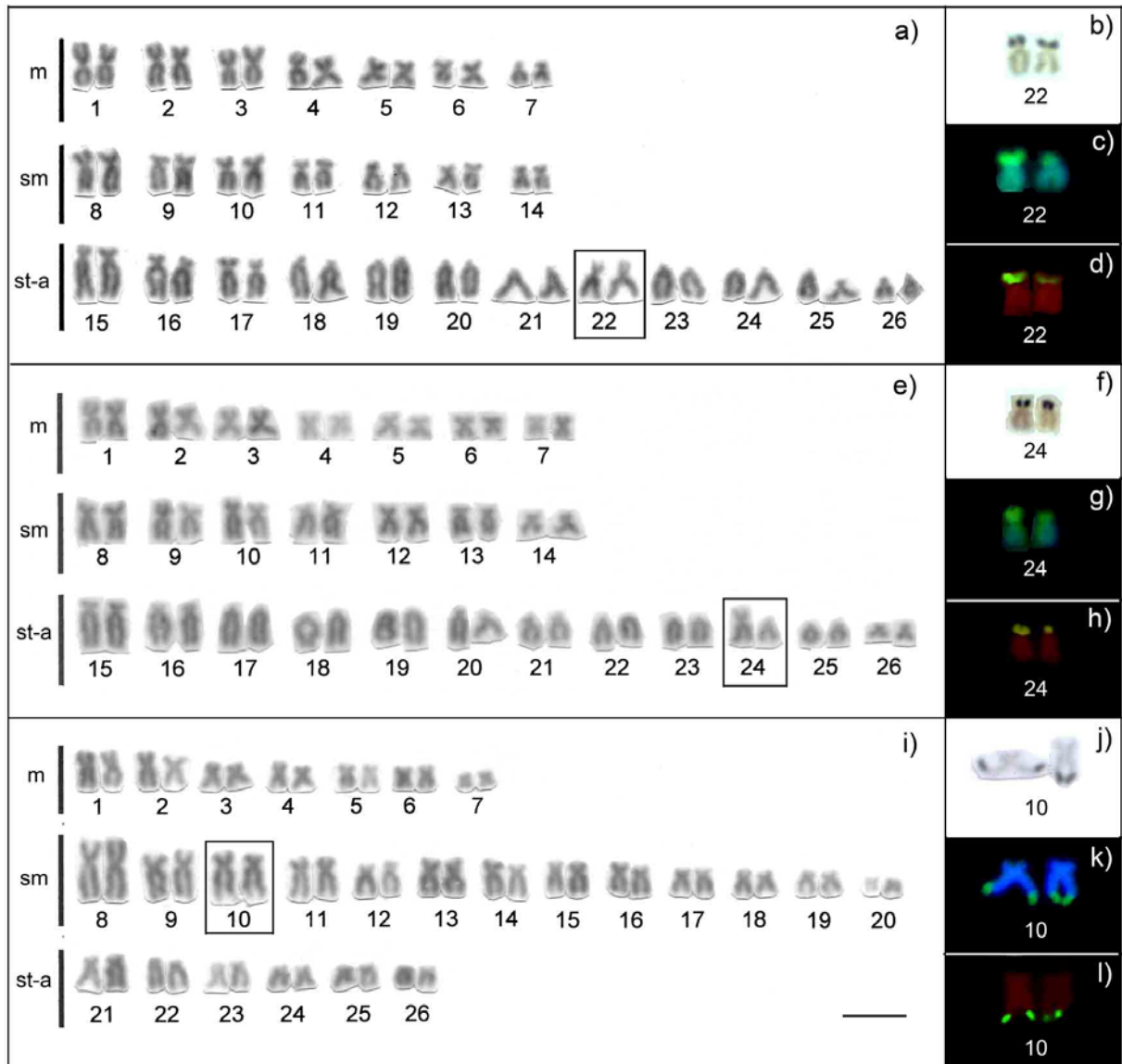


Figura 1 – Cariótipos corados por Giemsa de **a)** *Ancistrus brevipinnis*; **e)** *Ancistrus multispinis*; **i)** *Hemiancistrus punctulatus*. Em destaque estão os cromossomos com as constrições secundárias. Nos boxes, os pares das RONS com impregnação por nitrato de prata (**b**, **f** e **j**), CMA₃ (**c**, **g** e **k**) e FISH (**d**, **h** e **l**) com DNAr 18S. Barra 5 µm. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

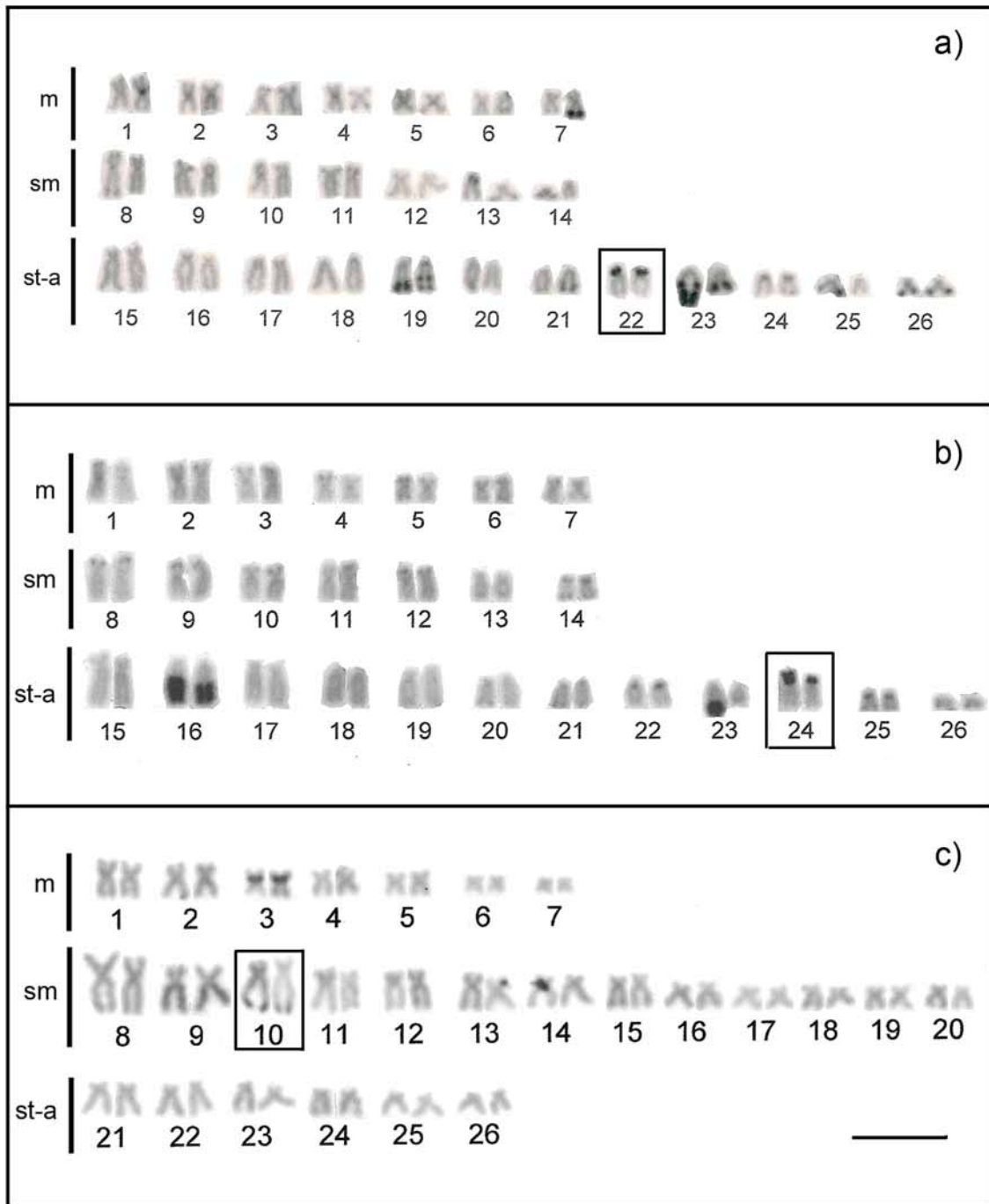


Figura 2 – Cariótipos com bandamento-C em a) *Ancistrus brevipinnis*; b) *Ancistrus multispinis*; c) *Hemiancistrus punctulatus*. Em destaque estão os cromossomos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolo. Barra 5 µm. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis para a tribo Ancistrini.

Subfamília	Tribo	Espécie	Local de Coleta	2n	NF	Fórmula cariotípica	Referência	
Hypostominae	Ancistrini	<i>Ancistrus cuiabae</i>	Pantanal (MT)	34	62	20m 8sm 6st	(1)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Purus” INPA-25625	Rio Purus (AM)	34♂	68	21m 11sm 2st	(2)	
					34♀	66	20m 12sm 2st	
		<i>Ancistrus</i> n sp. 1	Rio São Francisco (AC)	38	68	30m-sm 8st	(3)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Trombetas” INPA-25633	Rio Trombetas (PA)	38	73	22m 8sm 5st 3a	(2)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Balbina”	Córrego Barretinho (AM)	39♂	76	27m 10sm 2st	(4)	
					38♀	74	26m 10sm 2st	
		<i>Ancistrus</i> n sp. 1	Rio Vermelho (GO)	40♀	80	34m 6sm	(5)	
					39♂	78	33m 6sm	
		<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal (MT)	42	76	24m 10sm 8st	(6)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Vermelho” INPA-25628	Rio Demeni (AM)	42	78	26m 6sm 4st 6a	(2)	
		<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal (MT)	44	72	18m 10sm 8st 8a	(7)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Macoari” INPA-25629	Rio Branco (RR)	46	81♂	18m 11sm 6st 11a	(2)	
					46	82♀	18m 12sm 6st 10a	
		<i>Ancistrus ranunculus</i>	Rio Xingu, Altamira (PA)	48♂	76	20m 8sm 6st 14a	(8)	
					48♀	76	19m 9sm 6st 14a	
		<i>Ancistrus</i> n sp.2	Rio Betari (SP)	52	84	32m-sm 20st-a	(3)	
		<i>Ancistrus</i> n sp. 2	Rio Garuva (SC)	52	78	10m 16sm 12st 14a	(5)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Barcelos”	Rio Demeni (AM)	52♂	76	12m 12sm 4st 24a	(4)	
					52♀	75	11m 12sm 4st 25a	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Dimona” INPA-25631	Córrego Dimona (AM)	52	78	16m 8sm 2st 26a	(2)	
		<i>Ancistrus</i> sp. “Piagaçu”	Purus (AM)	52♂	76	14m 10sm 2st 26a	(8)	
					52♀	77	14m 11sm 2st 25a	
		<i>Ancistrus brevippinis</i>	Rio Forquetinha (RS)	52	80	14m 14sm 24st-a	(9)	
		<i>Ancistrus multispinnis</i>	Rio Itapocu (SC)	52	80	28m-sm 24st-a	(3)	
		<i>Ancistrus multispinnis</i>	Rio Maquiné (RS)	52	80	14m 14sm 24st-a	(9)	
		<i>Baryancistrus</i> aff. <i>niveatus</i>	Rio Xingu (PA)	52	100	16m 32sm 4a	(10)	
Hypostominae	Ancistrini	<i>Hemiancistrus</i> sp.	Rio Araguaia (MT)	52	92	20m 20sm 8st 4a	(11)	
		<i>Hemiancistrus punctulatus</i>	Rio Forquetinha, Rio Carreiro e Rio Maquiné (RS)	52	92	14m 26sm 12st-a	(9)	
		<i>Hemiancistrus spinosissimus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	100	26m 22sm 4st	(12)	
		<i>Hemiancistrus spilomma</i>	Rio Araguaia (MT)	52♀	98	25m 21sm 6st	(12)	
				52♂	98	24m 22sm 6st		
		<i>Panaque</i> cf. <i>nigrolineatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	98	26m 20sm 6st	(11)	
		<i>Peckoltia</i> sp. 2	Rio Jari (PA)	52	102	16m 16sm 18st 2a	(13)	

<i>Peckoltia vittata</i>	Rio Xingu (PA)	52	102	16m 20sm 14st 2a	(13)
<i>Peckoltia</i> sp. 1	Rio Jari (PA)	53	102	18m 26sm 6st 2a 1b	(13)

Número diploide ($2n$), número fundamental (NF), metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico-acrocêntrico (st-a).

Fonte: (1) Mariotto et al. (2009); (2) Oliveira et al. (2009); (3) Alves et al. (2003); (4) Oliveira et al. (2008); (5) Alves et al. (2006); (6) Mariotto e Myiazawa (2006); (7) Mariotto et al. (2004); (8) Oliveira et al. (2007); (9) Presente trabalho; (10) Souza et al. (2004); (11) Artoni e Bertollo (2001); (12) Oliveira et al. (2006); (13) Souza et al. (2009).

Referências Bibliográficas

ALVES, A. L. **Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial.** 2000. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae e Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, Italy, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.

ALVES, A. L. et al. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.

ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis en the Hypostominae and Ancistrinae. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 141, p. 1-80, 2004.

ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotrop. Ichthyol.**, v. 4, n. 4, p. 401-409, 2006.

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

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

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). **Braz. J. Genet.**, v. 1, p. 103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, v. 48, p. 1-12, 1983.

FERRARIS JR., C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1-628, 2007.

GOLD, J. R. et al. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **J. Fish Biol.**, v. 37, p. 563-575, 1990.

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

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

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

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

MAIA, T. P. A. et al. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyol. Res.**, v. 57, p. 209-213, 2010.

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C. S. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 299-304, 2006.

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

MARIOTTO, S. et al. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotrop. Ichthyol.**, v. 7, n. 4, p. 595-600, 2009.

OJIMA, Y.; UEDA, T. New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B.**, v. 54, p. 15-20, 1979.

- 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. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 4, n. 1, p. 93-97, 2006.
- OLIVEIRA, R. R. et al. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 5, n. 3, p. 301-306, 2007.
- 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. **Genetica**, v. 134, p. 243-249, 2008.
- OLIVEIRA, R. R. et al. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **J. Fish Biol.**, v. 75, p. 2209-2225, 2009.
- PACHECO, R. B. et al. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 8, n. 3, p. 667-671, 2010.
- PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L.R. et al. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 279-330.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- PIRES, L. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS A. L. Cytogenetic Characterization of *Geophagus brasiliensis* and Two Species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. **Folia biologica** (Kraków), v. 58, p. 1-2, 2010.
- PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO L. A. C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazil J. Genet.**, v. 11, p. 307-316, 1988.
- PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Is *Callichthys* Linné (Siluriformes, Callichthyidae) a monotypic genus? **Acta Amazonica**, v. 24, p. 311-314, 1993.

- REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 147, p. 277-299, 2006.
- ROSA, R. et al. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 7, n. 4, p. 601-605, 2009.
- SATO, L. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes: Tricomictoridae). **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, p. 45-50, 2004.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 27, p. 190-193, 1980.
- SCHAEFER, S. A. Relationships of *Lithogenes villosus* Eigenmann, 1909 (Siluriformes: Loricariidae): evidence from high-resolution computed microtomography. **Am. Mus. Novit.**, v. 3401, p. 1-55, 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**, v. 57, n. 3, p. 219-223, 2004.
- SOUZA, A. C. P. et al. Cytogenetic analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Comp. Cytogenet.**, v. 3, n. 2, p. 103-109, 2009.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- TRECO, F. R. et al. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 6, n. 1, p. 87-92, 2008.

CAPÍTULO II

Citogenética e Citotaxonomia de 10 espécies do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Loricariidae, Hypostominae) de diferentes bacias hidrográficas do Brasil

Resumo

O elevado número de espécies atualmente incluídas no gênero *Hypostomus*, aliada à ampla variabilidade intra e inter-específica na morfologia e padrão de coloração, tem resultado na proliferação de identificações erradas na literatura. A citogenética pode representar uma grande contribuição para a citotaxonomia das espécies de peixes especialmente aqueles com problemas taxonômicos. Neste trabalho foram analisadas 10 espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus* (*H. albopunctatus*, *H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H. hermanni*, *H. iheringii*, *H. mutuae*, *H. nigromaculatus*, *H. paulinus*, *H. regani* e *H. strigaticeps*). Todos os exemplares foram submetidos à coloração por Giemsa, impregnação por nitrato de prata, bandamento-C e coloração pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI. As análises cromossômicas realizadas neste presente trabalho, nas respectivas espécies de *Hypostomus* mostraram que a variação no número diploide foi de $2n=64$ a $2n=82$, com diferença nas fórmulas cariotípicas entre as espécies. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram múltiplas para a maioria das espécies analisadas, sendo observados diferentes fenótipos. Os resultados obtidos com o fluorocromo CMA₃ indicam que as RONs em todas as espécies são CMA₃⁺/DAPI⁻. O padrão de distribuição da heterocromatina também se mostrou diferente, sendo outro importante marcador para as espécies. Estas diferenças interespecíficas no cariótipo e bandamentos cromossômicos foram úteis para a análise citotaxonômica, que mostrou que espécies do gênero *Hypostomus* podem ser caracterizadas pela constância do número cromossômico básico.

Palavras chaves: Análises cariotípicas. Marcadores cromossômicos. Hypostomini. Localidade tipo.

Introdução

O elevado número de espécies atualmente incluídas no gênero *Hypostomus*, aliado à ampla variabilidade na morfologia e padrão de coloração, muitas espécies de *Hypostomus* apresentam uma grande semelhança morfológica impossibilita muitas vezes a separação de muitas das espécies de *Hypostomus* de suas congêneres sintópicas (MONTROYA-BURGOS, 2003; OYAKAWA et al., 2005; ZAWADZKI et al., 2008). Além disso, diversas espécies esperam ainda por uma descrição nominal, e as descrições disponíveis para várias espécies adicionadas ao gênero, muitas vezes são estudos com populações regionais (e.g. REIS et al., 1990; MAZZONI et al., 1994; OYAKAWA et al., 2005) ou revisões focadas apenas em subunidades monofiléticas do gênero (ARMBRUSTER, 2003; HOLLANDA CARVALHO; WEBER, 2005).

Hipóteses das relações filogenéticas de *Hypostomus* com base em dados moleculares revelaram que o gênero não forma um grupo natural (MONTROYA-BURGOS, 2003). Segundo esses autores, algumas espécies atualmente atribuídas a *Hypostomus* devem ser removidas do gênero. Outros estudos filogenéticos baseados em caracteres morfológicos (ARMBRUSTER, 2004) reforçam estas conclusões. Porém, apenas estes estudos não são suficientes, sendo necessário ampliar as análises filogenéticas para inferir algo sobre as relações entre as espécies de *Hypostomus*.

A utilização de dados citogenéticos no auxílio à taxonomia, área conhecida como citotaxonomia, caracteriza-se pela determinação e comparação do número de cromossomos em um grande número de espécies de um determinado táxon (STEBBINS, 1971; GUERRA, 2000). Desta maneira pode-se inferir o número cromossômico basal do grupo e determinar o comportamento evolutivo cromossômico ocorrido dentro do mesmo. Pode-se utilizar como recurso a citotaxonomia clássica, no caso de cariótipos similares, técnicas de diferenciação longitudinal cromossômica característico de cada espécie, como técnicas de bandamentos (bandas-C, -Ag, -CMA), hibridação fluorescente *in situ*, entre outras (GUERRA, 2000). Podem-se trazer informações valiosas para comparar espécies ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA et al., 1997).

Com relação aos estudos citogenéticos em Loricariidae, quando comparado com outras espécies, pertencentes ao gênero *Hypostomus* são as que apresentam uma grande diversificação cariotípica, variando de $2n=52$ para *H. emarginatus* (ARTONI; BERTOLLO,

2001) a 84 para *Hypostomus* sp. 2-rio Perdido NUP 4249 (CEREALI et al., 2008). A ocorrência de RONS múltiplas na posição terminal dos cromossomos é a mais comum entre as espécies do gênero (ARTONI; BERTOLLO, 2001); e com relação à composição e padrão de distribuição da heterocromatina em *Hypostomus*, foi observado que este grupo de peixes possui diferentes classes de heterocromatina, ricas em pares de bases AT e GC (ARTONI; BERTOLLO, 1999; KAVALCO et al., 2004; CEREALI et al., 2008), geralmente com blocos localizados nas regiões terminais e/ou intersticiais dos cromossomos.

Neste trabalho, o número cromossômico, localização de RONS e bandamento-C foram determinados em 10 espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus*, algumas até então não estudadas, como *H. commersoni*, *H. hermanni*, *H. iheringi* e *H. mutuae*. Também foram estudadas espécies coletadas em sua localidade tipo como *H. albopunctatus*, *H. hermanni*, *H. iheringii* e *H. paulinus*. Comparando-os com dados disponíveis da literatura para outras espécies do gênero, definindo o número diploide para cada espécie do gênero, bem como seus cromossomos marcadores.

