



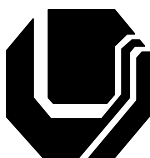
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE SEIS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
LORICARIIDAE (SILURIFORMES) PERTENCENTES ÀS BACIAS
DOS RIOS PARANAÍBA E TOCANTINS.**

Aluna: Vanessa Carolina de Sena Correia

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sandra Morelli

**UBERLÂNDIA – MG
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE SEIS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
LORICARIIDAE (SILURIFORMES) PERTENCENTES ÀS BACIAS
DOS RIOS PARANAÍBA E TOCANTINS.**

Aluna: Vanessa Carolina de Sena Correia

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sandra Morelli

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética)**

**UBERLÂNDIA-MG
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- C824e Correia, Vanessa Carolina de Sena, 1985-
Estudo citogenético de seis espécies da família *Loricariidae*
(Siluriformes) pertencentes às bacias dos rios Paranaíba e Tocantins [manuscrito] / Vanessa Carolina de Sena Correia. - 2010.
76 f. : il.
- Orientadora: Sandra Morelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Peixe - Citogenética - Teses. 2. Loricarideo - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 597-115



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE SEIS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
LORICARIIDAE (SILURIFORMES) PERTENCENTES ÀS BACIAS
DOS RIOS PARANAÍBA E TOCANTINS.**

Aluna: Vanessa Carolina de Sena Correia

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a. Dr.^a Sandra Morelli (Orientadora)

Examinadores:

Prof. Dr. Paulo César Venere (UFTM)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Data da Defesa: 16/07/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof.^a. Dr.^a Sandra Morelli

Dedico esta dissertação a meus amados pais: Doralice de Sena Ferreira e Augusto Pinto Correia; a minha orientadora Sandra Morelli e a equipe de Citogenética Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

***“Aqueles que confiam em Javé são como o monte de Sião: nunca se abala esta firme para sempre.”
Salmo 125, 1***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** que é meu fiel companheiro e direciona meus caminhos, dando força e ânimo para seguir em frente.

À minha orientadora **Sandra Morelli** pela sua amizade, carinho, orientação, paciência e por acreditar em mim, mesmo diante todas as dificuldades presentes.

Aos meus **pais** Augusto Pinto Correia e Doralice de Sena Ferreira por todo amor, apoio, paciência, e por compartilharem comigo “mesmo estando longe” todo o processo de desenvolvimento deste mestrado, por sofrerem comigo nos momentos de dificuldades e vibrarem em todos os momentos de alegria.

Ao **José Clidenor dos Santos**, pela sua disposição nas incansáveis coletas e pela amizade.

À amiga **Luana** por me incentivar a vir para Uberlândia, por todo apoio, por todo exemplo de fé, pela nossa longa amizade que começou com as aves na nossa querida UFT e com a graça de Deus durará por muito tempo.

Aos amigos de Laboratório, **Robson** e **Sabrina** por serem meus co-orientadores, pelo companherismo e pela disposição em me ajudar em todos os momentos que precisei. Em especial a Sabrina, por me socorrer nos grandes momentos de sufoco e ser minha grande conselheira e companheira.

Aos amigos **Aurélio Herinque, Naiara, Livia, Daniele e Alessadra** por todo carinho e amizade dentro e fora do laboratório.

À amiga **Ivaneia**, que será sempre inesquecível, por me ajudar no trabalho com os primeiros cascudos.

Aos novos estagiários, **Renan, Carine e Luiz Paulo** por todo auxílio, pela disposição, e empolgação com a citogenética, sendo gratificantes e valiosos os trabalhos realizados juntos.

Aos colegas de mestrados e professores do Instituto de Genética e Bioquímica, por todo apoio e conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr **Paulo Eugênio**, Prof^a. Dr^a **Júlia** e Prof^a. Dr^a **Juliana** do laboratório de imagens de morfologia vegetal, por possibilitarem e auxiliarem no uso do microscópio de fluorescência, no qual completei parte deste trabalho.

Aos taxonomistas Pro Dr **Oscar Shibatta** da Universidade Estadual de Londrina e Prof Dr **Cláudio H. Zawadzki** do Núcleo de Pesquisa em limnologia

Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá pela identificação das espécies.