Material e Métodos

Este estudo foi realizado com 150 exemplares do gênero *Hypostomus*, citados na Tabela 1. Os exemplares foram depositados na coleção do NUPELIA (Centro para Pesquisa em Ictiologia, Limnologia e Aqüicultura) da Universidade Estadual de Maringá. Os exemplares coletados em suas respectivas localidades tipo estão em destaque na Tabela 1.

Os cromossomos metafásicos foram obtidos pela técnica de Bertollo et al. (1978) e coloração com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8). Os cromossomos foram organizados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a). A distribuição da heterocromatina (bandamento-C) foi analisada de acordo com Sumner (1972), onde a coloração com Giemsa foi substituída por Iodeto de Propídeo. A coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONS) foi realizada de acordo com Howell e Black (1980). As bandas GC e AT-ricas foram detectadas com Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4 '6-diamidin-2-phenylindole (DAPI), respectivamente, de acordo com Schweizer (1980).

Resultados

Na análise convencional, *Hypostomus cochliodon*, apresentou um número diploide com 64 cromossomos, distribuídos em: $16m+20sm+28st-a$ (Fig. 1a). O nitrato de prata evidenciou até seis cromossomos marcados, localizados na região terminal do braço longo de três pares *st-a* e no braço curto de um par *st-a* (Fig. 1b e 5a). A heterocromatina estava distribuída na região terminal do braço longo de dois pares *st-a*, em um deles um grande bloco e associada às RONS (Fig. 3a).

Hypostomus commersoni, apresentou $2n=66$, $10m+16sm+40st-a$ (Fig. 1d). Pelo nitrato de prata as RONS foram evidenciadas nas regiões terminais do braço curto de um par *st-a* e braço longo de um cromossomo *st-a* (Fig. 1e e 5b). A heterocromatina estava distribuída na região terminal do braço longo de dois pares *st-a* (Fig. 3b).

Hypostomus hermanni $2n=72$ $8m+18sm+46st-a$ (Fig. 1g). A prata revelou até seis cromossomos, na região terminal do braço curto de três pares *st-a* (Fig. 1h e 5c). A heterocromatina encontrou-se distribuída nas regiões terminais e intersticiais de alguns cromossomos *st-a*, sendo em três pares, presente em blocos (Fig. 3c).

Hypostomus strigaticeps, com $2n=72$: $10m+16sm+46st-a$ (Fig. 1j). As RONS estavam localizadas na região terminal do braço longo de um par *st-a* (Fig. 1k e 5d). A heterocromatina estava distribuída na região terminal do braço longo de um par *st-a* e pericentromérica em um par *m-sm*, e associadas às RONS (Fig. 3d).

Hypostomus regani do rio Mogi Guaçu, $2n=72$, $10m+20sm+42st-a$ (Fig. 1m). as RONS estavam localizadas na região terminal do braço curto de até quatro cromossomos *st-a* (Fig. 1n e 5e). A heterocromatina estava distribuída na região pericentromérica de um par *sm* e associadas às RONS (Fig. 3e);

Hypostomus regani do rio Pirapitinga, $2n=72$, $12m+22sm+38st-a$ (Fig. 1p). A prata evidenciou quatro cromossomos marcados, na região terminal do braço curto de dois pares *st-a* (Fig. 1q e 5f). A heterocromatina estava distribuída na região intersticial do braço longo de alguns cromossomos *st-a*, e terminal no braço longo de um par *st-a* (Fig. 3f).

Hypostomus albopunctatus apresenta $2n=74$: $10m+20sm+44st-a$ (Fig. 2a). As AgRONS estavam presentes em até quatro cromossomos, na região terminal do braço curto de um par *st-a* e braço longo de um par *st-a* (Fig. 2b e 5g). A heterocromatina encontrou-se em um bloco intersticial (*st-a*) e provavelmente associada às AgRONS (Fig. 4a).

Hypostomus nigromaculatus possuiu $2n=74$, $8m+22sm+44st-a$ (Fig. 2d). A impregnação pelo nitrato de prata revelou um par portador das RONS, na região terminal do braço longo de um par $st-a$ (Fig. 2e e 5h). Heterocromatina foi observada na região terminal da maioria dos cromossomos $st-a$ e pericentromérica em alguns cromossomos (Fig. 4b).

Hypostomus paulinus possui $2n=76$: $6m+16sm+54st-a$ (Fig. 2g), As AgRONS estavam presentes em até quatro cromossomos na região terminal do braço longo de até dois pares $st-a$ (Fig. 2h e 5i) e com seis blocos heterocromáticos terminais no braço longo e quatro blocos intersticiais (Fig. 4c).

Hypostomus aff. *paulinus*, possui $2n=76$ em $8m+18sm+50st-a$ (Fig. 2j). As AgRONS estavam localizadas na região terminal do braço longo de até três cromossomos do tipo $st-a$ (Fig. 2k e 5j). A heterocromatina estava distribuída em bloco na região intersticial de um par $st-a$, terminal em um par $st-a$ e provavelmente associada às RONS (Fig. 4d).

Hypostomus iheringii $2n=80$: $8m+14sm+58st-a$ (Fig. 2m), seis cromossomos AgRONS na região terminal do braço curto de dois pares $st-a$ e braço longo de um par $st-a$ (Fig. 2n e 5k). E heterocromatina distribuída em blocos intersticiais e terminal em alguns cromossomos $st-a$, possivelmente nas AgRONS (Fig. 4e).

Hypostomus mutuae possui $2n=82$, $4m+18sm+60st-a$ (Fig. 2p). com as RONS localizadas na região terminal do braço longo de um par $st-a$ (Fig. 2q e 5l). A heterocromatina estava distribuída na região pericentromérica de um par m e associada às RONS (Fig. 4f);

O CMA₃ revelou marcações positivas, correspondentes ao número máximo de AgRONS e coincidindo com as mesmas posições em todas as espécies analisadas (Fig. 5), sendo estas negativas quando observadas com o DAPI (Fig. 1c, f, i, l, o, r e 2c, f, i, l, o, r).

Podem-se observar os cromossomos marcadores de cada espécie de *Hypostomus* resumidamente no idiograma da Figura 5.

Discussão

As análises cromossômicas realizadas nas 10 espécies de *Hypostomus* mostraram que a variação no número diploide é de $2n=64$ (*H. cochliodon*) a $2n=82$ (*H. mutuae*), os dados mostram também diferenças nas fórmulas cariotípicas entre as espécies que apresentam o mesmo número diploide, como *H. hermanni*, *H. strigaticeps* e *H. regani*.

Dados disponíveis na literatura mostram que na tribo Hypostomini a variação encontrada é de 52 a 84 cromossomos (Tabela 1). Quando são comparadas as características cromossômicas compartilhadas pelas espécies do gênero *Hypostomus*, percebe-se que estas parecem ter um comportamento de evolução cromossômica que difere das espécies analisadas das demais tribos de Hypostominae e das outras subfamílias de Loricariidae. A tendência evolutiva proposta para espécies neste gênero seria um aumento no número diploide, onde o rearranjo mais comum seria do tipo fissão cêntrica (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2006). Porém, os rearranjos cromossômicos do tipo inversões paracêntricas e pericêntricas podem ser também os responsáveis pela variação na fórmula cariotípica e número fundamental, observadas entre espécies que apresentam o mesmo número diploide.

Rubert et al. (2008) encontraram diferenças no NF (104 e 102) entre a população de *H. nigromaculatus* do rio Mogi Guaçu/SP ($2n=76$) e a população da bacia do rio Tibagi/PR ($2n=76$), as quais foram consideradas pelos autores como prováveis espécies crípticas. No presente trabalho, *H. nigromaculatus* ($2n=74$) do rio Pirapitinga/GO apresentou NF=104, resultado semelhante ao encontrado para os exemplares do rio Mogi Guaçu (localidade tipo), mas diferindo quanto ao número diploide (76 e 74, respectivamente). Analisando os cariótipos dessas duas populações, observa-se que a divergência entre elas, deve-se a um evento de fusões cêntricas, uma vez que os padrões de bandamento apresentado por ambas as populações foram idênticos. Neste caso, trata-se apenas de uma variação populacional da espécie *H. nigromaculatus*.

A população de *H. paulinus* analisada no presente trabalho (topótipo), apresentou 76 cromossomos, o mesmo observado por Rubert (2007), a população analisada por Michelle et al. (1977) apresentou $2n=74$. Sendo 76 o número apresentado pelo topótipo, pode-se considerar que o número diploide dessa espécie é 76, e os exemplares analisados por Michelle et al. (1977), devem corresponder a uma outra espécie, devido a problemas na identificação.

Trabalhos em distintas populações de espécies com um maior número de estudos, como, *Hypostomus albopunctatus* ($2n=74$), *H. ancistroides* ($2n=68$), *H. regani* ($2n=72$), *H. strigaticeps* ($2n=72$) e *H. cochliodon* ($2n=64$), o número diploide manteve-se constante, porém o que divergiu foram somente suas fórmulas cariotípicas (Tabela 1), indicando a possível ocorrência de rearranjos do tipo inversão pericêntrica, diferenças na condensação cromossômica ou mesmo trata-se apenas de divergência da medida entre diferentes autores. Assim sendo, com relação a estas espécies, podemos considerar o número

diploide como uma consistente ferramenta citotaxonômica, pois não foi observada ainda diferença quanto ao $2n$ de diferentes populações de uma mesma espécie.

Dados citogenéticos sugerem que o número diploide basal para os Loricariidae é 54, predominantemente com cromossomos do tipo m/sm (ARTONI; BERTOLLO, 2001), considerando uma das subfamílias basais, como Neoplecostominae, e grupos irmãos como Trichomycteridae (SATO et al., 2004) e Callichthyidae (PORTO; FELDBERG, 1993). Em *Hypostomus*, as únicas espécies que apresentam um número diploide basal mais próximo a este são *H. emarginatus* ($2n=52$) e *H. plecostomus* ($2n=54$). As demais espécies de *Hypostomus* apresentam um número diploide maior (Tabela 2). Montoya-Burgos (2003), analisando a filogenia de *Hypostomus* com dados mitocondriais sugere que, *H. emarginatus* estaria mais relacionado a representantes de outras tribos de Hypostominae (clado A) do que as espécies de *Hypostomus* (clado D). Considerando o $2n$ apresentado por esta espécie ($2n=52$), e comparando-o com o $2n$ apresentado pelos representantes da tribo Hypostomini, tanto o $2n$ quanto a análise mitocondrial, mostram que *H. emarginatus* está mais próximo das outras subfamílias, como Neoplecostominae ($2n=54$) e Hypoptopomatinae ($2n=54$), e das demais tribos de Hypostominae Pterygoplichthini e Rhineleporini (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2006).

Se levarmos em conta os problemas taxonômicos existentes nos Loricariidae, é possível que *H. plecostomus*, poderia não ter tido uma correta identificação, quando analisados os dados existentes na literatura quanto a análise citogenética. Neste caso, poderíamos considerar $2n=64$ o menor número $2n$ válido para *Hypostomus*, como observado em *Hypostomus* sp. G (ARTONI et al., 1998), *Hypostomus* sp. 1 (FENERICH et al., 2004), *Hypostomus cochliodon* (CEREALI et al., 2008; presente estudo) e *Hypostomus* sp. Xingu-1 (MILHOMEM et al., 2010).

Diferentes populações estudadas apresentaram semelhante padrão de RONS, como em *H. albopunctatus*, *H. paulinus*, *H. strigaticeps*, *H. regani* e *H. ancistroides* (ARTONI; BERTOLLO, 1996; CAMILO, 2004; ALVES et al., 2006; RUBERT, 2007; presente trabalho) podendo ser considerado um marcador cromossômico para as espécies.

A maioria das espécies de Loricariidae apresenta RONS simples, localizadas na região intersticial dos cromossomos, como observado em Neoplecostominae e Hypoptopomatinae (ALVES, 2005). O contrário é observado para Hypostomini, com base neste trabalho e em outros dados disponíveis na literatura, que revelam uma grande variabilidade interespecífica quanto à localização e número de RONS, localizadas

predominantemente na porção terminal dos cromossomos e adjacentes ou intercalares aos blocos de heterocromatina (ARTONI; BERTOLLO, 1999, KAVALCO et al, 2004, RUBERT et al., 2008).

Os resultados obtidos com o fluorocromo CMA₃ indicam que as RONS, em todas as espécies analisadas, são CMA₃⁺/DAPI \square , padrão encontrado na maioria dos peixes Neotropicais. Outros estudos em *Hypostomus* também relatam este mesmo padrão de RONS GC-ricas, além disso, é observado também que *Hypostomus* possui outras famílias de DNA repetitivo, onde algumas espécies apresentam blocos exclusivamente ricos em AT, ou CG, e outras podem apresentar cromossomos com regiões ricas em AT e cromossomos com blocos CG (ARTONI; BERTOLLO, 1999; KAVALCO et al., 2004; CEREALI et al., 2008; RUBERT et al., 2008; MILHOMEM et al., 2010).

Quanto à distribuição da heterocromatina, pode-se observar que as espécies ora analisadas apresentam uma distribuição preferencial nos segmentos terminais de cromossomos st-a, mas podendo também ocorrer em regiões centroméricas e intersticiais, fato este, já relatado para os Hypostomini (ARTONI; BERTOLLO, 1999; KAVALCO et al., 2004; RUBERT et al., 2008).

Artoni e Bertollo (1999) relacionam o acúmulo de heterocromatina com o aumento do número diploide, onde espécies com maior número cromossômico seriam derivadas e apresentariam uma maior quantidade de bandas-C positivas. Entretanto, os resultados observados no presente trabalho, para as espécies com $2n$ maior como *H. iheringii* ($2n=80$) e *H. mutuae* ($2n=82$) poucas regiões heterocromáticas foram observadas, sendo que em *H. nigromaculatus* ($2n=74$) foi a única que apresentou uma grande quantidade de heterocromatina, que provavelmente a relação entre $2n$ e quantidade de heterocromatina não tenham uma relação direta.

A heterocromatina é considerada um importante fator na diversificação cariotípica de peixes (OJIMA; UEDA, 1979) e tem sido um importante marcador para a caracterização e diferenciação de diversas espécies e populações com problemas taxonômicos, principalmente relacionados ao gênero *Hypostomus*, como é visto neste trabalho, espécies que apresentam o mesmo $2n$ apresentam diferença quanto ao padrão de distribuição de heterocromatina e posição de RONS (Fig. 5).

Analisando conjuntamente estas diferentes técnicas, podemos observar que cada espécie possui seus marcadores cromossômicos, os quais se encontram resumidos no Idiograma apresentado (Fig. 5). Estas diferenças interespecíficas no cariótipo e bandamentos

cromossômicos foram úteis para a análise citotaxonômica, que mostrou que espécies do gênero *Hypostomus* podem ser caracterizadas pela constância do número cromossômico básico e por seus cromossomos marcadores.

Os dados citogenéticos dos topótipos de algumas espécies estudadas no presente trabalho, viabilizou a análise citotaxonomica e permitirão estudos futuros de citotaxonomia do gênero *Hypostomus*.

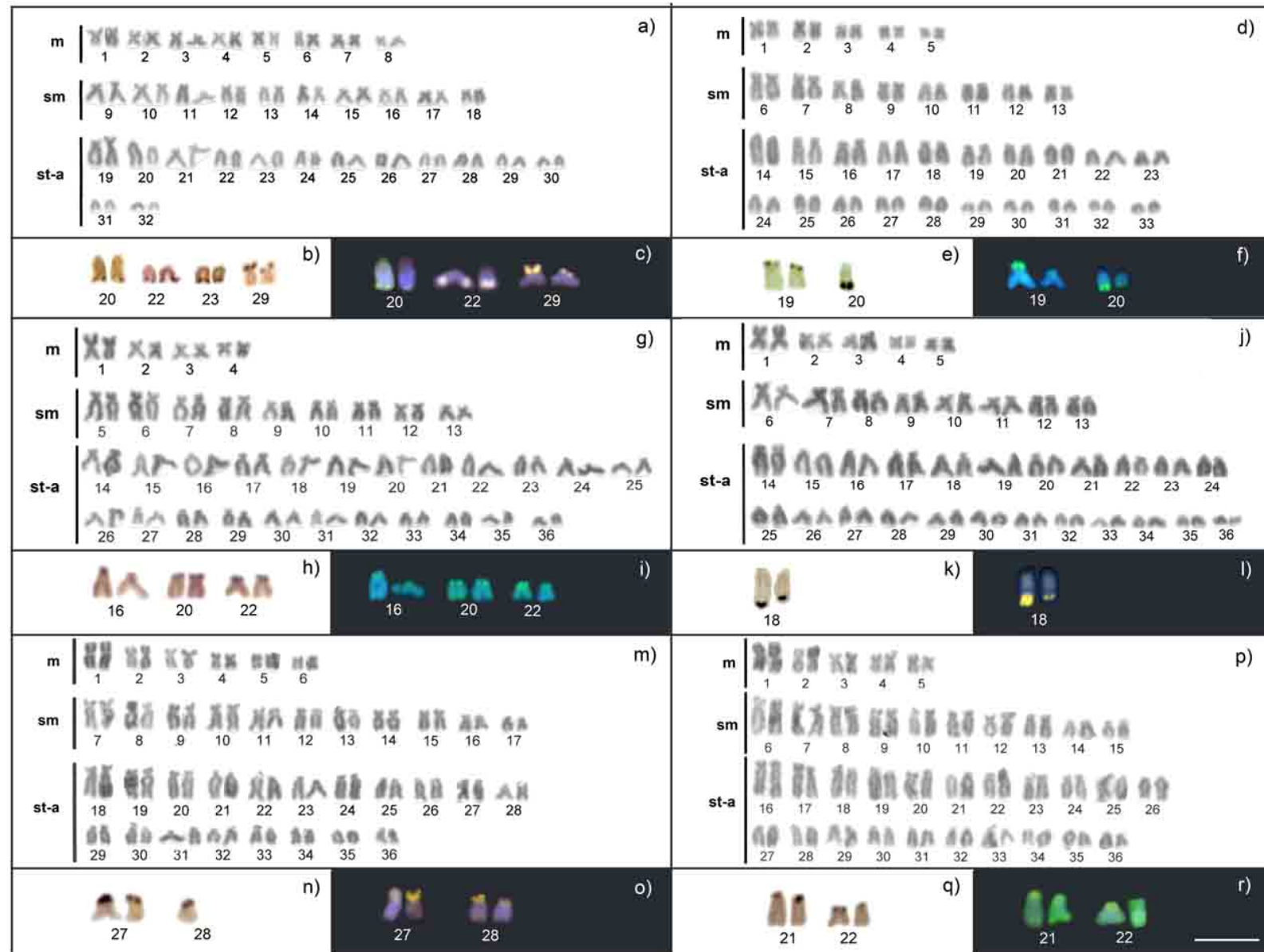


Figura 1 – Cariótipos corados por Giemsa de: a) *Hypostomus cochliodon*; d) *H. commersoni*; g) *H. hermanni*; j) *H. strigaticeps*; m) *H. regani* (rio Mogi Guaçu); p) *H. regani* (rio Pirapitinga). Nos boxes estão os cromossomos portadores das AgRONS (esquerda) e com coloração por CMA₃ (sobrepostos com DAPI) (direita) respectivamente às suas espécies. Barra 5 µm. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