À professora **Msc Luciana Oliveira de Almeida** e o **Professor Msc Gilvan** da Universidade Federal do Tocantins por todo apoio, nos cedendo o laboratório de genética e equipamentos para realizar a pesquisa no Tocantins.

À amiga **Lucélia, Antônio Manoel e os primos Rogério e Silvana** por auxiliarem nos trabalhos realizados no Tocantins.

Ao **Jeremias Sofiet Oliveira, Pedro Pereira de Carvalho e Vicente** por todo esforço para realizarem as coletas de peixes no Tocantins.

À comunidade **São Francisco e Santa Clara, ao Grupo de Jovens Irmão Sol e Irmã Lua e ao Grupo de oração Santo Inácio de Loyola**, por serem minha segunda família em Uberlândia.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelas oportunidades, apoio e suporte para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pela bolsa de mestrado, à FAPEMIG e CAPES pelos auxílios concedidos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Sistemas de determinação sexuais, presente na família Loriicaridae.....	14
Tabela 2.1. Número de espécies coletadas.....	27
Tabela 2.2 Resumo geral sobre a caracterização das espécies.....	30
Tabela 2.3 Dados citogenéticos para as espécies da subfamília Hypostominae.....	33

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1 Mapas dos locais de coleta.	5
Fig. 1.2 Fotos dos locais de coleta.	6
Fig. 2.1 Cariótipos corados por Giemsa e RONS de <i>H. regani</i> e <i>H. paulinus</i>	41
Fig. 2.2 Cariótipos corados por Giemsa e RONS de <i>H. margaritifera</i> (normal e atípico) e <i>H. strigaticeps</i>	42
Fig. 2.3 Metáfases de <i>H. regani</i> coradas por Giemsa, Banda-C, CMA ₃ e Hoechst	43
Fig. 2.4 Metáfases de <i>H. paulinus</i> coradas por Giemsa, Banda-C, CMA ₃ e Hoechst	44
Fig. 2.5 Metáfases atípica e comum de <i>H. margaritifera</i> coradas por Giemsa, Banda-C e CMA ₃	45
Fig. 2.6 Metáfases de <i>H. strigaticeps</i> coradas por Giemsa, Banda-C, CMA ₃ e Hoechst	46
Fig. 2.7. Fotos de exemplares de <i>H. regani</i> , <i>H. paulinus</i> , <i>H. margaritifera</i> e <i>H. strigaticeps</i>	47
Fig. 3.1 Cariótipo corado por Giemsa e RONS de <i>S. emarginata</i>	59
Fig. 3.2 Metáfases de <i>S. emarginata</i> coradas por Giemsa, Banda-C, CMA ₃ e Hoechst.	59
Fig. 3.3 Cariótipo corado por Giemsa e RONS de <i>P. joselimaianus</i>	60
Fig. 3.4 Metáfases de <i>P. joselimaianus</i> coradas por Giemsa, Banda-C CMA ₃ e Hoechst	60
Fig. 3.5 Fotos de exemplares de <i>S. emarginata</i> e <i>P. joselimaianus</i>	61

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
1. FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
1.1. CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE ESTUDO.....	3
1.1.1. Rio Araguari	3
1.1.2. Rio Tijuco.....	3
1.1.3. Rio Tocantins.....	4
1.2. ICTIOFAUNA NEOTROPICAL.....	7
1.3. A FAMÍLIA LORICARIIDAE.....	7
1.4. CITOGENÉTICA DE PEIXES	9
1.4.1. Bandamento Cromossômico	10
1.5. ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA LORICARIIDAE	13
1.6. CITOGENÉTICA DA SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE	15
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
2. VARIABILIDADE DA MACRO E MICROESTRUTURA CARIOTÍPICA EM <i>HYPOSTOMUS</i> (TELEOSTEI, LORICARIIDAE).	24
2. VARIABILITY OF MACRO AND MICROSTRUCTURE KARYOTYPE ON <i>HYPOSTOMUS</i> (TELEOSTEI, LORICARIIDAE).	25
2.1. INTRODUÇÃO	26
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.3. RESULTADOS.....	28
2.4. DISCUSSÃO	30
2.5. REFERÊNCIAS.....	37
3. ANÁLISE CITOGENÉTICA DE <i>SQUALIFORMA EMARGINATA</i> E <i>PTERYGOPLICHTHYS JOSELIMAIANUS</i> (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE) PERTENCENTES AO RESERVATÓRIO DO RIO TOCANTINS, PORTO NACIONAL-TO.....	49
3.1. INTRODUÇÃO	51
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.3. RESULTADOS.....	53
3.4. DISCUSSÃO	54
3.5. REFERÊNCIAS.....	56