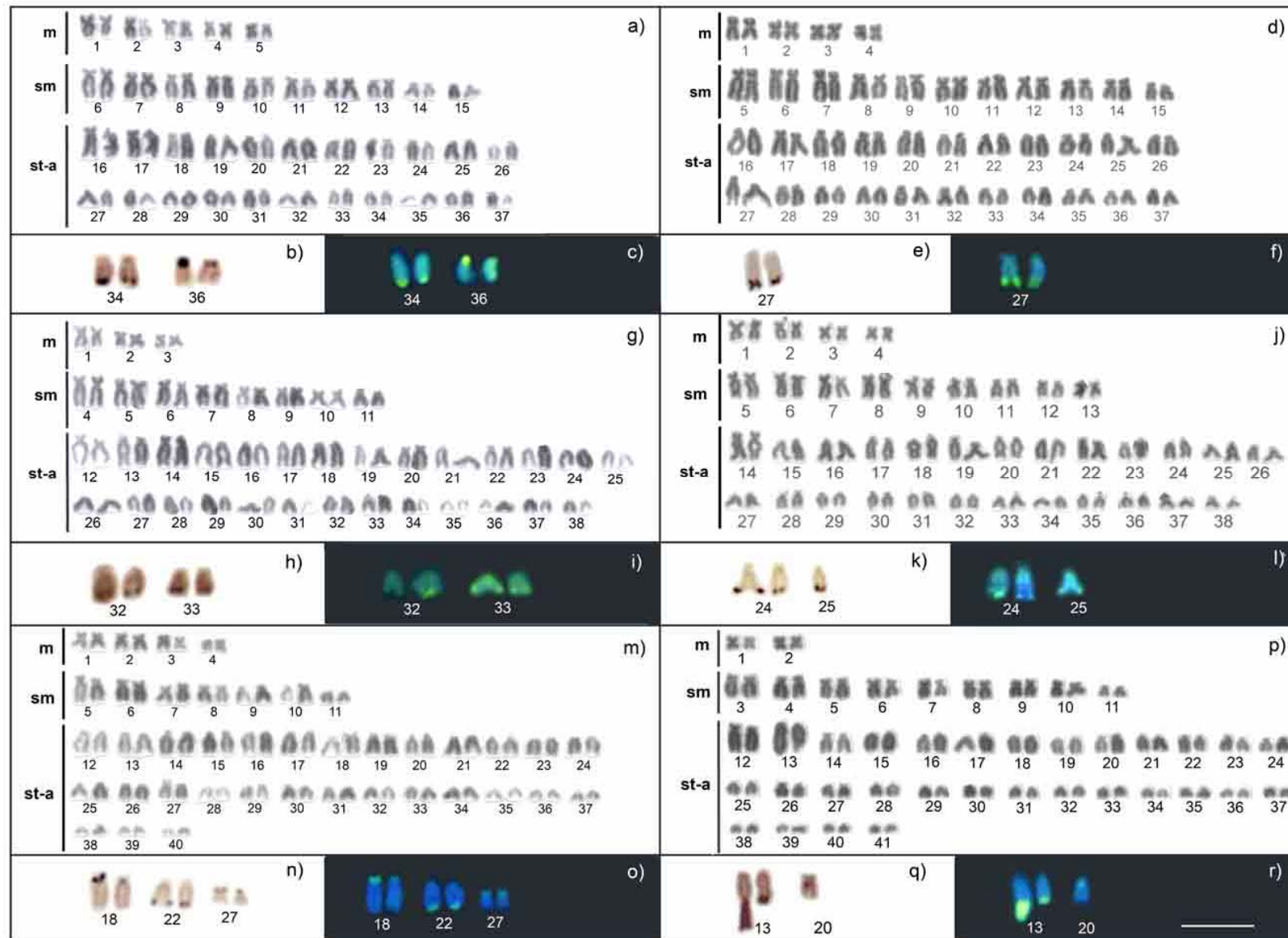


Figura 2 – Cariótipos corados por Giemsa de: a) *Hypostomus albopunctatus*; d) *H. nigromaculatus*; g) *H. paulinus*; j) *Hypostomus* aff. *paulinus*; m) *H. iheringii*; p) *H. mutuae*. Nos boxes estão os cromossomos portadores das AgRNAs (esquerda) e com coloração por CMA₃ (sobrepostos com DAPI) (direita) respectivamente às suas espécies. Barra 5 µm. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

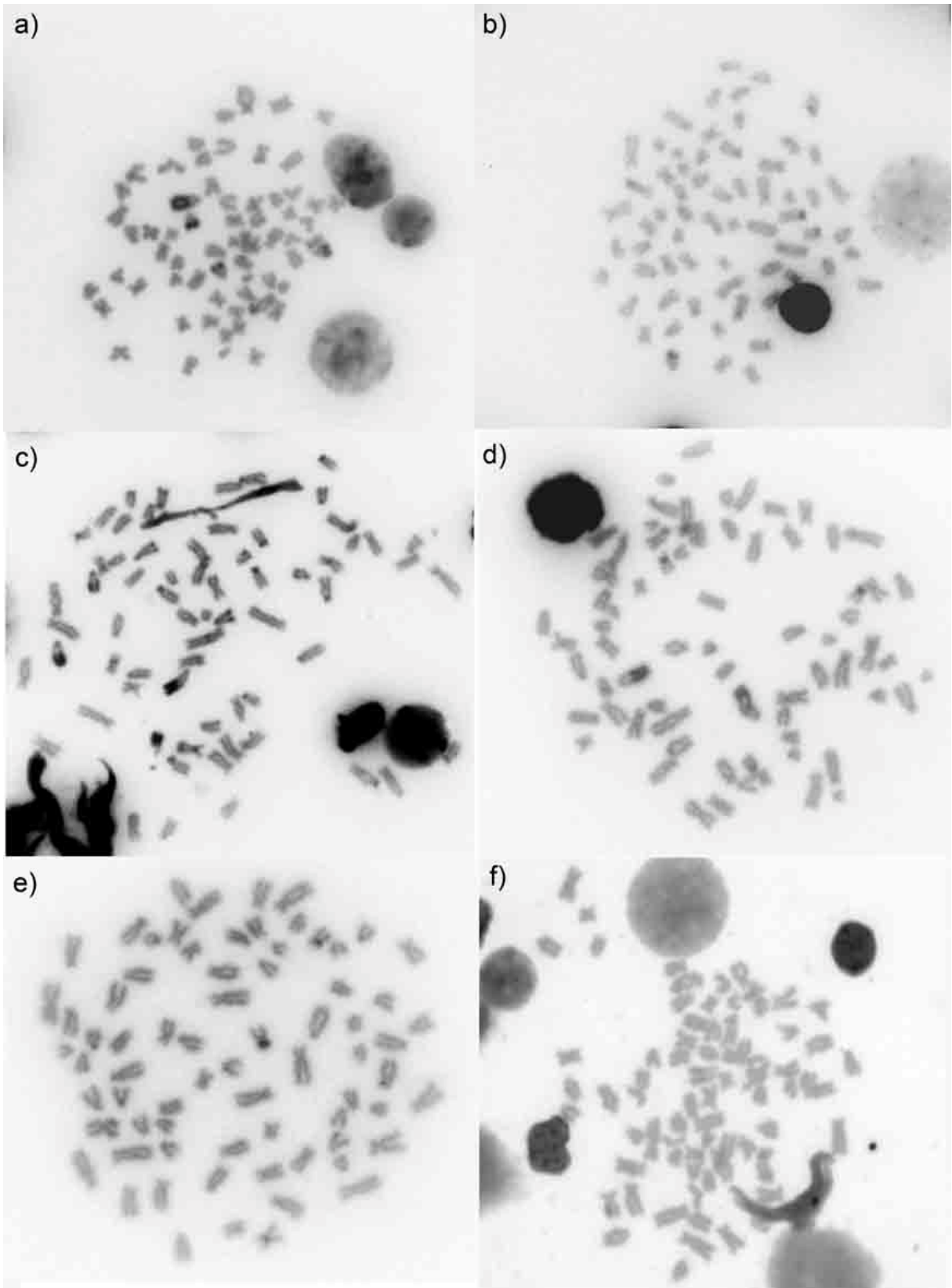


Figura 3 – Metáfases com bandamento-C coradas com Iodeto de Propídeo: a) *Hypostomus cochliodon*; b) *H. commersoni*; c) *H. hermanni*; d) *H. strigaticeps*; e) *H. regani* (rio Pirapitinga); f) *H. regani* (rio Mogi Guaçu). **Fonte:** Elaborado pela Autora.

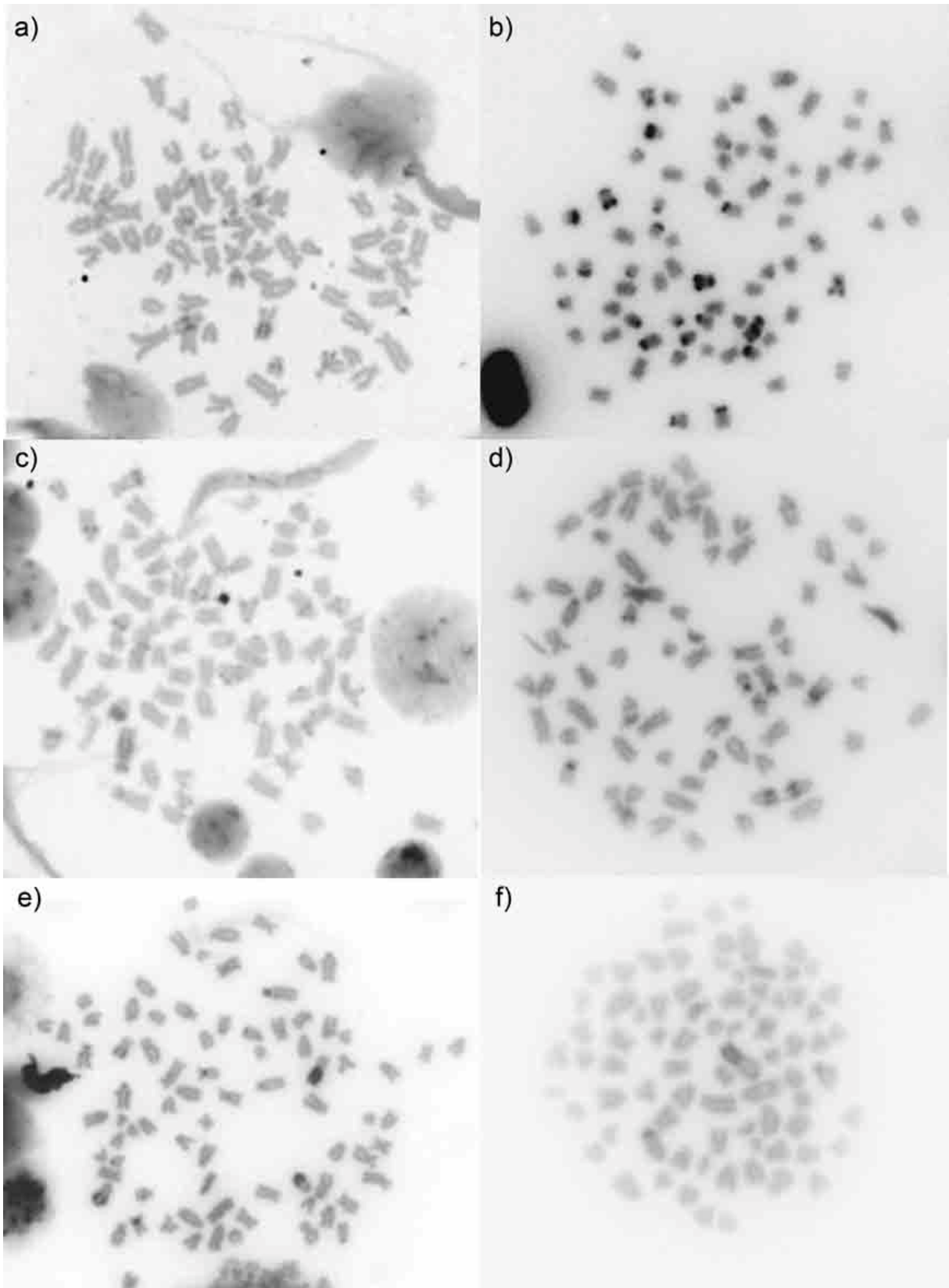


Figura 4 – Metáfases com bandamento-C coradas com Iodeto de Propídeo: a) *Hypostomus albopunctatus*; b) *H. nigromaculatus*; c) *H. paulinus*; d) *Hypostomus* aff. *paulinus*; e) *H. iheringii*; f) *H. mutuae*. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

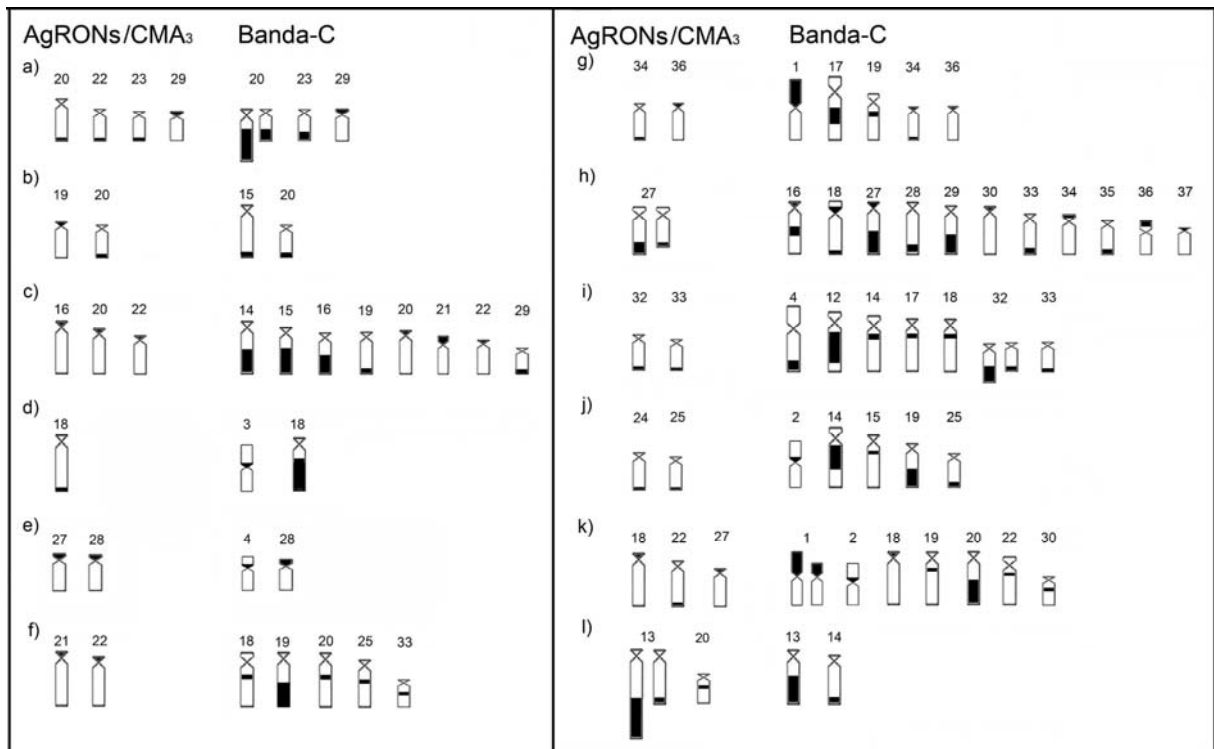


Figura 5 – Idiograma com os cromossomos marcadores das espécies de *Hypostomus* analisadas no presente trabalho, com impregnação por nitrato de Prata, CMA₃ e bandamento-C. a) *Hypostomus cochliodon*; b) *H. commersoni*; c) *H. hermanni*; d) *H. strigaticeps*; e) *H. regani* (rio Mogi Guaçu); f) *H. regani* (rio Pirapitinga); g) *H. albopunctatus*; h) *H. nigromaculatus*; i) *H. paulinus*; j) *Hypostomus* aff. *paulinus*; k) *H. iheringii*; l) *H. mutucaae*. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis para espécies da tribo Hypostomini.

Espécie	Local de coleta	2n	NF	FC	Autores
<i>Hypostomus emarginatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	98	16m 30sm 6st	(1)
<i>Hypostomus plecostomus</i>	—	54	90	24m 12sm 18st-a	(2)
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64	102	14m 24sm 26st-a	(3)
		64	103	15m 24sm 25st-a	(3)
<i>Hypostomus</i> sp.1	Rio Paranapanema (SP)	64	—	—	(4)
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	64♂	100	16m 20sm 28st-a	(5)
		64♀	97	16m 19sm 27st-a	(5)
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Rio Piraputanga (MT)	64	100	16m+20sm+28st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-1	Rio Xingu (PA)	64	96	16m 16sm 32st-a	(7)
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-2	Rio Xingu (PA)	66	98	18m 14sm 34st-a	(7)
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-3	Rio Xingu (PA)	65	102	15m 23sm 26st-a+1B	(7)
<i>Hypostomus affinis</i>	Córrego Jacuí (SP)	66	94	14m 14sm 38st-a	(8)
<i>Hypostomus commersoni</i>	Rio Forquetinha (RS)	66	92	10m+16sm+40st-a	(6)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	—	68	106	10m 28sm 30st-a	(9)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	68	102	16m 18sm 34st-a	(10)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Araquá (SP)	68	96	18m 10sm 12st 28a	(11)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	***	68	104	10m 26sm 32st-a	(12)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Piquiri (PR)	68	96	14m 14sm 40st-a	(13)
<i>Hypostomus macrops</i>	—	68	92	10m 14sm 44st-a	(9)
<i>Hypostomus</i> sp.2	Córregos Alambari e Jacutinga (SP)	68	—	—	(4)
<i>Hypostomus</i> sp. A	Córrego Rincão (SP)	70	102	18m 14sm 38st-a	(10)
<i>Hypostomus goyazensis</i>	Rio Vermelho (GO)	72	98	10m 16sm 10st 36a	(11)
<i>Hypostomus hermanni</i> **	Rio Piracicaba (SP)	72	98	8m+18sm+46st-a	(6)

<i>Hypostomus regani</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	102	10m 20sm 42st-a	(10)
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Araquá (SP)	72	102	12m 18sm 26st 16a	(11)
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Piumhi (MG)	72	116	8m 16sm 48st-a	(14)
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Jacutinga (PR)	72	100	10m 18sm 44st-a	(12)
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	102	10m+20sm+42st-a	(6)
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Pirapitinga (GO)	72	106	12m+22sm+38st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	102	12m 18sm 42st-a	(10)
<i>Hypostomus</i> sp. D1	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	108	10m 26sm 36st-a	(10)
<i>Hypostomus</i> sp. D2	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	106	14m 20sm 38st-a	(10)
<i>Hypostomus</i> sp. 3	Córrego Quinta e Edgardia, Rio Paranapanema (SP)	72	—	—	(4)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	—	74	86	8m 4sm 62st-a	(9)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	***	72	98	10m 16sm 46st-a	(12)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72	98	10m+16sm+46st-a	(6)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	74	104	10m 20sm 44st-a	(10)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio Piracicaba (SP)	74	104	10m 20sm 44st-a	(15)
<i>Hypostomus albopunctatus</i> **	Rio Piracicaba (SP)	74	104	10m+20sm+44st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	74	104	10m+20sm+44st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	74	102	8m+20sm+46st-a	(6)
<i>Hypostomus heraldoi</i> **	Rio Pirapitinga (GO)	74	102	8m+20sm+46st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> sp.2	Córrego Araras (MG)	74	106	10m 6sm 58st-a	(16)
<i>Hypostomus paulinus</i>	—	74	104	10m 20sm 44st-a	(9)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Rio Pirapitinga (GO)	74	104	8m+22sm+44st-a	(6)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	76	104	8m 20sm 48st-a	(17)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Ribeirão Três Bocas (PR)	76	102	6m 20sm 50st-a	(17)
<i>Hypostomus paulinus</i>	Ribeirão Três Bocas e Apertados (PR)	76	98	6m 16sm 54st-a	(12)

<i>Hypostomus paulinus</i> **	Rio Piracicaba	76	98	6m 16sm 54st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>auroguttatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	76	114	8m 30sm 38st-a	(10)
<i>Hypostomus</i> cf. <i>wuchereri</i>	Rios Mutum e Una (BA)	76	104	10m+18sm+48st-a	(18)
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	76	102	10m 16sm 50st-a	(19)
<i>Hypostomus</i> sp. 4	Rio Paranapanema; Córrego Hortelã (SP)	76	—	—	(4)
<i>Hypostomus</i> sp.1 ^a	Córrego Patos (MG)	76	106	6m 8sm 62st-a	(16)
<i>Hypostomus</i> sp.1b	Córrego Araras (MG)	76	106	6m 8sm 62st-a	(16)
<i>Hypostomus iheringii</i> **	Rio Piracicaba (SP)	80	102	8m+14sm+58st-a	(6)
<i>Hypostomus topavae</i>	Rio Piquiri (PR)	80	104	14m+10sm+56st-a	(13)
<i>Hypostomus</i> sp. E	Rio Mogi-Guaçu (SP)	80	104	8m 16sm 56st-a	(10)
<i>Hypostomus mutuae</i>	Rio Claro/Mutuca (MT)	82	104	4m+18sm+60st-a	(6)
<i>Hypostomus</i> sp. 3-córrego Salobrinha NUP 4247	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	82	102	6m 14sm 62st-a	(20)
<i>Hypostomus</i> sp. 2-rio Perdido NUP 4249	Rio Perdido (MS)	84	106	6m 16sm 62st-a	(20)

Legenda: **Topótipo, Número diploide (2n), número fundamental (NF), (FC) fórmula cariotípica, metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico-acrocêntrico (st-a).