Apresentação

A família Loricariidae é visada citogeneticamente por apresentar uma ampla variedade de número e estrutura cromossômica, levando a diferentes fórmulas cariotípicas.

A análise do cariótipo de uma determinada espécie de vertebrados, principalmente se estendida a vários exemplares, coletados em diferentes localidades e com o emprego de técnicas diversas de marcações cromossômicas, oferece conhecimentos preciosos sobre a possível ocorrência de diferentes constituições cariotípicas, que podem corresponder a casos de polimorfismos cromossômicos, representarem citótipos distintos restritos a determinadas localidades ou serem apenas variantes esporádicas.

A citogenética é importante para a citotaxonomia, na medida em que espécies novas de vertebrados podem ser reconhecidas com base em seus cariótipos, principalmente nos casos em que as espécies não são identificadas por características morfológicas externas.

Com o intuito de contribuir para um melhor conhecimento da citogenética evolutiva dos Loricariidae e levantamento ictiológico na bacia do rio Paranaíba e Tocantins, apresenta-se neste trabalho dados pertencentes à *Hypostomus* cf. *regani*, *Hypostomus* aff. *margaritifer*, *Hypostomus* cf. *paulinus* e *Hypostomus strigaticeps* coletadas no rio Araguari e Tijuco (Uberlândia-MG), *Squaliforma emarginata* e *Pterygoplichthys joselimaianus* pertencentes ao reservatório (Porto-Nacional-TO), formado com o represamento das águas do rio Tocantins, com a implantação da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães. A análise consiste em caracterização da estrutura do cariótipo, variabilidade das RONS, heterocromatina constitutiva e determinação das regiões ricas em GC e AT através de fluorocromos específicos.

As informações sobre a fauna do rio Tocantins são escassas, especialmente na região do médio e alto Tocantins. A área contém uma relevante proporção de espécies endêmicas em vários grupos, porém muitas espécies permanecem sem registro científico, exibindo vários problemas taxonômicos ou aguardando descrição formal.

A construção de usinas hidrelétricas, como a UHE de Capim Branco II no rio Araguari e UHE Luis Eduardo Magalhães no rio Tocantins, causa várias alterações no rio, provocando o desaparecimento de micro habitats, modificações da fauna e, conseqüentemente, o desaparecimento de espécies, muitas vezes, antes mesmo de serem formalmente descritas.

As análises apresentadas neste trabalho sobre os gêneros *Hypostomus*, *Squaliforma* e *Pterygoplichthys*, comparadas com os dados da literatura, contribuem para a ampliação do conhecimento da citogenética evolutiva de peixes de água doce da região Neotropical, pois relacionam questões biogeográficas e taxonômicas revelando diferenças intraespecífica e interespecífica.

1. Fundamentação Teórica

1.1. Caracterização da Região de Estudo

1.1.1. Rio Araguari

Situada na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, onde estão os municípios de Uberlândia e Araxá, a bacia abrange um total de 20 municípios. Apresenta uma área de drenagem de 22.091 km², o que representa 3,41% do território do estado de Minas Gerais (IGAM, 2010).

Segundo Baccaro et al. (2004) o rio Araguari é uma sub-bacia do rio Paranaíba, possui 475 Km de extensão, nasce no Parque Nacional da serra da Canastra, no município de São Roque de Minas, e é um dos principais tributários do rio Paranaíba, o qual junto com o rio Grande, dão início à grande bacia do rio Paraná.

O rio Paranaíba é um dos principais reguladores de águas para as regiões sul e sudeste, representando aproximadamente 43% do volume da demanda dessas regiões. Para tal suprimento, foi necessária a construção de barragens seriadas ao longo de sua calha, o que culminou por estabilizar seu regime hídrico, com a conseqüente alteração dos ciclos reprodutivos das espécies de peixes da bacia (Paiva e Dergam, 1999).

1.1.2. Rio Tijuco

O Rio Tijuco nasce em Uberaba na cota altimétrica de 950 m e tem sua foz na cota de 526 m. É afluente da margem esquerda do rio Paranaíba e possui uma área de aproximadamente 27% do Triângulo Mineiro, ocupando um total de 14.249.05 km², tendo como principais afluentes os rios: Prata, Babilônia, Cabaçal, Douradinho, Panga, Estiva e outros. Na Bacia do Tijuco o uso e ocupação inadequada do solo provocaram um intenso desequilíbrio ambiental. A substituição inicial do Cerrado para a implantação de pastagens foi realizada sem levar em consideração o grau de fragilidade ambiental e sem se preocupar com práticas conservacionistas e/ou técnicas alternativas para a contenção da

erosão. Atualmente o quadro ambiental da bacia é grave com intensos processos erosivos e grande remoção de material nas cabeceiras de drenagem e sopés dos relevos residuais, que passa a entulhar os cursos d'água a jusante (Santos e Baccaro, 2004).

1.1.3. Rio Tocantins

A bacia do rio Tocantins–Araguaia se constitui na maior bacia hidrográfica inteiramente situada em território brasileiro e, segundo dados da Agência Nacional de Águas (ANA), drena aproximadamente 967 Km², correspondendo a 11% do território nacional, sendo que 34,2% dessa bacia está no estado do Tocantins. O principal rio formador desta bacia é o rio Tocantins, que surge com o nome de rio Maranhão, na lagoa Formosa, cerca de 60 km ao norte de Brasília, a uma altitude de 1.100 metros. Passa a se chamar Tocantins a partir da confluência dos rios das Almas e Maranhão, percorrendo 2.400 km até a sua foz na Baía de Marajó, próxima a Belém do Pará, apresentando uma área de drenagem de 380.8 mil km² (Nascimento, 2006).

A bacia Tocantins-Araguaia é considerada a terceira em potencialidade elétrica do Brasil e destacam-se quatro usinas construídas e em pleno funcionamento ao longo do rio Tocantins (Tucuruí, Serra da Mesa, Luís Eduardo Magalhães e Cana Brava), além de inúmeras pequenas construídas nos afluentes.

De acordo com Ferreira (2003), as obras e reservatório da UHE Luis Eduardo Magalhães atingem áreas dos municípios de Miracema do Tocantins, Lajeado, Palmas, Porto Nacional, Brejinho de Nazaré e Ipueiras. O total da área alagada pela sua implantação foi de 1.040,10 Km². Porto Nacional–TO, dentre os municípios com áreas afetadas, foi o mais impactado, com 41,6% do total (ANA, 2006).

A construção da usina trouxe severas conseqüências para a ictiofauna, pois os impactos biológicos relacionam-se à barreira física representada pela barragem para as espécies aquáticas, constituindo um fator de isolamento das populações antes em contato. Além deste fato, a barragem impede ou dificulta a

piracema das espécies (Ribeiro e Petrere, 1991). As transformações da dinâmica do rio, assim como as alterações na qualidade da água afetam tanto a região de montante quanto a de jusante da barragem, sendo que tais impactos alteram a biodiversidade do rio como um todo (Eletrobras, 1999).

Lucinda et al. (2007) publicou um levantamento das espécies da área do reservatório do Lajedo, criada devido a construção da UHE Luis Eduardo Magalhães, verificando a presença de 343 espécies, distribuídas em 42 famílias e 12 ordens. Entre os Siluriformes, a família mais abundante é a dos Loricariidae, registrando cerca de 43 espécies.