Fonte: (1) Artoni e Bertollo (2001); (2) Muramoto et al. (1968); (3) Artoni et al. (1998); (4) Fenerich et al. (2004); (5) Cereali (2006); (6) Presente trabalho; (7) Milhomem et al. (2010); (8) Kavalco et al. (2005); (9) Michelle et al. (1977); (10) Artoni e Bertollo (1996); (11) Alves et al. (2006); (12) Rubert, 2007; (13) Bueno et al. (2011); (14) Mendes Neto et al. (2011); (15) Camilo (2004); (16) Mendes Neto (2008); (17) Rubert et al. (2008); (18) Bitencourt et al.(2011); (19) Artoni (1996); (20) Cereali et al. (2008).

Referências Bibliográficas

ALVES, A. L. **Análise da evolução da Família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) Com Base em Caracteres Cromossômicos e de Sequências de DNA**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

ALVES, A. L. et al. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.

ARMBRUSTER, J. W. The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 249, p. 1-60, 2003.

ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis in the Hypostominae and Ancistrinae. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 141, p. 1-80, 2004.

ARTONI, R. F. **Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus Lacépède (1803) (Pisces, Loricariidae, Hypostominae)***. 1996. 130 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Centro de 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**, v. 49, p. 81-90, 1996.

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

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

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

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). **Braz. J. Genet.**, v. 1: p. 103-120,

1978.

BITENCOURT, J. A. et al. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 9, n. 2, p. 317-324, 2011.

BUENO, V.; ZAWADZKI C. H.; MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Rev. Fish Biol. Fish.**, Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/tk033jn355703288/>>. Acesso em 12/08/2011.

CAMILO, F. M. **Estudos citogenéticos em algumas espécies de peixes da família Loricariidae pertencentes à bacia do rio Piracicaba**. 2004. 150 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CEREALI, S. S. **Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul**. 2006. 145 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

CEREALI, S. S. et al. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena. Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 7, p. 583-591, 2008.

FENERICH, P. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Nuclear DNA content in 20 species of Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi) from the Neotropical region. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, n. 3, p. 350-354, 2004.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: WILSON, K. L., MORRISON D. A. **Monocots - systematics and evolution**: Proceedings of the Second International Conference on the Comparative Biology of the Monocots. vol. 1. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 125–134.

GUERRA, M. et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Genet. Mol. Biol.**, v. 20, p. 489-496, 1997

HOLLANDA CARVALHO, P.; WEBER, C. Five new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the middle and lower Amazon System. **Rev. Suisse Zool.**, v. 4, p. 953-978, 2005.

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

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

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

MAZZONI, R.; CARAMASCHI, U.; WEBER, C. Taxonomical revision of the species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from lower rio Paraíba do Sul, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Suisse Zool.**, v. 101, n. 1, p. 3-18, 1994.

MENDES-NETO, E. O. **Estudos citogenéticos em algumas espécies de Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) da região de transposição do rio Piumhi para o rio São Francisco**. 2008. 136 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

MENDES-NETO, E. O. et al. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comp. Cytogen.**, v. 5, n. 2, p. 133-142, 2011.

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

MILHOMEM, S. S. R. et al. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comp. Cytogen.**, v. 4, n. 1, p. 45-54, 2010.

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

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

OJIMA, Y.; UEDA, T. New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B.**, v. 54, p. 15-20, 1979.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira do Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v. 921, p. 1-27, 2005.

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

REIS, R. E.; WEBER, C.; MALABARBA, L. R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Rev. Suis. Zool.**, v. 97, n. 3, p. 729-766, 1990.

RUBERT, M. **Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Hypostomus* (Loricariide, Hypostominae)**. 2007. 136 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotrop. Ichthyol.**, v. 6, n. 1, p. 93-100, 2008.

SATO, L. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes: Tricomictoridae). **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, p. 45-50, 2004.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 27, p. 190-193, 1980.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold Ltd, 1971. 468 p.

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

ZAWADZKI, C. H.; WEBER, C.; PAVANELLI, C. S. Two new species of *Hypostomus* Lacépède (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 6, n. 3, p. 403-412, 2008.

CAPÍTULO III

Mapeamento Cromossômico dos genes de RNAr 18S no gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). Análise da diversidade dos sítios

Resumo

Neste estudo foi utilizada a Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para se investigar a distribuição cromossômica do DNA ribossomal 18S (DNAr) em 10 espécies de diferentes populações de *Hypostomus* de várias bacias hidrográficas do Brasil. Foram observadas variações numéricas e de posição desses sítios entre as espécies estudadas. Os resultados foram similares aos obtidos pela análise das AgRONS, apresentando a mesma variabilidade interespecífica. Cada espécie apresentou um padrão de distribuição das RONS, o qual pode ser considerado um marcador citogenético para cada espécie do gênero.

Palavras chaves: Hypostomini. Hibridação Fluorescente *in situ*. RONS. DNAr. Marcadores cromossômicos.

Introdução

Nos eucariontes superiores, os genes de RNA ribossômico (RNAr) estão organizados em duas classes distintas, compostas por unidades repetidas em *tandem*, de centenas de milhares de cópias. A classe principal (RNAr 45 S) contém os genes de RNAr 18S, 5,8S e 28S, e uma classe secundária possui os genes de RNAr 5S (LONG; DAVID, 1980). Geralmente estes sítios estão localizados em pares cromossômicos distintos, e os sítios de DNAr 45S apresentam uma coincidência de localização com cromossomos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) o que não é visto com os sítios de DNAr 5S. Para a localização dos genes de RNA ribossômico nos cromossomos a Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é uma técnica que tem sido amplamente utilizada.

Nos peixes, a localização de *cistrons* de DNAr 45S é utilizada como um importante marcador citogenético, revelando grupos que caracteristicamente apresentam RONs simples (Curimatidae, Anostomidae, Parodontidae, Prochilodontidae e Cichlidae), e outros que apresentam RONs múltiplas (Sternopygidae, Characidae, Lebiasinidae, Erythrinidae e Callichthyidae) (MOREIRA FILHO et al., 1984; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 1985; GALETTI JR. et al., 1995). Estudos de localização cromossômica de RONs em Loricariidae, tem mostrado um único par cromossômico portador de RONs na maioria das espécies analisadas, porém a tribo Hypostomini é caracterizada por apresentar, na maioria das espécies, sítios múltiplos (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Dados disponíveis sobre a distribuição dos sítios ribossômicos para *Hypostomus* estão disponíveis apenas para *H. affinis*, com localização de sítios de DNAr 18S (KAVALCO et al., 2005) e para *H. regani*, com a utilização de sondas dos genes de RNAr 18S e 5S (MENDES-NETO et al., 2011).

Considerando o potencial do DNA ribossômico como marcador citogenético em peixes, este estudo teve como foco o mapeamento dos genes de RNA ribossômico 18S, pela Hibridização fluorescente *in situ* (FISH), em diferentes espécies de *Hypostomus* fornecendo novos dados sobre os cromossomos deste grupo de peixes, além de utilizar a impregnação por nitrato de prata, para analisar a variação no número e localização das Ag-RONs existente entre as espécies analisadas. Por meio da construção de uma idiograma adequado foi possível mapear os genes, detectar polimorfismo de RONs interespecífico e adicionalmente, RONs transcricionalmente inativas.

Material e Métodos

Este estudo foi fundamentado em 10 espécies do gênero *Hypostomus* coletadas em diferentes localidades de três bacias hidrográficas do Brasil, presentes na Tabela 1. Os exemplares foram depositados na coleção do NUPELIA (Centro para Pesquisa em Ictiologia, Limnologia e Aqüicultura) da Universidade Estadual de Maringá. Cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, utilizando a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram identificadas usando a técnica de impregnação pelo nitrato de prata (HOWELL; BLACK, 1980). Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi desenvolvida conforme Pinkel et al. (1986), com algumas modificações, utilizando sondas de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JR, 2004). As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation* seguindo as especificações do fabricante (Bionick - Invitrogen).

As lâminas com material foram incubadas com RNase (10mg/mL) 0,04% (RNase/2xSSC) em câmara úmida a 37°C. A desnaturação dos cromossomos foi realizada em formamida 70%/2xSSC de incubação por 4 min a 70°C. Em seguida foram adicionados a cada lâmina 50 µL da mistura de hibridização (100 ng de sonda marcada, formamida 50%, sulfato de dextrano 10%, 2xSSC) e a preparação foi deixada *overnight* a 37°C em câmara úmida. A Hibridação foi detectada com avidina-FITC (1:100). Os cromossomos foram contra corados com iodeto de propídio (50µg/mL) em meio de montagem DABCO + MgCl₂ 50mM.

Resultados

Em *Hypostomus cochliodon*, após a impregnação por nitrato de prata foram evidenciados até seis cromossomos portadores das AgRONs, com variação no número e localização destes sítios entre os exemplares analisados, sendo observada marcação na região terminal do braço longo de até quatro cromossomos st-a e/ou no braço curto de um par st-a (Fig. 1a), esta mesma variação interindividual foi observada com a técnica de FISH com a utilização de sonda de DNAr 18S (Fig. 1a').

Em *Hypostomus commersoni*, as AgRONS foram evidenciadas nas regiões terminais do braço curto de um par st-a e braço longo de um cromossomo st-a sem a presença de marcação em seu homólogo (Fig. 1b). Este mesmo número foi observado após a técnica de FISH (Fig. 1b').

Hypostomus hermanni revelou até seis cromossomos portadores das AgRONS, localizadas na região terminal do braço curto de três pares st-a (Fig. 1c). O número máximo também foi observado após a FISH (Fig. 1c').

Para *Hypostomus strigaticeps*, as AgRONS estão localizadas na região terminal do braço longo de um par st-a (Fig. 1d). Este par também apresentou marcação após a técnica de FISH (Fig. 1d').

Em *Hypostomus regani* do rio Mogi Guaçu, as AgRONS foram observadas presentes na região terminal do braço curto de até quatro cromossomos st-a menores (Fig. 1e), na FISH foi possível observar este mesmo número de cromossomos marcados (Fig. 1e').

Hypostomus regani do rio Pirapitinga, o nitrato de prata evidenciou até quatro cromossomos marcados, presentes na região terminal do braço curto de dois pares st-a maiores (Fig. 1f), e confirmadas pela FISH (Fig. 1f').

Hypostomus albopunctatus apresentou até quatro cromossomos portadores das AgRONS, presentes na região terminal do braço curto de um par st-a e braço longo de um par st-a, onde foi observada uma variação interindividual no número de sítios (Fig. 2a), esta mesma variação foi observada com a FISH (Fig. 2a').

Hypostomus nigromaculatus apresentou as AgRONS localizadas na região terminal do braço longo de um par st-a (Fig. 2b), mesmo número observado na FISH (Fig. 2b').

Hypostomus paulinus possuiu até quatro cromossomos marcados com o nitrato de prata (AgRONS), localizados na região terminal do braço longo de dois pares st-a (Fig. 2c), e este número também foi observado após a técnica de FISH (Fig. 2c').

Hypostomus aff. *paulinus*, as AgRONS estão localizadas na região terminal do braço longo de até três cromossomos do tipo st-a (Fig. 2d), na FISH foi observado apenas um par (st-a) com marcação (Fig. 2d').

Tabela 1 – Relação das espécies de *Hypostomus* estudadas no presente trabalho.

Espécie	Nº	Local de Coleta	2n	Fórmula Cariotípica
<i>Hypostomus cochliodon</i> (NUP 9723)	9	rio Piraputanga, Cáceres, MT (16°3'33"S/57°40'33"W)	64	16m+20sm+28st-a
<i>Hypostomus commersoni</i>	12	rio Forquetinha, Forquetinha, RS (29°21'43.5''/52°07'39.6''W)	66	10m+16sm+40st-a
<i>Hypostomus hermanni</i> (NUP 6410)	42	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07"S/47°39'19"W)	72	8m+18sm+46st-a
<i>Hypostomus regani</i>	13	rio Mogi Guaçu, Pirassununga, SP (21°55'37.7''S/47°22'02.63''W)	72	10m+20sm+42st-a
<i>Hypostomus regani</i> (NUP 4077)	3	rio Pirapitinga, Caldas Novas, GO (17°43'37"S/48°32'54"W)	72	12m+22sm+38st-a
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	4	rio Mogi Guaçu, Pirassununga, SP (21°55'37.7''S/47°22'02.63''W)	72	10m+16sm+46st-a
<i>Hypostomus nigromaculatus</i> (NUP 4079)	4	rio Pirapitinga, Caldas Novas, GO (17°43'37"S/48°32'54"W)	74	8m+22sm+44st-a
<i>Hypostomus albopunctatus</i> (NUP 6430)	29	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07"S/47°39'19"W)	74	10m+20sm+44st-a
<i>Hypostomus paulinus</i> (NUP 6411)	24	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07"S/47°39'19"W)	76	6m+16sm+54st-a
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	1	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07"S/47°39'19"W)	76	8m+18sm+50st-a
<i>Hypostomus iheringii</i> (NUP 6428)	3	rio Piracicaba, Piracicaba, SP (22°43'07"S/47°39'19"W)	80	8m+14sm+58st-a
<i>Hypostomus mutuae</i> (NUP 6642)	6	rio Claro/Mutuca, Chapada dos Guimarães, MT (15°20'13"S/55°53'45"W)	82	4m+18sm+60st-a

Legenda - número diploide (2n), metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico-acrocêntrico(st-a). **Fonte:** Elaborado pela Autora.

Em *Hypostomus iheringii* foi observado até seis cromossomos portadores das AgRONS, localizadas na região terminal do braço curto de dois pares st-a e no braço longo de um par st-a (Fig. 2e), os seis sinais foram observados na FISH, sem variação intraespecífica no número de sítios (Fig. 2e').

Hypostomus mutuae apresentou seus sítios de DNAr 18S localizados na região terminal do braço longo de um par st-a, o qual, apresenta um heteromorfismo de tamanho em relação ao seu homólogo, e marcação na região intersticial de um cromossomo st-a, sem apresentar esta marcação em seu homólogo, confirmando o mesmo padrão observado na impregnação pelo nitrato de prata (Fig. 2f e f').

Além das variações interespecíficas acima descritas para as 10 espécies analisadas, foi observada variação interindividual, tanto numérica quanto de atividade dos sítios das RONS, em *H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H. hermanni*, *H. albopunctatus* e *Hypostomus* aff. *paulinus*, resumidas na Figura 5.

Discussão

A impregnação pela prata é mais adequada para estudos da expressão das RONS, porque ela detecta apenas as RONS transcricionalmente ativas (GOODPASTURE; BLOOM, 1975; HOFGATNER et al., 1979; HOWELL; BLACK, 1980). Por meio da Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S, foi possível confirmar os resultados prévios obtidos pelo nitrato de prata, com a identificação de RONS múltiplas, para a maioria das espécies (Fig. 1 e 2), exceto para *H. strigaticeps*, *H. nigromaculatus* e *Hypostomus* aff. *paulinus* (Fig. 1d e 2b e d). RONS múltiplas também foram observadas nas espécies de *Hypostomus* anteriormente estudadas, porém, apenas com dados de AgRONS (ARTONI; BERTOLLO, 1996; 2001). Dados da literatura com a localização de sítios ribossomais por meio da FISH estão disponíveis apenas para *H. affinis* (KAVALCO et al., 2005) e *H. regani* (MENDES-NETO et al., 2011). *Hypostomus affinis* apresentou cinco sítios de DNAr 18S e em *H. regani*, foi observado apenas um par marcado, mesmo padrão apresentado pela impregnação por nitrato de prata em ambas as espécies.

Todas as espécies de *Hypostomus* analisadas até o presente momento, apresentam RONS localizadas na região terminal do braço longo e/ou braço curto de cromossomos do tipo st-a e, a maioria das espécies apresentaram vários sítios (ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO et al., 2005). Os experimentos com FISH revelaram heteromorfismo estrutural de tamanho de RONS entre os homólogos de *H. mutuae*, além da presença de uma marcação intersticial, que não é comum entre as espécies de *Hypostomus*. Este heteromorfismo de tamanho foi detectado tanto pelo nitrato de prata quanto pela FISH (Fig. 2f e f'), demonstrando corresponder a um aspecto estrutural dos cromossomos.

Vários fenótipos de RONS ocorrem entre as diferentes subfamílias de Loricariidae, onde, em uma das subfamílias consideradas basais, como Neoplecostominae, estes sítios estão localizados predominantemente na região intersticial de um cromossomo do tipo submetacêntrico (ALVES et al., 2005; KAVALCO et al., 2005), o que é observado também na maioria dos Hypoptopomatinae (ANDREATA et al., 2006, 2010), enquanto que a localização terminal é observada nas outras subfamílias, como Delturinae (KAVALCO et al., 2005), Loricariinae (ALVES et al., 2003; KAVALCO et al., 2005; PORTO et al., 2011) e Hypostominae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2006). Porém, a multiplicidade de RONS é uma característica dos representantes da tribo Hypostomini, mais especificamente

do gênero *Hypostomus* (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2006; RUBERT et al., 2011, presente trabalho). Estes dados corroboram o que foi sugerido por alguns autores para este gênero, no que se refere a um caminho carioevolucionário completamente distinto dos demais loricarídeos (ALVES et al., 2006).

Além da grande variação interespecífica de posição, localização e número de RONS, foi possível também observar neste trabalho, que algumas espécies apresentaram uma variação interindividual, tanto numérica quanto de atividade dos sítios das RONS, como observado em *H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H. hermanni*, *H. albopunctatus* e *Hypostomus* aff. *paulinus*, isso provavelmente seja devido a diferença na atividade das AgRONS ou em alguns casos, o nitrato de prata esteja impregnando regiões de proteínas acídicas que não sejam RONS, com relação a FISH, seja devido a problemas na detecção dos sítios, onde a maioria são muito pequenos, ou à rearranjos cromossômicos. Mudanças de posição das RONS durante a evolução tem sido muitas vezes atribuída a rearranjos cromossômicos (HALL; PARKER, 1995) do tipo inversão ou translocação, ou mesmo dispersão das RONS pelo genoma, devido a sua associação com sequências heterocromáticas, criando novos *loci* de DNAr. Uma vez que em peixes, as RONS estão na maioria das vezes, associadas com a heterocromatina (PENDÁS et al., 1993), isto pode tornar essas regiões cromossômicas mais suscetíveis a um *crossing-over* desigual (MAGGINI et al., 1991). Conseqüentemente durante o processo evolutivo, a quantidade de seqüências repetitivas pode ser modificada por duplicações e deleções, além de outros mecanismos, como elementos transponíveis adjacentes aos genes ribossômicos (SCHUBERT; WOBUS, 1985, CIOFFI et al., 2010).

Considerando que há poucos dados disponíveis para o gênero *Hypostomus*, sobre a localização dos genes ribossômicos, os dados ora obtidos são importantes para uma visão mais ampla da evolução do DNA ribossômico neste grupo.

De fato, *Hypostomus* apresenta uma grande diversidade, não só quanto ao número diploide e fórmula cariotípicas (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2006; RUBERT et al., 2011), mas também quanto à distribuição das RONS, evidenciando um caminho evolutivo distinto dos demais representantes das outras subfamílias de Loricariidae (MONTROYA-BURGOS, 2004), que podem ser devido a fatores intrínsecos apresentados pelo grupo, mas que ainda não foram evidenciados.

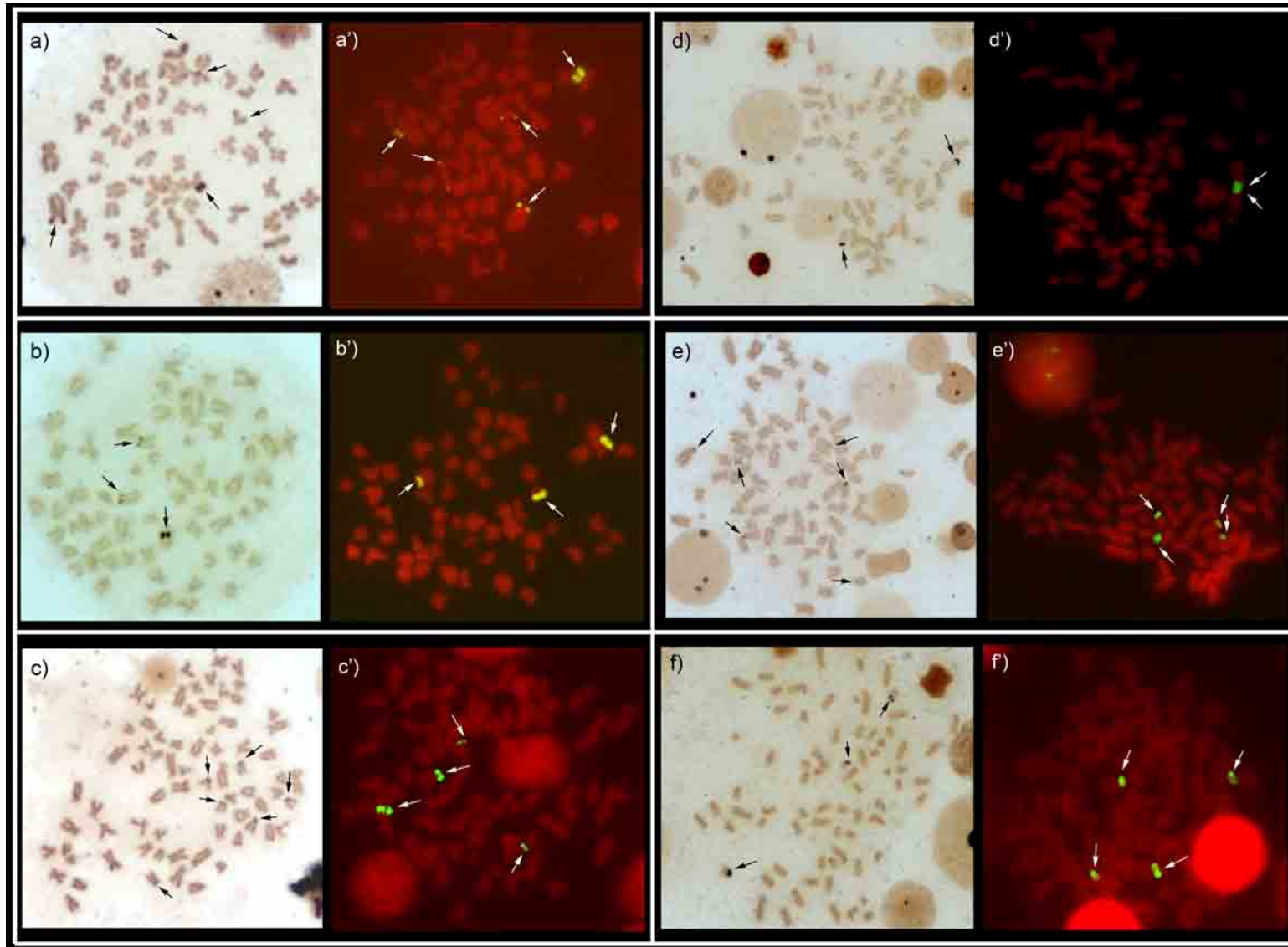


Figura 1 – Metáfases com impregnação por nitrato de prata (esquerda) e FISH (direita) em: **a)** e **a')** *H. cochliodon*; **b)** e **b')** *H. commersoni*; **c)** e **c')** *H. hermanni*; **d)** e **d')** *H. strigaticeps*; **e)** e **e')** *H. regani* (Pirapitinga); **f)** e **f')** *H. regani* (Mogi). As setas indicam os sítios de Ag-RONs e de DNAr 18S. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

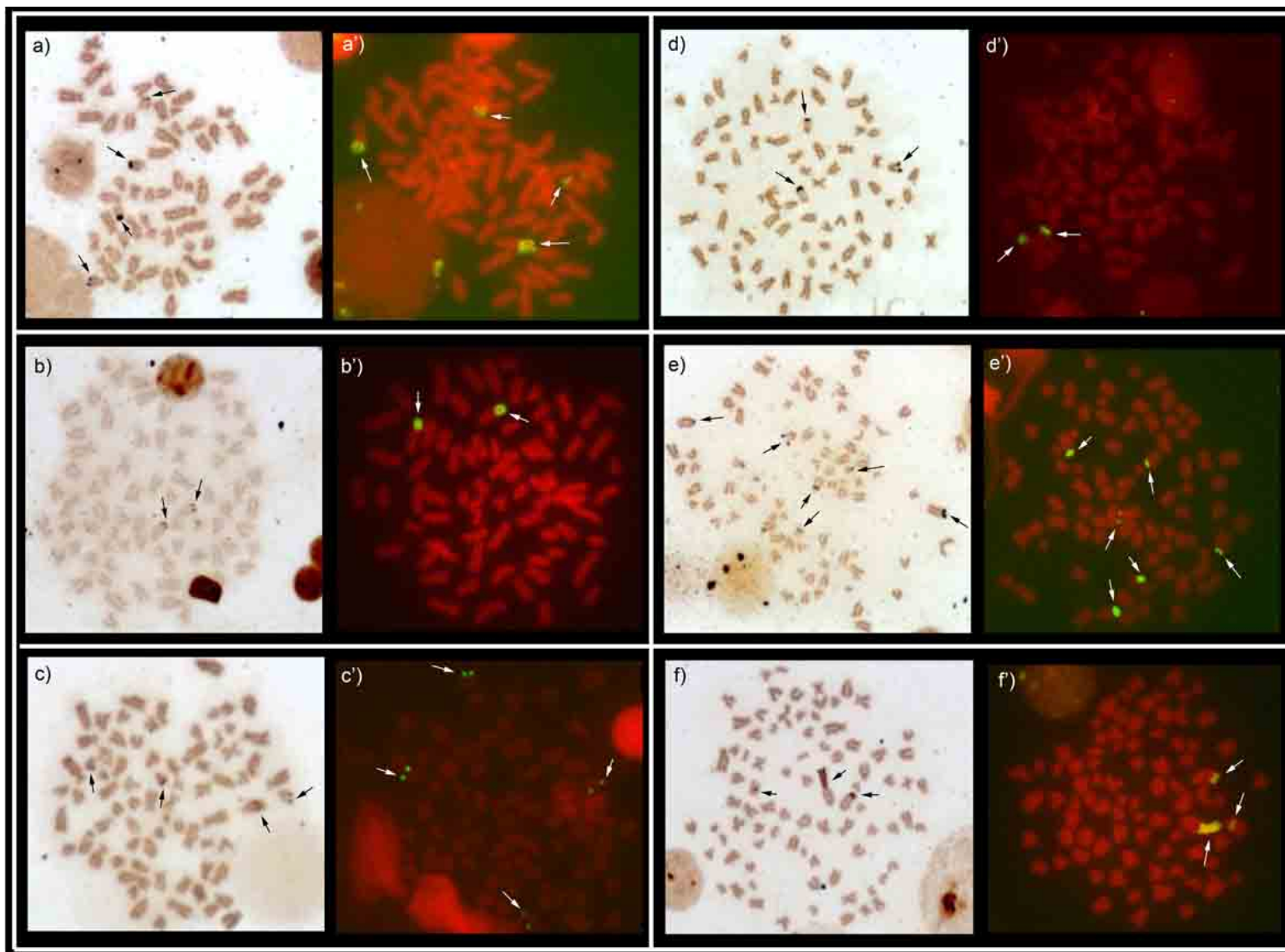


Figura 2 – Metáfases com impregnação por nitrato de prata (esquerda) e FISH (direita) em: **a)** e **a')** *H. albopunctatus*; **b)** e **b')** *H. nigromaculatus*; **c)** e **c')** *H. paulinus*; **d)** e **d')** *Hypostomus* aff. *paulinus*; **e)** e **e')** *H. iheringii*; **f)** e **f')** *H. mutuae*. As setas indicam os sítios de Ag-RONs e de DNAr 18S. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

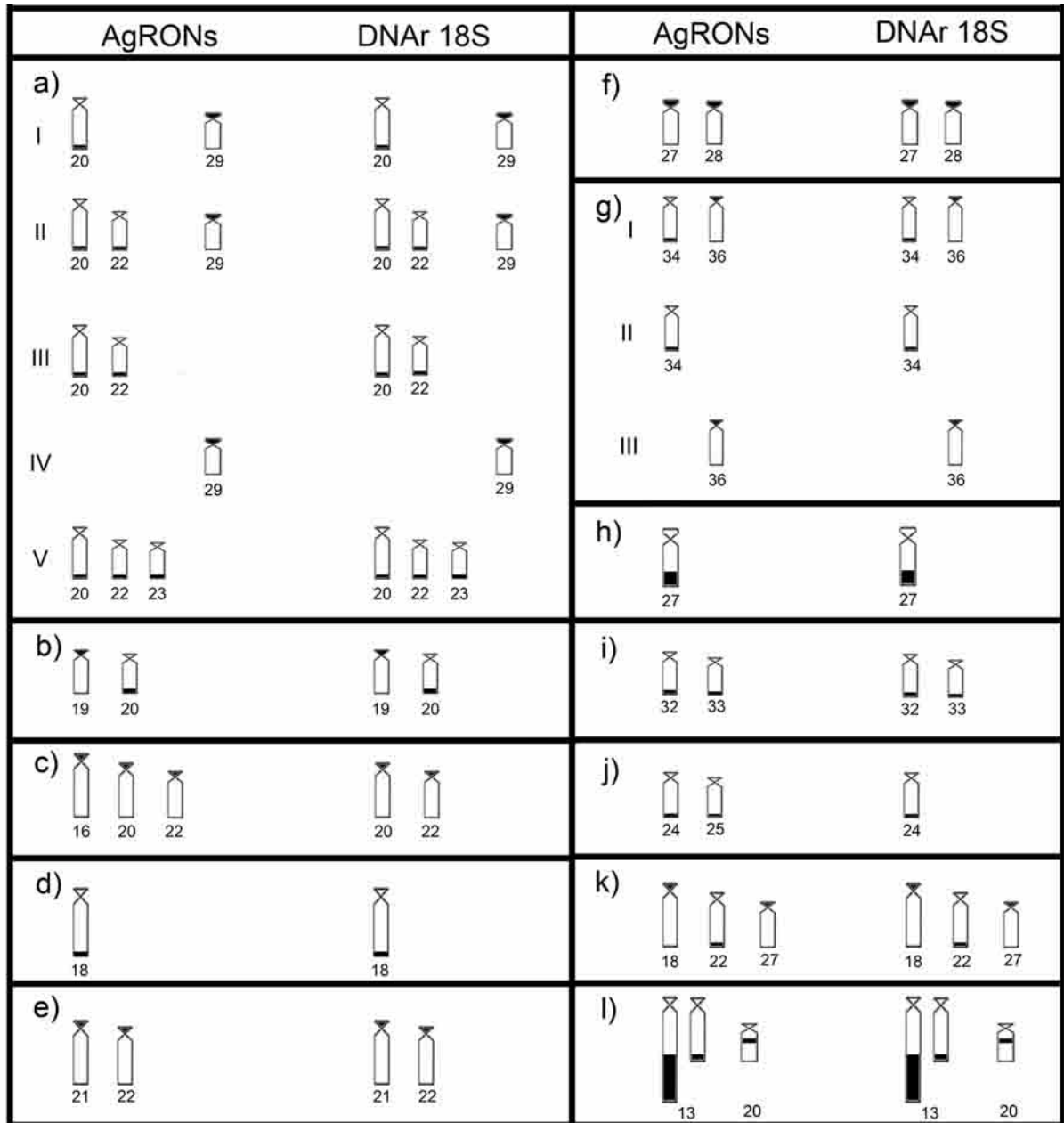


Figura 3 – Idiograma dos pares de cromossomos marcadores identificados pelas técnicas de impregnação por nitrato de prata (esquerda) e hibridação fluorescente *in situ* (direita) de: **a)** *H. cochliodon*; **b)** *H. commersoni*; **c)** *H. hermanni*; **d)** *H. strigaticeps*; **e)** *H. regani* (rio Pirapitinga); **f)** *H. regani* (rio Mogi Guaçu); **g)** *H. albopunctatus*; **h)** *H. nigromaculatus*; **i)** *H. paulinus*; **j)** *Hypostomus* aff. *paulinus*; **k)** *H. iheringii*; **l)** *H. mutuae*, observando a correspondência ou diferença entre o número e localização destes sítios em ambas as técnicas. Os números romanos indicam os diferentes padrões observados entre os indivíduos. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. As Regiões organizadoras de nucléolo em peixes. **Ciênc. Cult.**, v. 37, p. 448-453, 1985.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae e Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, Italy, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.

ALVES, A. L. et al. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.

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 basins. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, n. 1, p. 62-66, 2006.

ANDREATA, A. A. et al. Molecular cytogenetic study of heterochromatin in *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae). **Hereditas**, v. 147, p. 10-17, 2010.

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

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). **Braz. J. Genet.**, v. 1, p. 103-120, 1978.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evol. Biol.**, v. 10, p. 271, 2010

GALETTI JR., P. M. et al. Post-zygotic modifications and intra- and inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. **Chrom. Res.**, v. 3, p. 285-290, 1995.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, p. 37-50, 1975.

HALL, K. J.; PARKER, J. S. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. **Chrom. Res.**, v. 3, p. 417-422, 1995.

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

HOFGÄRTNER, F. J. et al. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. **Chromosoma**, v. 71, n. 2, p. 197-216, 1979.

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

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

LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 727-764, 1980.

MAGGINI, F. T. et al.. Structure and chromosome localization of DNA sequences related to ribosomal subrepeats in *Vicia faba*. **Chromosoma**, v. 100, p. 229-234, 1991.

MENDES-NETO, E. O. et al. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comp. Cytogen.**, v. 5, n. 2, p. 133-142, 2011.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 26, p. 564-568, 1984.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 63, p. 128-130, 1993.

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

PORTO, F. E.; CASTRO, A. L. B. P.; SANTOS, I. C. M. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. **Ichthyol. Res.**, v. 58, n. 3, p. 225-231, 2011.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, v. 92, p. 143-148, 1985

CAPÍTULO IV

ESTUDOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS COMPARATIVOS EM *Hypostomus albopunctatus* (REGAN, 1908) e *Hypostomus heraldoi* Zawadzki, Weber & Pavanelli, 2008 DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ

Resumo

Análises citogenéticas, moleculares e de morfometria foram realizadas em duas espécies morfológicamente semelhantes, *H. albopunctatus* (rio Piracicaba, SP) e *H. heraldoi* (rio Pirapitinga, GO), e em exemplares morfológicamente semelhantes a ambas as espécies (rio Mogi Guaçu, SP), a fim de buscar um marcador citogenético ou molecular que valide estas duas espécies. Os topótipos dessas espécies e a população do rio Mogi Guaçu foram submetidos a análise citogenética convencional, bandamentos cromossômicos (Ag-, bandamento-C, -CMA), localização de sítios de DNAr 18S pela Hibridação Fluorescente *in situ*, RAPD e sequenciamento do gene COI e morfometria. Todos os espécimes apresentaram $2n=74$ com $10m+20sm+44st-a$ para *H. albopunctatus* e $8m+20sm+46st-a$ para *H. heraldoi*, e ambas as fórmulas cariotípicas foram encontradas na população do rio Mogi Guaçu. Fenótipos variantes de AgRONS foram observados entre as três populações, confirmadas pela FISH. Quanto ao padrão heterocromático, *H. heraldoi* apresentou um bloco grande com heterocromatina intersticial, na região pericentromérica do primeiro par m e associada às AgRONS, para *H. albopunctatus* além deste padrão semelhante mais um par sm com um bloco terminal. Em exemplares do rio Mogi Guaçu a heterocromatina encontrou-se mais amplamente distribuída, presente nas regiões terminais e intersticiais de alguns cromossomos st-a. O fluorocromo CMA₃ revelou marcações positivas, possivelmente, correspondentes às AgRONS, sendo estas negativas ao DAPI. Os dendrogramas gerados para os marcadores RAPD e pelo sequenciamento do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) mostraram um padrão semelhante de distribuição dos espécimes analisados. Entretanto, todas as espécies puderam ser diferenciadas por suas sequências COI. As análises citogenéticas e moleculares associadas a dados de morfometria indicam que *H. heraldoi* do rio Pirapitinga e *H.*

albopunctatus do rio Piracicaba são, com segurança, duas espécies válidas. Por sua vez, os exemplares da população do rio Mogi Guaçu apresentam algumas características presentes em ambas as espécies, sendo mais próximos à *H. albopunctatus*, e provisoriamente denominadas como *Hypostomus* aff. *albopunctatus*.

Palavras chaves: Loricariidae. Siluriformes. Estudos cromossômicos. DNA *barcode*. RAPD. Medidas corporais.

Introdução

Hypostomus Lacépède, 1803 é o segundo gênero mais rico em espécies da ordem Siluriformes, com aproximadamente 130 espécies consideradas válidas (ZAWADZKI et al., 2010). Estas se distribuem desde a Costa Rica até a Argentina, estando presentes tanto em grandes rios quanto em pequenos riachos. São espécies bentônicas e sedentárias, agrupadas em pequenas populações com baixo fluxo gênico entre elas (ZAWADZKI et al., 2005). Outra característica importante observada neste grupo, é que a maioria das espécies apresenta uma habilidade de sobrevivência em diversos ambientes aquáticos Neotropicais (LOWE MCCONNELL, 1963; GARAVELLO; GARAVELLO, 2004). Ao nível taxonômico muitas espécies de *Hypostomus* ainda são desconhecidas, bem como as relações filogenéticas entre elas. Poucas espécies estão bem definidas, e as revisões existentes são limitadas e regionais (BOESEMAN, 1968; REIS et al., 1990; OYAKAWA et al., 2005).

Hypostomus albopunctatus (REGAN, 1908) é uma espécie que está distribuída por quase toda a bacia do Alto rio Paraná e sua localidade tipo é o rio Piracicaba, no estado de São Paulo (WEBER, 2003). *Hypostomus heraldoi* Zawadzki, Weber e Pavanelli, 2008, é encontrada somente na sub-bacia do rio Paranaíba, e sua localidade tipo é o rio Pirapitinga, afluente do rio Corumbá, no estado de Goiás.

Dados morfológicos e aloenzimáticos sugerem que *Hypostomus albopunctatus* e *H. heraldoi* são bastante semelhantes, sendo que, as características utilizadas na sua distinção envolvem, principalmente, o padrão de coloração e os dentes pré-maxilares. *Hypostomus heraldoi* apresenta pintas arredondadas escuras distribuídas sobre o corpo,

incluindo nadadeiras e geralmente possui mais dentes pré-maxilares. Por sua vez, *H. albopunctatus*, possui o corpo coberto por pintas claras e um número menor de dentes pré-maxilares. Até recentemente, *H. albopunctatus* era o único a apresentar o espinho da nadadeira peitoral igual ou menor que o espinho da nadadeira pélvica. Dados posteriores relataram essa mesma característica em *H. heraldoi*, que seria compartilhada por ambas as espécies (ZAWADZKI et al., 2008).

A identificação de indivíduos de uma mesma espécie, bem como a delimitação da mesma, é essencial para a compreensão da diversidade das espécies (DAYRAT, 2005). Tendo como finalidade auxiliar nos estudos taxonômicos e filogenéticos, um grande número de marcadores moleculares tem sido usado em estudos populacionais em peixes. Estes também vem sendo utilizados para estimar a variabilidade genética, a estrutura populacional e a introdução de indivíduos de cativeiro em populações naturais. Entre os marcadores moleculares mais usados estão: DNA *fingerprinting*, análise de RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), sequenciamento de gene nuclear e mitocondrial, microssatélites, análise de AFLPs (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). Junto com estes, podemos incluir o RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), e mais recentemente, os SNPs (Polimorfismo de base única) (PIORSKI et al., 2008).

Em peixes, o RAPD tem sido uma ferramenta útil como complemento para estudos de sistemática e filogenia (ALMEIDA et al., 2001; PRIOLI et al., 2002; BARMAN et al., 2003) e na análise da estrutura populacional (HATANAKA; GALETTI JR., 2003; ALMEIDA et al., 2003). As análises do sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI) tem sido utilizadas com muito sucesso na identificação de espécies de peixes (WARD et al., 2005; HUBERT et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente topótipos das espécies *H. heraldoi* e *H. albopunctatus*, com o auxílio de dados citogenéticos, aliados a um marcador molecular (RAPD), sequenciamento do gene COI e medições corporais, e compará-los com uma população do rio Mogi Guaçu, que apresentou morfologia e padrão de coloração intermediários que se sobrepõe as duas espécies. Com a finalidade de elucidar as relações taxonômicas e genéticas entre estas espécies.