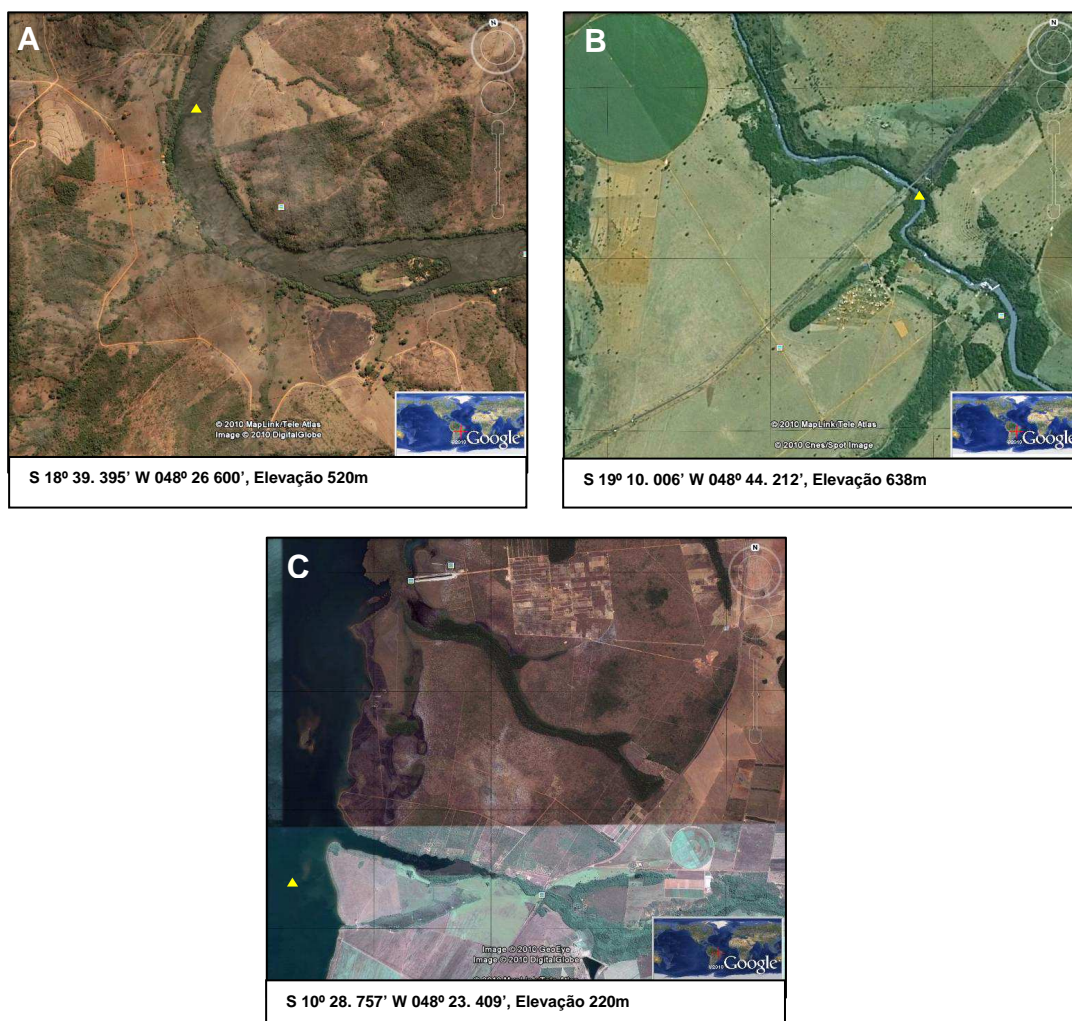


Fig. 1.1 Mapas dos locais de coleta: **A)** rio Araguari, **B)** rio Tijuco e **C)** lago formado pela implantação da UHE Luis Eduardo Magalhães. O marcador (▲) indica os pontos de coleta.