Material e Métodos

Para os estudos citogenéticos, foram analisados 29 exemplares de *H. albopunctatus* coletados no rio Piracicaba (município de Piracicaba/SP), 22°43'10.12''S/47°39'21.49''W; dois exemplares de *H. heraldoi* procedentes do rio Pirapitinga, afluente do rio Corumbá, bacia do rio Paranaíba (município de Caldas Novas/GO), 17°43'27.16''S/48°34'08.97''W; e 40 espécimes de *Hypostomus* aff. *albopunctatus*, provenientes do rio Mogi Guaçu – Cachoeira de Emas (município de Pirassununga/SP) 21°55'37.7''S/47°22'02.63''W. Para o RAPD e sequências COI foram adicionadas as análises mais três espécies: *H. regani*, *H. margaritifer*, coletadas no rio Mogi Guaçu e *H. hermanni*, do rio Piracicaba. Amostras de tecidos foram retiradas dos exemplares após a captura, sendo mantidas a -20°C até seu uso. Os exemplares foram depositados na coleção do NUPELIA (Centro para Pesquisa em Ictiologia, Limnologia e Aqüicultura) da Universidade Estadual de Maringá, com os seguintes números de *voucher*: *H. albopunctatus* do rio Piracicaba (NUP 6430), *H. heraldoi* do rio Pirapitinga (NUP 5625).

Análise Citogenética. As metáfases foram obtidas pela técnica de suspensão celular (BERTOLLO et al., 1978). Os cromossomos foram organizados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a). A distribuição da heterocromatina seguiu Sumner (1972). A impregnação por prata das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foi feita de acordo com Howell e Black (1980). Para Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH), seguiu-se o protocolo de Pinkel et al. (1986), com modificações, com sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* Spix e Agassiz, 1829 (HATANAKA; GALETTI JR., 2004). As bandas ricas em GC e AT foram detectadas com os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4' 6-diamidin-2-phenylindole (DAPI), respectivamente, de acordo com Schweizer (1980).

Extração de DNA Genômico. O DNA genômico total foi extraído de músculo e purificado de acordo com o método de Sambrook et al. (1989).

Amplificação e Sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI). As sequências foram isoladas usando os *primers* F1 (5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3') e R1 (5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3') (Ward et al., 2005). A concentração final do *primer* foi de 5 µM, e as amplificações foram feitas por PCR (reação em cadeia da polimerase) em um volume total de

25 µL com 2,5µl de Tampão *Taq* 10X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4 e KCl 50 mM), 2,5µl de dNTPs (8mM), 2,25µl de MgCl₂ (50mM), 0,25µl de *Taq* Polimerase (5U/µl) (Invitrogen) e 1,25µl de *primers* (10µM), 2,0µl de DNA (50 ng/µl) e Água Milli-Q (q.s.p). Nesse processo foram realizados 35 ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 50°C, e 120 s a 72°C). Os produtos de PCR foram identificados em gel de agarose a 1% e purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo as especificações do fabricante. As reações de sequenciamento foram feitas com o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* e analisados em um *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems). As sequencias foram visualmente inspecionadas para erros de leitura, e editadas usando o programa Bioedit (HALL, 1999). Sequências consenso foram elaboradas para a COI de cada espécie, sendo estas depositadas no GenBank. Estas sequências foram alinhadas por *ClustalW*. A divergência das seqüências foi calculada usando o modelo de substituição Parâmetro-2 de Kimura (K2P), sendo o dendrograma construído pelo método Neighbor-Joining (NJ), com 1000 repeticoes de *bootstrap*, pelo Programa MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2007). O número de sítios polimórficos, a diversidade de nucleotídeos (pi), a composição de nucleotídeos e o número de transições e transversões entre as espécies foram determinados pelo DnaSp v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para o sequenciamento, além das três populações analisadas: *H. albopunctatus* (RPc), *H. heraldoi* (RPP) e indivíduos semelhantes do rio Mogi Guaçu (RMG), foram incluídas às análises mais três espécies: *H. regani* (RMG), *H. margaritifera* (RMG) e *H. hermanni* (RPc), a fim de observar o grau de diferenciação entre as espécies do gênero.

Seleção de *primers* e Análise de RAPD. Após o teste piloto, dez *primers* (OPX 12, 14, 15 e 19, OPC 8 e 11; OPW 6, 10, 17 e 20) foram selecionados, por apresentarem melhores resultados em termos de qualidade e quantidade de bandas geradas. As reações de amplificação, incluindo o controle negativo continham 0,3 µL de água destilada; 1,5 µL de Tampão 10x (100mM TrisHCl, pH 8,3; 500 mM KCl); 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM) (Invitrogen); 7,5 µL de MgCl₂ (10 mM); 2,0 µL de primer (4 µM) (Operon Technologies) e 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL), somando 13,0 µL de solução, mais 2 µL de DNA (5 ng/µL) de cada amostra. Foram realizados 40 ciclos de simplificação nas seguintes condições: 40s a 92°C, 90s a 40°C e 120s a 72°C. A eletroforese foi realizada em géis de agarose a 1,4%. Os dados foram tabulados em planilha eletrônica, sendo os fragmentos classificados como (1) presença e (0) ausência de banda. O Programa TRECON (Version 1.2 - VAN DE PEER; DE WACHTER, 1994) foi empregado para a construção de

um dendrograma de distâncias genéticas. O programa Structure 2.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003, 2007) foi empregado para determinar o número de populações (K) geneticamente distintas, conforme estabelecido por Falush et al. (2007). As simulações foram realizadas com 150.000 repetições pelo método Monte Carlo para a Cadeia de Markov (MCMC) após um período de *burning* de 50.000 repetições. As simulações para K variou de 1 a 10 sendo realizadas 10 repetições para cada valor de K sugerido. Utilizou-se, neste caso, o modelo de não mistura e a opção de frequências alélicas não correlacionadas sem determinar, *a priori*, a origem dos indivíduos. A escolha do número mais provável de populações inferidas se deu a partir da estatística ΔK (EVANNO et al., 2005).

Análises Morfométricas: um total de 48 espécimes foi medido: 19 exemplares de *H. heraldoi*, do rio Pirapitinga/GO, 11 de *H. albopunctatus* do rio Piracicaba/SP e 18 exemplares de *Hypostomus* aff. *albopunctatus* do rio Mogi Guaçu/SP. A metodologia e a terminologia das medições foram feitas como descrito por Boeseman (1968), modificado por Weber (1985). Todas as medições foram tomadas ponto a ponto com paquímetro digital (0,1 mm). As análises das medidas foram realizadas pelo programa PAST, analisando os componentes principais e pelo programa SHEAR, levando em consideração somente os componentes que apresentam maior peso na diferenciação entre as populações.

Resultados

Análise Citogenética. Foram analisados os topótipos de *H. albopunctatus* e *H. heraldoi*, juntamente com alguns exemplares coletados no rio Mogi Guaçu, que apresentavam semelhanças no padrão de coloração e morfologia, ora de *H. albopunctatus*, ora *H. heraldoi* ou de ambas. As duas espécies analisadas apresentaram número diploide com 74 cromossomos, porém com diferenças nas fórmulas cariotípicas: $10m+20sm+44st-a$ para *H. albopunctatus* do rio Piracicaba (RPc) (Fig. 1a) e $8m+20sm+46st-a$ em *H. heraldoi* do rio Pirapitinga (RPp) (Fig. 1e). Ambas as fórmulas cariotípicas foram observadas nos exemplares analisados do rio Mogi Guaçu (Fig. i e m). Na impregnação por nitrato de prata, *H. albopunctatus* (RPc) apresentou até quatro cromossomos portadores das AgRONS, na região terminal do braço curto de um par st-a e braço longo de um par st-a (Fig. 1b); *H. heraldoi* (RPp) apresentou apenas um par (st-a) na região terminal do braço longo (Fig. 1f). Nos

exemplares do rio Mogi Guaçu foram evidenciados até seis cromossomos, localizados na região terminal do braço curto de dois pares st-a e braço longo de um par st-a (Fig. 1j e n). Todos os sítios AgRONS foram confirmados pela FISH, com exceção da população do rio Mogi Guaçu a qual, apresentou apenas quatro marcações (Fig. 1d, h, l e p). O CMA₃ revelou marcações positivas, possivelmente, correspondentes às AgRONS, sendo estas negativas quando observadas com o DAPI (Fig. 1c, g, k e o). *Hypostomus albopunctatus* apresentou um bloco grande com heterocromatina intersticial, um bloco terminal no braço longo de um par sm, pericentromérica no primeiro par m, e provavelmente associada às AgRONS (Fig. 2a). Em *H. heraldoi* na região pericentromérica do primeiro par m, um bloco intersticial em um par st-a e provavelmente associada às AgRONS (Fig. 2b), em *Hypostomus* aff. *albopunctatus*, a heterocromatina encontra-se mais amplamente distribuída, nas regiões terminais braço longo e braço curto de alguns cromossomos st-a, um par st-a com um bloco intersticial, pericentromérica no primeiro par m e provavelmente associada às AgRONS (Fig. 2c e d).

Sequenciamento do gene mitocondrial. A região mitocondrial mostrou seqüências muito distintas para cada uma das espécies analisadas. Fragmentos de 680 pb do gene COI de 40 indivíduos, dos quais, 47 sítios mostraram-se polimórficos (diversidade de nucleotídeos $P_i = 0.021$), com 49 mutações, 37 sítios de informação parcimoniosa e 633 sítios invariáveis (monomórficos). Dezesesseis haplótipos foram observados, com um valor de diversidade dos haplótipos (H_d) de 0.890. Algumas espécies apresentaram apenas um haplótipo, como *H. heraldoi*, *H. margaritifera* (REGAN, 1908) e *H. hermanni* (IHERING, 1905). Porém, três espécies continham mais de um haplótipo, sendo que nenhum deles foi compartilhado com outra população. Cinco haplótipos foram observados em *H. regani* (IHERING, 1905), quatro na população do rio Mogi Guaçu, *Hypostomus* aff. *albopunctatus* e quatro em *H. albopunctatus* (RPC) (Fig.3a).

Nenhuma deleção, inserção, ou *stop codons* foram observados, constituindo seqüências de COI mitocondrial funcionais. Todas as seqüências amplificadas foram de 680 pb de tamanho, o limite observado contra a presença de NUMTs (DNA nuclear mitocondrial), que são geralmente menores que 200 pb (ZHANG; HEWITT, 1996) e até o momento não foram relatadas em Actinopterygii (BENSASSON et al., 2001).

Com relação à composição de nucleotídeos nas populações analisadas, todos os grupos apresentaram praticamente a mesma composição de nucleotídeos, com uma média de frequências de 32,0% (A), 24,0% (T/U), 19,0% (C) e 25,0% (G) (Anexo I).

A variação de nucleotídeos intrapopulacional observada foi de 0,73% para *H. regani* (RMG), 0,59% para a população do rio Mogi Guaçu e *H. albopunctatus* (RPc); 0,15% em *H. margaritifer* (RMG) e 0,00% para *H. heraldoi* (RPp) e *H. hermanni* (RPc). Enquanto, as maiores variações entre as populações foram de 5,00% entre *H. regani* e a população do rio Mogi Guaçu, e a menor foi vista entre *H. regani* (RMG) e *H. hermanni* (RPc) e entre *H. albopunctatus* (RPc), *H. heraldoi* (RPp) e população do rio Mogi Guaçu, de 1,62% (Tabela 1). A média das diferenças genéticas dentro das espécies foi baixa, com uma média da distância K2P de 0,34% e a média das distâncias interespecies foi de 3,18%.

No dendrograma Neighbor Joining (NJ), gerado para as sequencias COI foi possível reconhecer seis clados distintos, sendo quatro deles com um valor de *bootstrap* superior a 90%. Os maiores valores encontrados foram de 100% entre *H. regani* e *H. hermanni* (RPc), 95% para *H. albopunctatus* (RPc) e *H. heraldoi* (RPp) e 92% entre *H. regani* e *H. margaritifer*. Entre os exemplares do rio Mogi Guaçu e os espécimes de *H. heraldoi* (RPp) esse valor foi cerca de 55% (Fig. 3a).

Tabela 1 - Análise da diversidade de nucleotídeos inter e intrapopulacional entre as espécies analisadas

Interespecifica		Intraespecifica	
<i>H. regani</i> (RMG) X <i>H. margaritifer</i> (RMG)	4,11%	<i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i> (RMG)	0,59%
<i>H. regani</i> (RMG) X <i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i> (RMG)	5,00%	<i>H. albopunctatus</i> (RPc)	0,59%
<i>H. regani</i> (RMG) X <i>H. albopunctatus</i> (RPc)	4,70%	<i>H. heraldoi</i> (RPp)	0,00%
<i>H. regani</i> (RMG) X <i>H. heraldoi</i> (RPp)	4,85%	<i>H. margaritifer</i> (RMG)	0,15%
<i>H. regani</i> (RMG) X <i>H. hermanni</i> (RPc)	1,62%	<i>H. regani</i> (RMG)	0,00%
<i>H. margaritifer</i> X <i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i> (RMG)	2,35%	<i>H. hermanni</i> (RPc)	0,73%
<i>H. margaritifer</i> (RMG) X <i>H. albopunctatus</i> (RPc)	2,20%		
<i>H. margaritifer</i> (RMG) X <i>H. heraldoi</i> (RPp)	2,20%		
<i>H. margaritifer</i> (RMG) X <i>H. hermanni</i> (RPc)	3,38%		
<i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i> (RMG) X <i>H. albopunctatus</i> (RPc)	1,76%		
<i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i> (RMG) X <i>H. heraldoi</i> (RPp)	1,62%		
<i>Hypostomus</i> aff. <i>albopunctatus</i> (RMG) X <i>H. hermanni</i> (RPc)	4,11%		
<i>H. albopunctatus</i> (RPc) X <i>H. heraldoi</i> (RPp)	1,62%		
<i>H. albopunctatus</i> (RPc) X <i>H. hermanni</i> (RPc)	3,97%		
<i>H. heraldoi</i> (RPp) X <i>H. hermanni</i> (RPc)	4,26%		

Fonte: Elaborado pela Autora.

Análise de RAPD. As amplificações resultaram em 126 *loci*, variando em tamanho de 2000 a 200 pb. As bandas mais evidentes foram combinadas em uma matriz de

dados binários de presença e ausência. Várias simulações foram feitas agrupando-se os diferentes exemplares para os cálculos de fluxo gênico, distância e identidade genética.

As diferentes simulações realizadas com o programa Structure (Versão 2.2.3) para os marcadores RAPD indicaram que o modelo mais resolutivo foi o de mistura independente, sendo estabelecidas $K = 4$ populações geneticamente distintas, de acordo com os critérios definidos por Evanno et al. (2005) para a escolha desse parâmetro (Anexo-3). Os exemplares coletados no rio Mogi Guaçu, foram agrupados em três populações distintas. Duas delas correspondem exatamente às espécies morfológicamente identificadas como *H. regani* e *H. margaritifera*. A terceira população contém indivíduos conjuntamente identificados como *H. heraldoi*, *H. albopunctatus*, e como “híbridos” de ambas as espécies. Porém, nenhum dos exemplares examinados nesse, parece ser um híbrido verdadeiro. Isso é corroborado pelo baixo valor do parâmetro α (0.0262). Isso indica que cada indivíduo analisado é proveniente de uma das quatro populações distintas estabelecidas na análise. A quarta população agrupa os exemplares de *H. albopunctatus* do rio Piracicaba (RPc) e *H. heraldoi* do rio Pirapitinga (RPp). Porém, com relação a esses últimos, eles foram os únicos exemplares que demonstraram possuir uma contribuição genética ancestral elevada de duas populações diferentes. Nesse caso, eles parecem ter 77% de contribuição genética de *H. albopunctatus* (RPc) e 23% dos espécimes do rio Mogi Guaçu, classificados como *H. albopunctatus*, *H. heraldoi* ou híbridos dos dois. Por outro lado, os espécimes do rio Mogi Guaçu formam um agrupamento genético distinto de *H. heraldoi* (RPp) e *H. albopunctatus* (RPc).

Nos dendrogramas gerados a partir dos marcadores RAPD e das sequências COI, esses mesmos espécimes do rio Mogi Guaçu também foram identificados como pertencentes a agrupamentos genéticos distintos das espécies dos rios Piracicaba e Pirapitinga (Fig. 3b).

Caracteres de Morfometria. Foram examinados um total de 49 exemplares: 11 de *H. albopunctatus* (RPc), 20 de *H. heraldoi* (RPp) e 18 semelhantes (RMG). Esses dados, submetidos a análises de componentes principais, evidenciou três agrupamentos (Fig. 4). Porém, apenas as amostras do rio Pirapitinga se diferenciaram das populações dos rios Piracicaba + Mogi Guaçu.

Discussão

Dados genéticos e morfológicos indicam que *H. heraldoi* do rio Pirapitinga é muito semelhante a *H. albopunctatus* encontrado no rio Piracicaba, sendo essas espécies diferenciadas pelo padrão de coloração e número de dentes pré-maxilares (ZAWADZKI et al., 2008). Zawadzki et al. (2008b) analisando uma população do rio Corumbá, observou em uma espécie, na época considerada *Hypostomus* sp. 1 (atualmente *H. heraldoi*), um alelo no locus Pgm que a diferenciava das outras seis espécies analisadas. Mais tarde, o mesmo autor observou esse alelo em *H. albopunctatus*, que também a distinguia das demais espécies (ZAWADZKI et al., 2008). Devido a estas duas espécies apresentarem um padrão de coloração inverso a outra, Zawadzki et al. (2008) sugeriram que esta inversão no padrão de coloração poderia influenciar os eventos de especiação em alguns *Hypostomus*, mas que isso merece ainda mais estudos.

Zawadzki et al. (2008) comentam ainda que nunca foram relatados espécimes de *H. heraldoi* em outras localidades, e que estas seriam endêmicas das bacias do rio Grande e Paranaíba. O isolamento dessa espécie nessa região em relação às demais populações do baixo rio Paraná, pode ser devido às características encontradas a jusante do rio, como a presença de cânions e corredeiras, e que representariam barreiras que impossibilitariam o contato destas populações (PAVANELLI; BRITSKI, 1999).

Nas análises citogenéticas entre *Hypostomus* aff. *albopunctatus*, *H. albopunctatus* e *H. heraldoi*, podemos observar que as espécies são semelhantes. Apresentaram $2n=74$, porém com diferenças pequenas nas fórmulas cariotípicas: $10m+20sm+44st-a$ e $8m+20sm+46st-a$, respectivamente. O número e localização das RONS e dos sítios de DNAr 18S também variaram entre as espécies, em três pares st-a, dois pares no braço curto e um par no braço longo em *Hypostomus* aff. *albopunctatus*, em um par st-a, no braço longo em *H. heraldoi* e dois pares st-a no braço curto e braço longo em *H. albopunctatus*. Este $2n$ e AgRONS também foram observadas em diferentes populações de *H. albopunctatus* estudadas por outros autores (ARTONI; BERTOLLO, 1996; CAMILO, 2004), dados que podem diferenciar a espécie citogeneticamente. Quanto a *H. heraldoi*, estes são os primeiros dados citogenéticos para a espécie, mas pode-se perceber que apesar das semelhanças morfológicas à *H. albopunctatus* esta espécie apresenta caracteres cariotípicos específico.

Na análise de sequenciamento do gene COI, a variação de nucleotídeos intrapopulacional observada foi de 0,00% a 0,73% (Tabela 1). Esta média baixa foi comum também em outros grupos de peixes, como espécies marinhas e de outras regiões continentais (WARD et al., 2005; HUBERT et al., 2008; PERSIS et al., 2009; STEINKE et al., 2009). A média interespecífica das distâncias entre as seqüências das populações aqui analisadas variou de 1,62% a 5,00% (Tabela 1). Sendo que a média de *H. heraldoi* comparada com *H. albopunctatus* e *Hypostomus* aff. *albopunctatus* foi de 1,62% e entre essas duas últimas foi de 1,76% . Este valor é menor ao observado em outros grupos de peixes, como espécies marinhas Australianas, *Platycephalus*, *Neoplatycephalus* e *Cymbacephalus* (15.55%) (WARD et al., 2005) e nas espécies de água doce do Canadá (8.30%) (HUBERT et al., 2008). Porém, uma baixa divergência entre espécies também foi observada em estudos de peixes marinhos como *Thunnus* (1.11%), *Squalus* (4.17%) (WARD et al., 2005) e em peixes da costa do Pacífico do Canadá (3.75%) (STEINKE et al., 2009). No entanto, quando analisamos os trabalhos que apresentam um maior valor de divergência, podemos observar que a análise é feita entre espécies pertencentes a gêneros diferentes, o que tornaria as médias muito maiores, diferindo, portanto do presente estudo e nos demais, onde uma análise entre espécies do mesmo gênero e provavelmente aparentadas foi realizada, as quais apresentam um valor mais baixo. As diferenças observadas entre as médias das espécies do mesmo gênero, provavelmente refletem o tempo de divergência entre as espécies, ou seja, algumas espécies podem ter uma origem mais recente, enquanto as outras apresentam características mais basais.