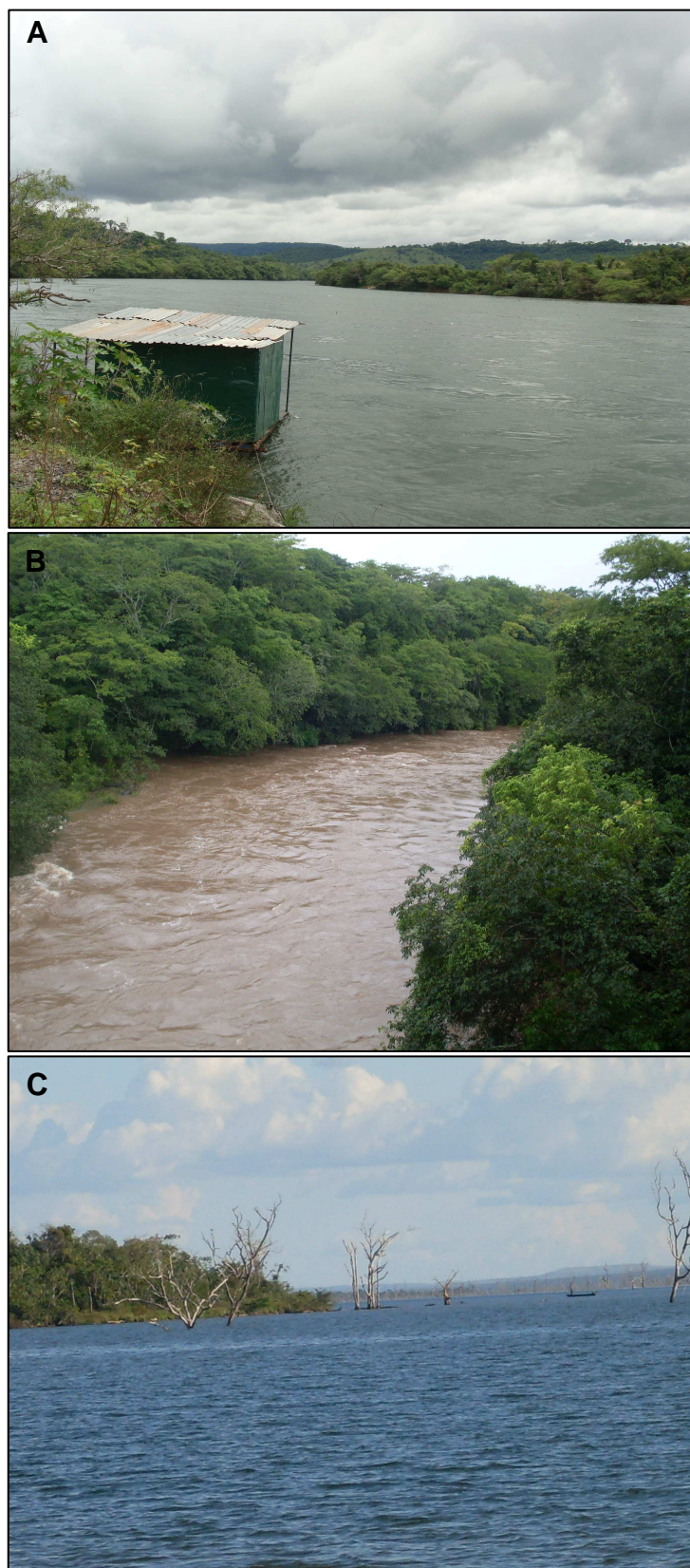


Fig. 1.2 Fotos dos locais de coleta: **A)** rio Araguari, **B)** rio Tijuco e **C)** lago formado pela implantação da UHE Luis Eduardo Magalhães.

1.2. Ictiofauna Neotropical

Os peixes representam aproximadamente 28.460 espécies. Dentre estas, cerca de 27.400 pertencem ao grupo dos Osteichthyes (Lewinsohn e Prado, 2002). Segundo o inventário realizado por Reis et al. (2003), a ictiofauna Neotropical de peixes de água doce é bastante rica, incluindo 71 famílias e 4.475 espécies conhecidas como válida, entre as mais de 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas em todo planeta.

As duas ordens mais representativas em número de espécies conhecidas nesta região são os Characiformes e os Siluriformes. A ordem dos Siluriformes é constituída por 35 famílias com aproximadamente 446 gêneros e 2.867 espécies, das quais 1.727 ocorrem nas Américas (Nelson, 2006).

Os Siluriformes apresentam vários problemas de ordem sistemática e taxonômica, principalmente com relação às espécies neotropicais, dado o elevado número de espécies, sua ampla distribuição geográfica e a semelhança morfológica existente entre muitas espécies (Sczepanski, 2008).

Esta ordem é caracterizada por peixes com formas e tamanhos variados, possuem hábitos predominantemente crepusculares e noturnos, e que geralmente habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e vegetação (Paxton e Eschmeyer, 1995).