Dos 40 indivíduos analisados pelo sequenciamento do gene COI, foi possível separar espécies distintas, permitindo agrupá-las em no mínimo cinco clados. As espécies, *H. albopunctatus* e *H. heraldoi*, tidas como morfologicamente similares, formaram um clado irmão, com 55% de sustentação do valor de *bootstrap*, juntamente com a população analisada do rio Mogi Guaçu. Espécies que mostraram um clado independente e uma diversidade genética maior foram *H. regani*, *H. margaritifera* e *H. hermanni*, apresentando uma linhagem separada e um alto valor de *bootstrap*. Desse modo, a estimativa da diversidade nucleotídica das diferentes seqüências do gene COI foram suficientes para diferenciar as espécies de *Hypostomus*, analisadas. O padrão de divergência das seqüências entre as populações estudadas suporta a existência de no mínimo cinco espécies.

As seqüências de COI depositadas no GenBank estão disponíveis para apenas sete espécies de *Hypostomus*, as quais apresentaram 99% de similaridade com as seqüências

aqui analisadas. As espécies foram *H. nigromaculatus* (482 pb), *H. ancistroides* (483 pb), *H. commersoni* (658 pb) e *H. boulengeri* (661 pb), *H. cochliodon* (679 pb), *H. auroguttatus* (655 pb), *H. affinis* (655 pb).

Nas análises de marcadores de RAPD os espécimes de *H. albopunctatus* (RPc) e a população do rio Mogi Guaçu foram identificados como pertencentes a agrupamentos genéticos distintos. Tal diferenciação pode ser resultante do isolamento reprodutivo entre essas populações. No dendrograma das distâncias evolutivas, gerado pelo Programa Treecon para as análises de RAPD, podemos observar o mesmo padrão de agrupamento antes observado no dendrograma gerado pelas análises do COI. Um fator favorável para a técnica de RAPD, que juntamente com o seu baixo custo, aliados ao sequenciamento do COI, como observado neste presente trabalho, tornam a distinção de espécies próximas possível.

Por meio das análises dos valores de morfometria, componentes principais (cp1 x cp2) gerada pelo programa PAST e Shear, podemos observar que as populações do rio Piracicaba, rio Pirapitinga e rio Mogi Guaçu se separam em três grupos, onde as populações do rio Mogi Guaçu e Piracicaba estão mais próximas e a população do rio Pirapitinga formou um grupo distinto. Por apresentarem uma separação verdadeira, *H. heraldoi* (RPp) e *H. albopunctatus* (RPc) são consideradas com segurança duas espécies válidas. No entanto, as populações do rio Piracicaba e rio Mogi Guaçu se localizaram no mesmo eixo (1) do gráfico, e os caracteres morfológicos não foram suficientes para separar estas duas populações.

Diversas espécies de *Hypostomus* apresentam um grande problema com relação a sua identificação. Isto se deve ao fato destas espécies mostrarem uma alta variação na morfologia e padrão de coloração, ou ao contrário, apresentarem espécies que são morfológicamente semelhantes tidas como crípticas. As relações filogenéticas e identificação das espécies baseada em técnicas moleculares, quando bem aplicadas, costumam concordar com os agrupamentos dados pelas características morfológicas. Pode-se observar, neste presente estudo, que muitas vezes as técnicas quando analisadas em conjunto, podem elucidar as relações entre espécies morfológicamente semelhantes.

Hypostomus albopunctatus e *H. heraldoi* apresentaram diferenças quanto ao seu padrão cariotípico, assim como RAPD, *barcode* e morfometria. Porém, essas análises mostram que estas duas espécies compartilham um ancestral em comum, e em algum período ocorreu um isolamento entre essas duas populações e resultou na sua especiação. As diferenças que ocorreram na população do RMG, onde somente as análises morfométricas indicam tratar-se de um variante de *H. albopunctatus* (RPc). Assim sendo, esta população

pode ainda estar em processo de diferenciação, ou tratar-se de outra espécie, sendo os espécimes pertencentes a esta população provisoriamente chamados de *Hypostomus* aff. *albopunctatus*.

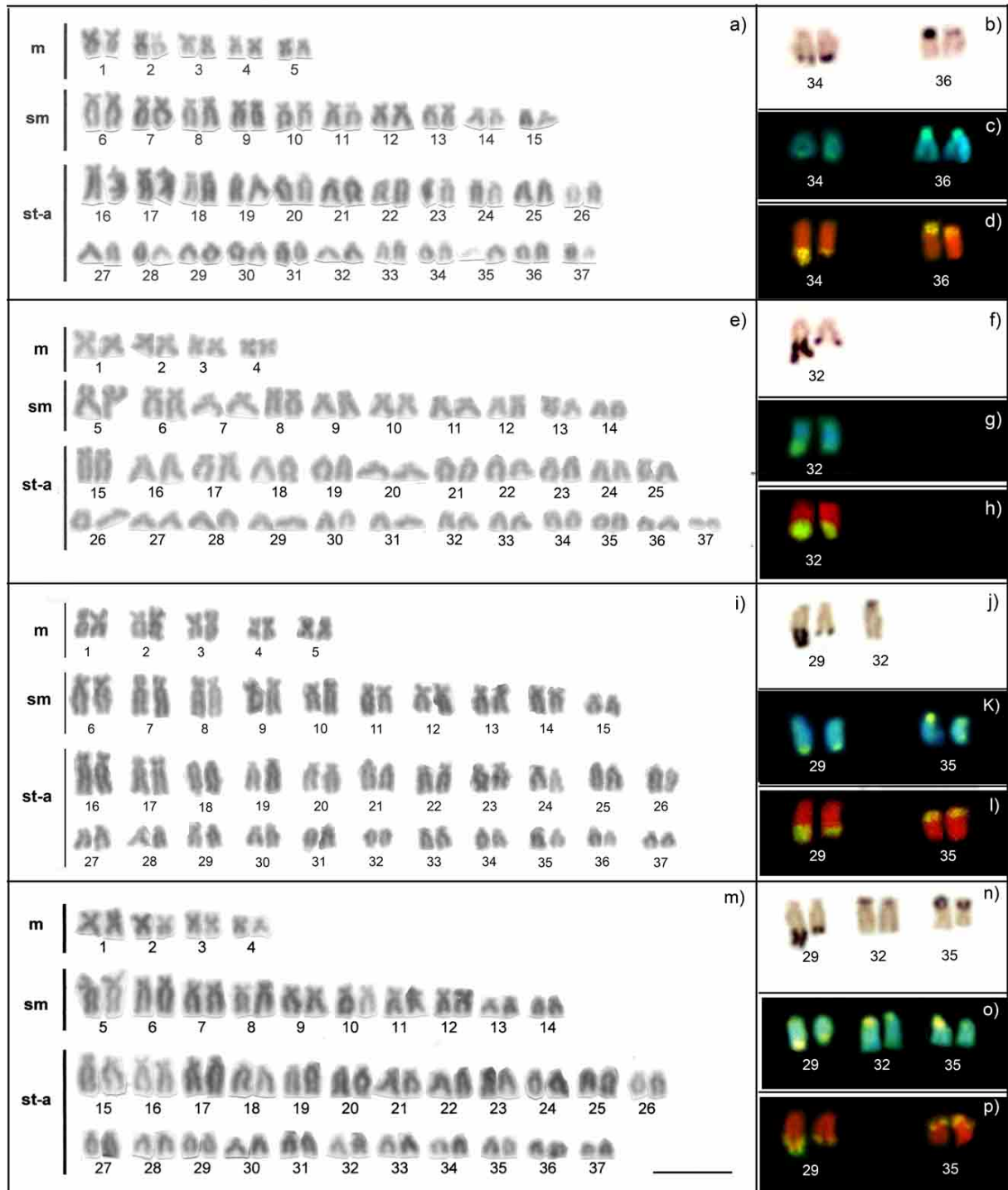


Figura 1 – Cariótipos de: **a)** *H. albopunctatus* (RPC); **e)** *H. heraldoi* (RPP); **i)** e **m)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (RMG), corados por Giemsa. Nos boxes, estão em destaque os pares das RONS com impregnação por nitrato de prata (**b, f, j** e **n**), CMA₃ (**c, g, k** e **o**) e FISH (**d, h, l** e **p**) com DNAr 18S. Barra 5 µm. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

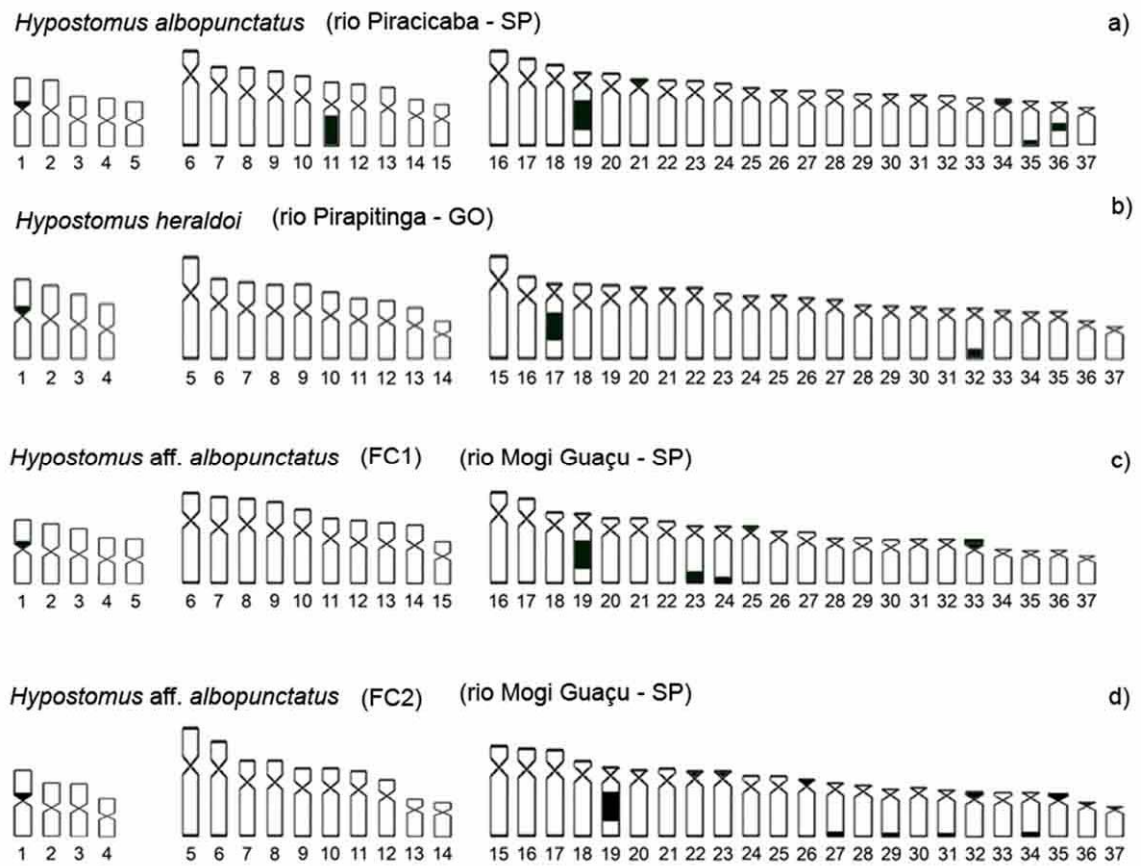


Figura 2 - Idiogramas de: **a)** *H. albopunctatus* (RPC); **b)** *H. heraldoi* (RPp); **c)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (Fórmula cariotípica 1) e **d)** *Hypostomus* aff. *albopunctatus* (Fórmula cariotípica 2) da população rio Mogi Guaçu. As marcas correspondem aos cromossomos com bandas heterocromáticas. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

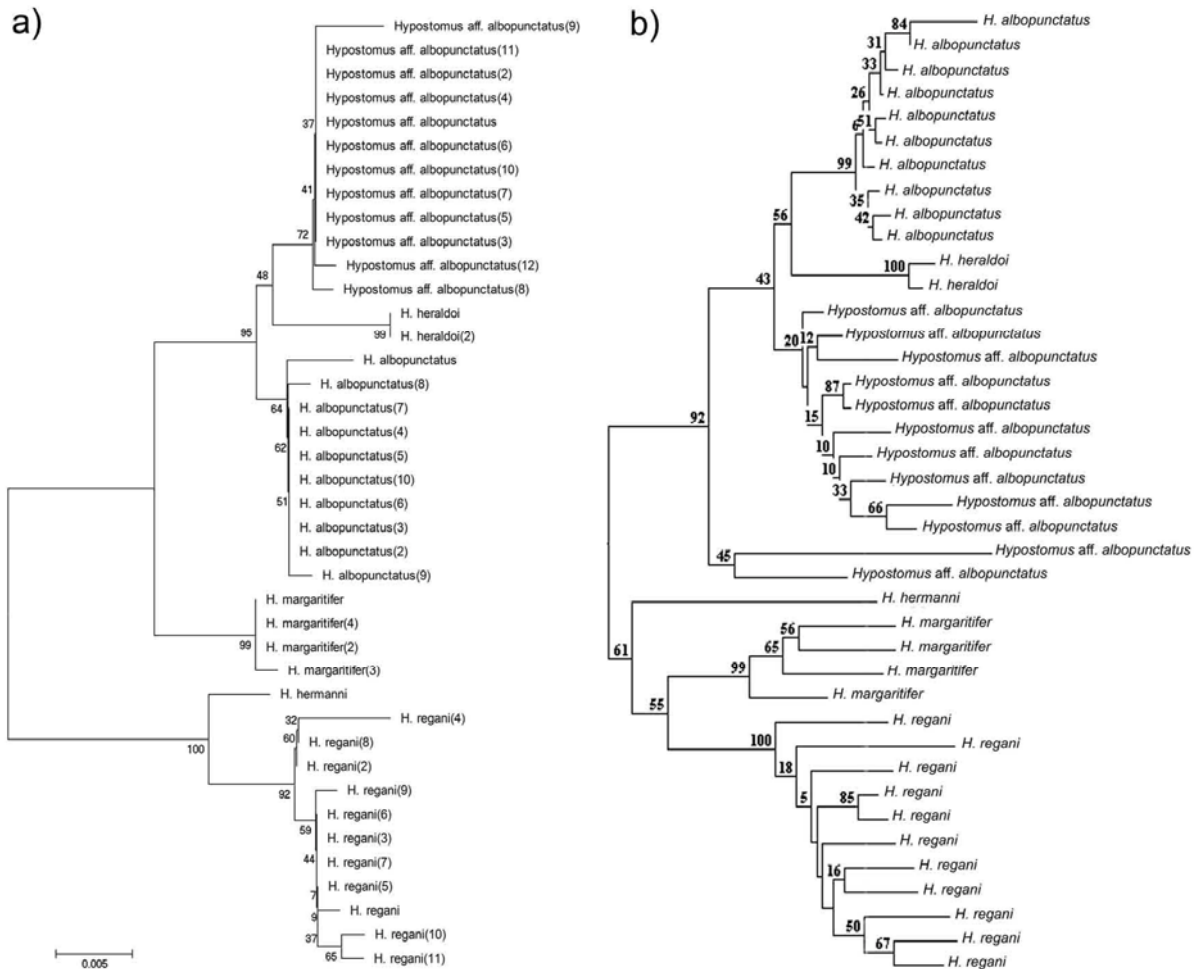


Figura 3 – a) Dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) gerado a partir das sequências do gene COI com o modelo K2P, inferidas para as populações de *Hypostomus* conduzidas pelo MEGA5. **b)** Dendrograma de distâncias genéticas, gerado a partir dos dados de RAPD, inferidas para as populações de *Hypostomus*, conduzidas pelo programa TRECON. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

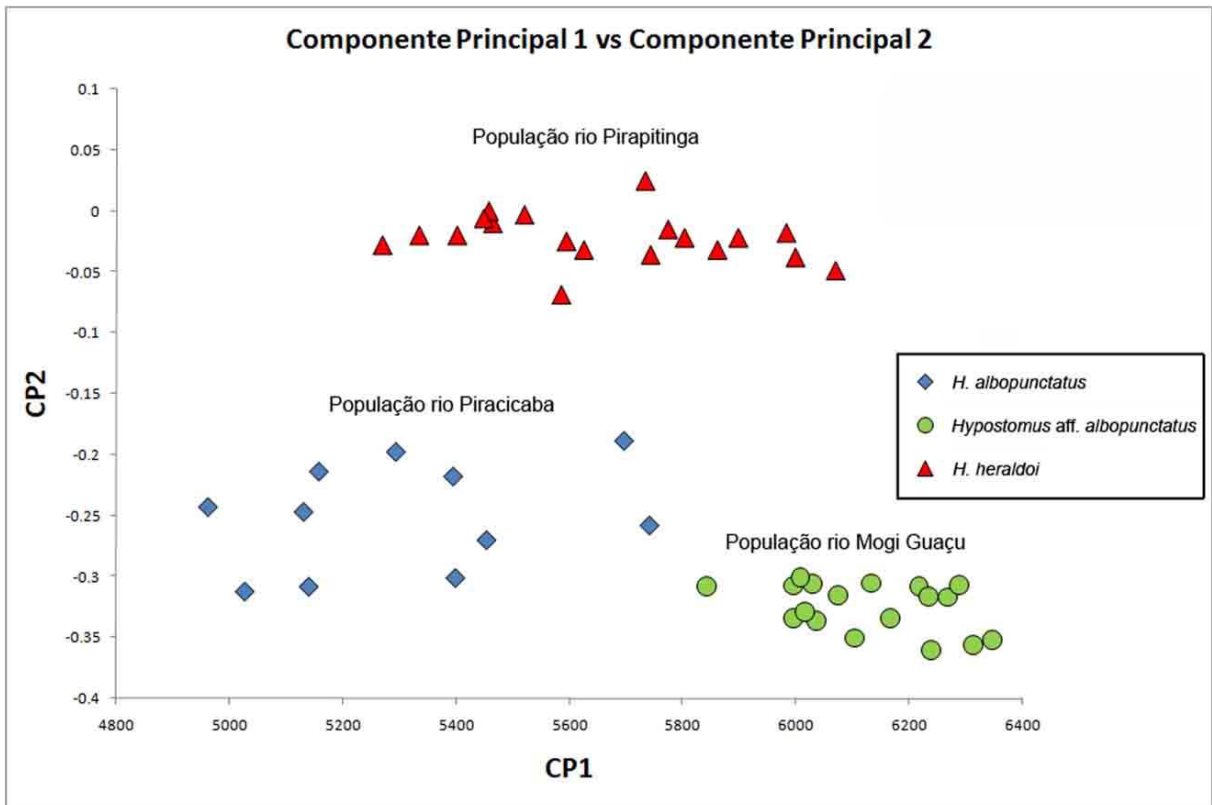


Figura 4 - Análise dos dados morfométricos considerando os componentes principais gerados pelo Programa Shear, levando em consideração somente os componentes que apresentam maior peso na diferenciação entre as populações. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river, Brazil. **J. Zool. Lond.**, v. 253, p. 113-120, 2001.

ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Genet. Mol. Biol.**, v. 26, p. 301-305, 2003.

BARMAN, H. K. et al. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. **Aquaculture**, v. 217, p. 115-123, 2003.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). **Braz. J. Genet.**, v. 1: p. 103-120, 1978.

BOESEMAN, M. The genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, and its Surinam representatives (Siluriformes, Loricariidae). **Zool. Verhandl.**, v. 99, p. 1-89, 1968.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biol. J. Linn. Soc**, v.85, p. 407–415, 2005.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Mol Ecol Notes**, v. 7, p. 574-578, 2007.

GARAVELLO, J. C.; GARAVELLO, J. P. Spatial distribution and interaction of four species of the catfish genus *Hypostomus* Lacépède with bottom of Rio São Francisco, Canindé do São Francisco, Sergipe, Brazil (Pisces, Loricariidae, Hypostominae). **Braz. J. Biol.**, v. 64, n. 3B, p. 591-598, 2004.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-8, 1999.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genet. Mol. Biol.**, v. 26, p. 19-25, 2003.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P. M. Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 22, p. 239-244, 2004.

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

HUBERT, N. et al. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **Public. Libr. Sci.One**, v. 3, n. 6, p. e2490, 2008.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinf. Appl. Note**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LOWE-MCCONNELL, R. H. The fishes of the Rupununi savanna district of British Guiana, South America. Part 1. Ecological groupings of fish species and effects of the seasonal cycle of the fish. **J. Linn. Soc. Ser. Zool.**, v. 45, n. 4, p. 103-144, 1963.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira do Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v. 921, p. 1-27, 2005.

PAVANELLI, C. S.; BRITSKI, H. A. Description of a new species of *Steindachnerina* (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 10, p. 211-216, 1999.

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

PIORSKI, N. M. et al. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 4, p. 1039-1050, 2008.

PRIOLI, S. M. A. P. et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, p. 421-430, 2002.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

REIS, R. E.; WEBER, C.; MALABARBA, L. R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Rev. Suis. Zool.**, v. 97, n. 3, p. 729-766, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 956 p.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 27, p. 190-193, 1980.

STEINKE, D. et al. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. **Mar. Biol.**, v. 156, p. 2641-2647, 2009.

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

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, p. 1596-9, 2007.

VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R.. TRECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Comput. Applic. Biosci.**, v. 10, p. 569-570, 1994.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 360, p. 1847-1857, 2005.

WEBER, C. *Hypostomus dlouhyi*, nouvelle espèce de poisson-chat cuirassé du Paraguay (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Rev. Suis. Zool.**, v. 92, p. 955-968, 1985.

WEBER, C. Subfamily Hypostominae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 351-372.

ZAWADZKI, C. H. **Sistemática e variação aloenzimática da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) dos reservatórios de Corumbá e Itaipu na bacia do alto Rio Paraná, Brasil**. 2001. 306 f. Tese (Doutorado em Ecologia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

ZAWADZKI, C. H. et al. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetica**, v. 123, p. 271-283, 2005.

ZAWADZKI, C. H.; WEBER, C.; PAVANELLI, C. S. Two new species of *Hypostomus* Lacépède (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, v. 6, n. 3, p. 403-412, 2008.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends Ecol. Evol.**, v. 11, p. 247-251, 1996.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares, possibilitaram caracterizar diferentes espécies do gênero *Hypostomus*, da tribo Ancistrini e da família Neoplecostominae, provenientes das bacias hidrográficas do Atlântico Sul, Alto Paraná e Paraguai, bem como o estudo de algumas espécies da localidade tipo. Particularmente para as espécies de *Hypostomus*, o número diploide já constitui uma ótima ferramenta citotaxonômica.

As espécies estudadas da região do Atlântico Sul, são mais conservadas cariotípicamente, sendo que algumas retêm ainda suas características basais, como no caso das espécies do gênero *Ancistrus* ($2n=52$) aqui analisadas, ao contrário do que é observado na bacia Amazônica. A bacia do Atlântico Sul, além de apresentar espécies endêmicas, apresenta também uma menor diversidade quando comparada às bacias do Alto Paraná e Paraguai, tanto no número de espécies quanto na variação cariotípica. Quanto às espécies de *Hypostomus*, observa-se também que nas bacias do Alto Paraná e Paraguai, ocorre uma maior diversidade no número diploide ($2n=76, 80, 82$), do que encontrado no Atlântico Sul ($2n=66$).

Para as espécies consideradas semelhantes, como no caso de *H. albopunctatus* e *H. heraldoi*, os dados citogenéticos juntamente com dados de morfometria e moleculares, foram elucidativos para sua validação, exemplo que também pode ser adotado em outros estudos de espécies com problemas taxonômicos.

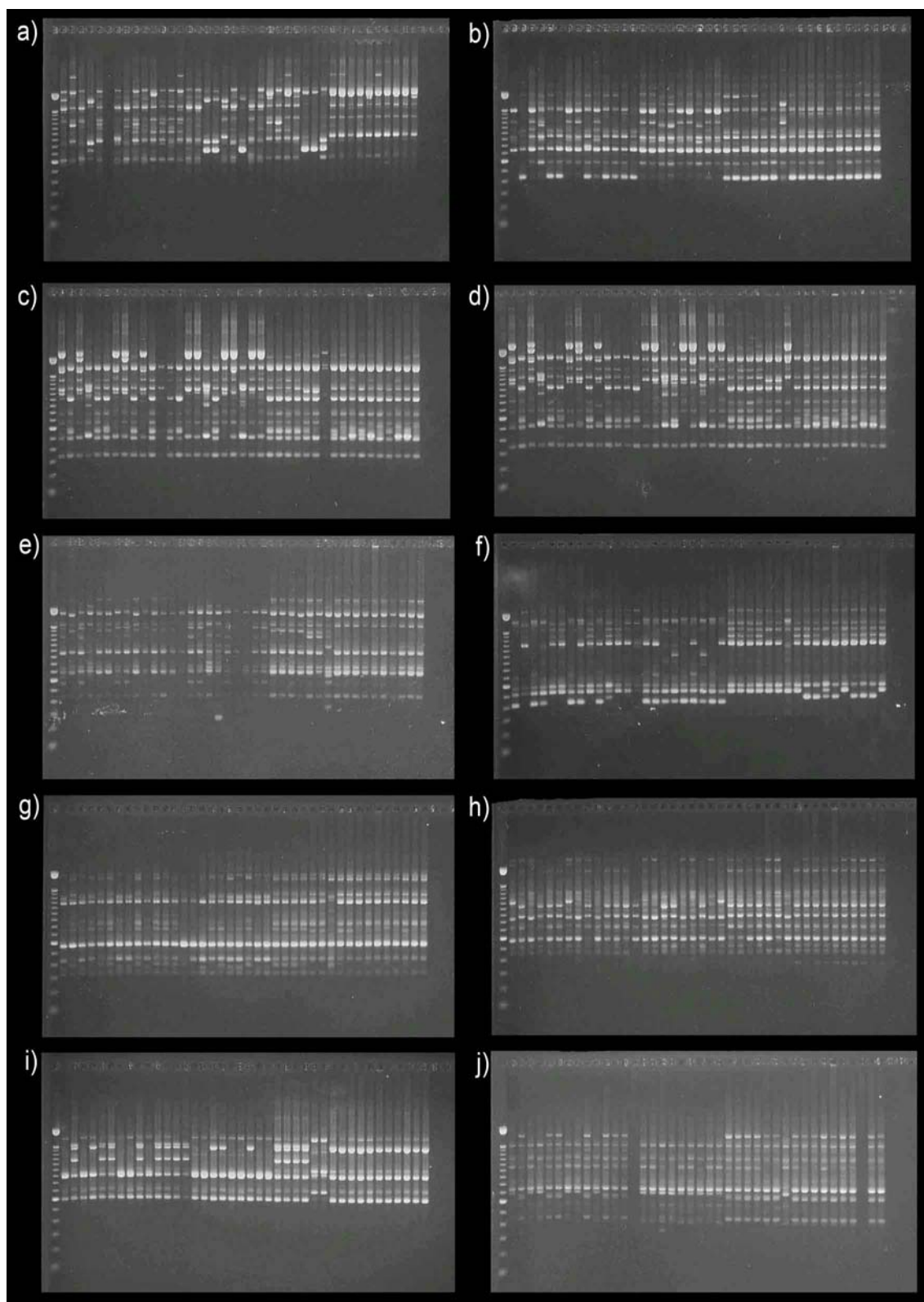
Considerando os dados até então obtidos, pode ser observado que, enquanto os demais Loricariidae apresentam uma evolução cromossômica mais sutil, mantendo o número $2n$ e apenas variando a fórmula cariotípica, a tribo Hypostomini possui representantes que exibem uma evolução cariotípica extremamente diferenciada, tanto no número de cromossomos como na fórmula cariotípica. Esta grande diversidade cariotípica existente nesse grupo de peixes pode ser favorecida pela grande capacidade de adaptação destas espécies a diferentes ambientes aquáticos, assim como sua grande dispersão em diferentes bacias, o que pode levar a fixação de rearranjos cromossômicos nesse grupo de peixes.

Os marcadores citogenéticos utilizados no presente trabalho, permitiram não só uma boa caracterização citotaxonômica de cada um desses grupos, bem como a identificação de possíveis características derivadas e ancestrais na família.

ANEXOS

(Dados Adicionais referentes ao Capítulo IV)

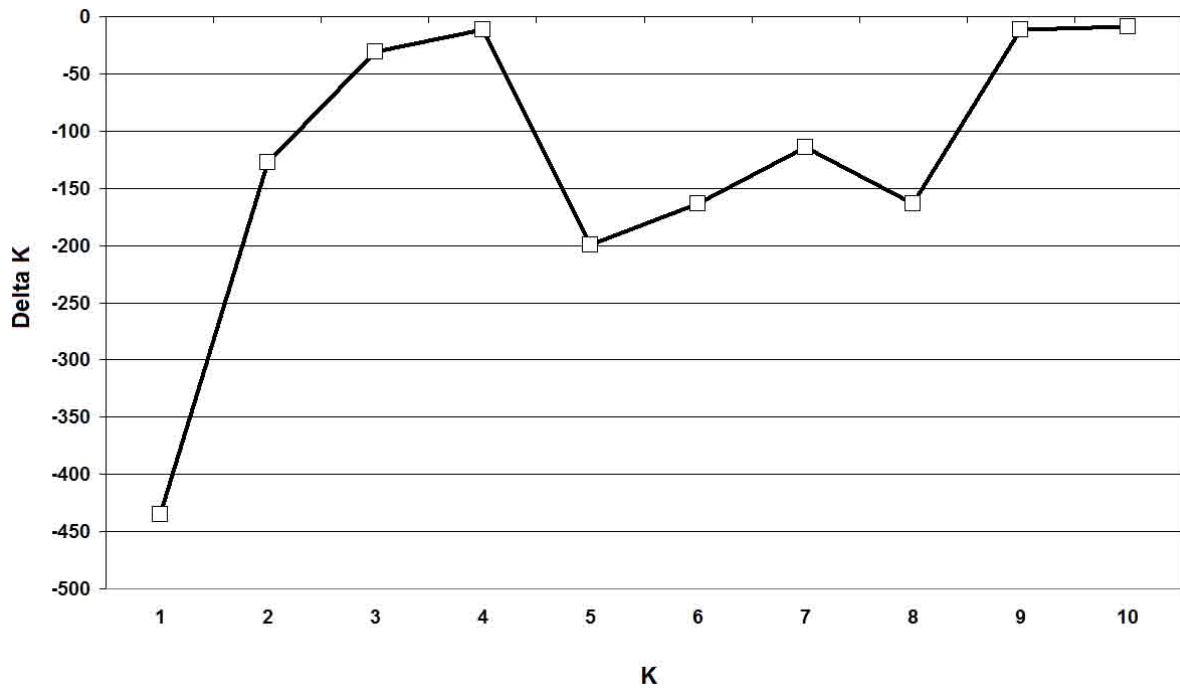
ANEXO II



Padrões eletroforéticos em gel de agarose de fragmentos de DNA polimórficos amplificados ao acaso (RAPD) por PCR com os *Primers* em *Hypostomus*: **a)** OPC 8; **b)** OPC 11; **c)** OPW 6; **d)** OPW 10; **e)** OPW 17; **f)** OPW 20; **g)** OPX 12; **h)** OPX 14; **i)** OPX 15; **j)** OPX 19. Colunas: 1 = marcador de peso molecular de 100 pb; 2-41 = Exemplos de *Hypostomus* analisados; 42 = controle negativo. **Fonte:** Elaborado pela Autora.

ANEXO III

Valores de Delta K (ΔK) em relação ao número de populações (K)



Valores de Delta K (ΔK) em relação ao número de populações (K), para o grupo de *Hypostomus* analisado. A escolha do número mais provável de populações inferidas se deu a partir da estatística ΔK (Evanno et al., 2005).

ANEXO IV

Gráfico 1 - Análise dos componentes principais: Componente Principal (1) VS Componente Principal (2) em *Hypostomus*.

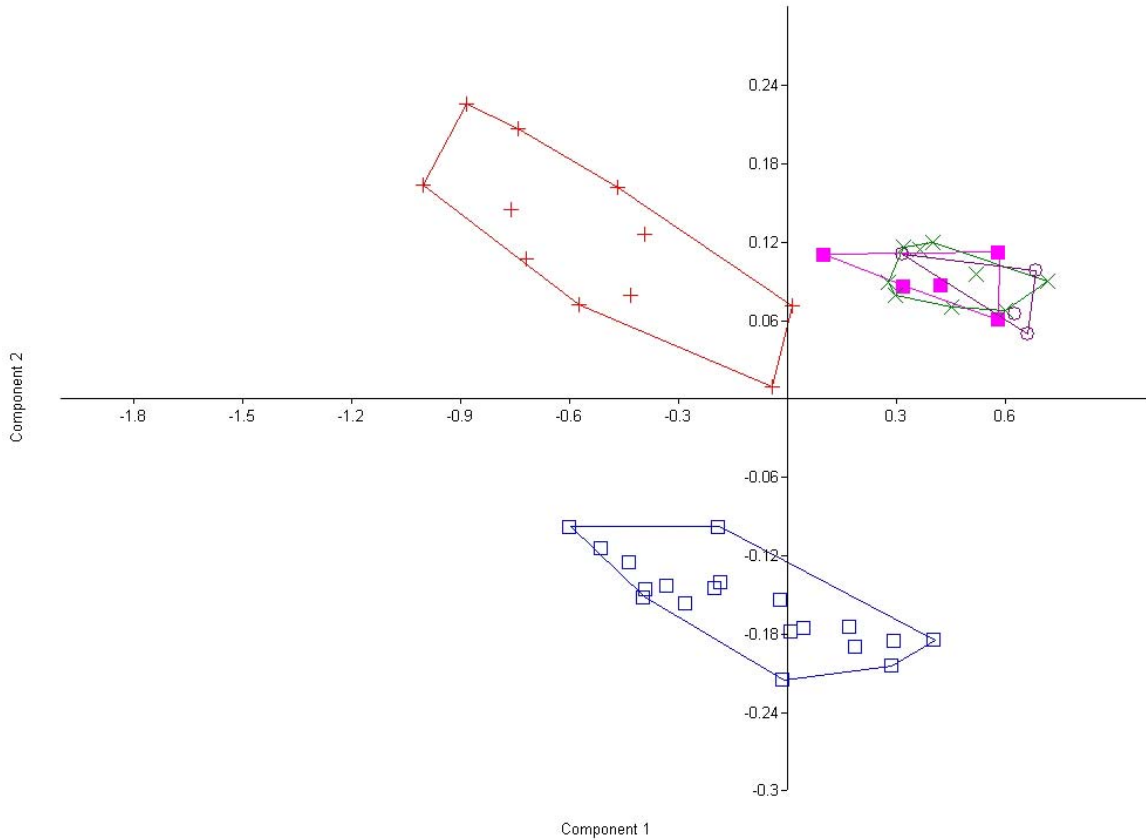
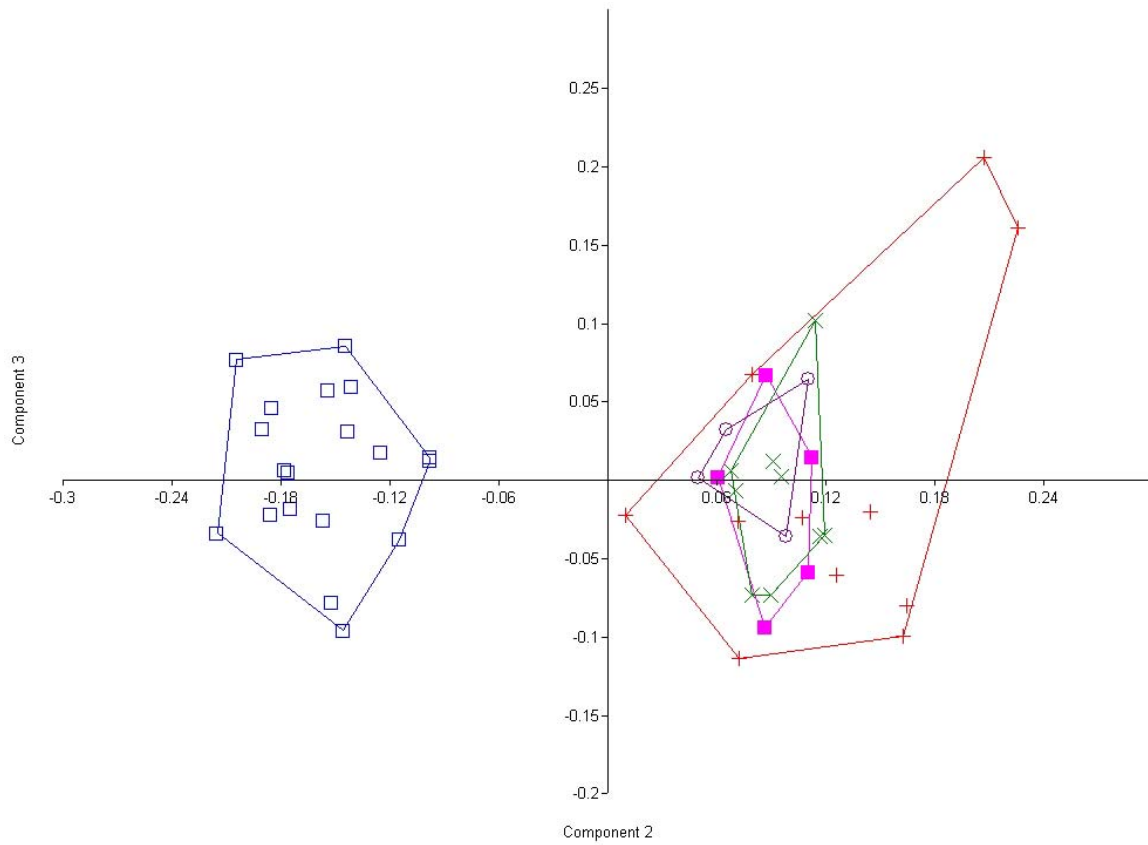


Gráfico gerado pela análise das medidas dos componentes principais (Programa PAST) em *H. heraldoi* e *H. albopunctatus*. Em vermelho *Hypostomus albopunctatus* (População do rio Piracicaba-SP); em azul *Hypostomus heraldoi* (População do rio Pirapitinga-GO); verde, lilás e roxo População do rio Mogi Guaçu-SP.

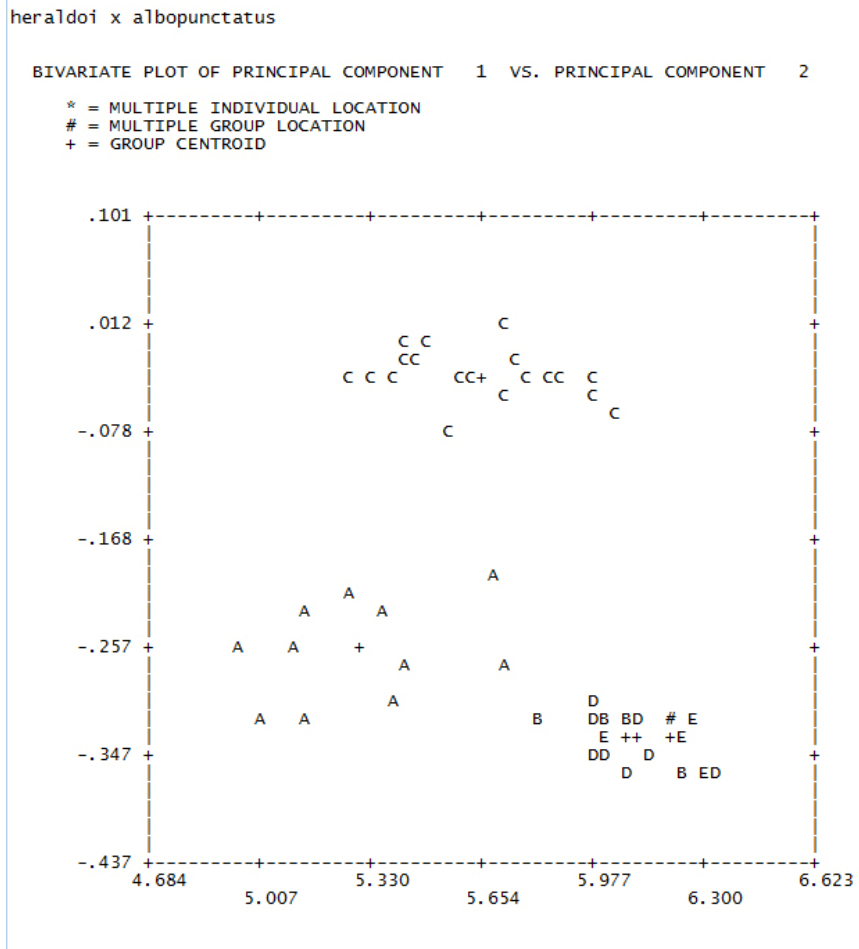
ANEXO V

Gráfico 2 - Análise dos componentes principais: Componente Principal (2) VS Componente Principal (3) em *Hypostomus*.



ANEXO VI

Análise dos componentes principais pelo programa Shear



Análise dos componentes principais pelo programa Shear, levando em consideração somente os componentes que apresentam maior peso na diferenciação entre as populações.