Entre as diversas famílias que compõem a ordem Siluriformes os Loricariidae (cascudos), grupo endêmico da região Neotropical, ocupam o segundo lugar em tamanho, com cerca de 683 espécies válidas (Reis et al. 2003).

1.3. A Família Loricariidae

Os peixes desta família ocupam habitats variados demonstrando assim uma grande capacidade adaptativa, que pode ser exemplificada pela sua respiração, que além das brânquias, também é realizada pelas paredes vascularizadas do estômago, fato que lhe permite ficar fora da água por longo período (Giuliano–Caetano, 1998).

Esses organismos podem ser encontrados tanto em ambientes lênticos, quanto em ambientes lóticos, como em rios não muito profundos, com fundo arenoso ou sobre rochas. Para sobreviverem em tais ambientes e para suportar fortes correntezas são anatomicamente adaptados, possuindo ventosas bucais, nadadeiras anatomicamente modificadas e corpo de formato achatado, que é típico de animais pertencentes a esses habitats (Weber, 2003).

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

Armbruster (2004) inseriu Ancistrinae como uma tribo dentro de Hypostominae (Ancistrini), conservando as subfamílias Hypoptominae, Neoplecostominae, Loricariinae, e sugerindo uma nova família formada por Delturus + Upsilodus.

A subfamília Hypostominae é constituída, em sua maioria, por espécies de médio porte. Os representantes que atingem maiores portes pertencem aos gêneros *Glyptoperichthys*, *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Pterygoplichthys* e *Squaliforma*. O maior pode chegar a até 50 cm de tamanho, como é o caso de *Isorineloricaria spinosissima*. São raros os casos de dimorfismo sexual, sendo que no gênero *Aphanotorulus*, machos sexualmente maduros apresentam nadadeiras e corpos mais espinhosos e algumas modificações dos dentes. Os peixes dessa subfamília como acontecem com a família como um todo, podem ser encontrados nos mais variados habitats e apresentam ampla distribuição, com exceção de *Hypostomus watwata*, a qual vive em águas estuárinas dos rios das Guianas (Weber, 2003).

Devido ao limitado conhecimento da distribuição da ictiofauna da região Neotropical, do grande número de espécies e da grande variação intra – específica com relação à morfologia e ao padrão de pigmentação observado no grupo, ocorre uma grande dificuldade na identificação destes peixes, o que muitas vezes resulta em uma identificação errada de muitas espécies (Reis et al. 1990).

1.4. Citogenética de Peixes

O incremento de análises cromossômicas em populações de peixes tem se tornado cada vez mais freqüente em trabalhos que compreendem áreas geográficas relativamente amplas. Tais estudos superam a fase simples de identificação de número e morfologia dos cromossomos, e passam a abordar aspectos populacionais em que se analisam distintos tipos de polimorfismos. Deste modo tem sido descrito, por exemplo, diferença cariotípica em amostras de *Hoplias malabaricus* coletadas em 45 localidades distintas da América do Sul, o que tem revelado a existência de pelo menos sete citótipos que diferem em número e fórmula cromossômica (Bertollo et al. 2000; Vicari et al. 2006).

Estudos realizados com nove populações locais de *Astyanax scabripinnis paranae*, com diferença morfológica pouco evidente têm revelado que todos podem ser identificados com base em seus cariótipos (Moreira-Filho e Bertollo. 1991; Maistro et al. 1998, 2000).

Segundo Oliveira et al. (2009) mais de 921 espécies de peixes neotropicais já foram analisadas, as quais estão distribuídas em 252 gêneros e 44 famílias, sendo que os números diplóides variam entre $2n = 20$ para *Pterolebis longipinnis* a $2n = 134$ para *Corydoras aeneus*.

Grupos caracterizados pela alta mobilidade e constituídos por um grande número de indivíduos apresentam uma macroestrutura cariotípica mais estável como no caso dos Curimatídeos (Venere e Galetti, 1989; Feldberg et al. 1992; Venere et al. 2008) e Anostomídeos (Galetti et al. 1991). Já grupos com pequena mobilidade e baixa densidade populacional, mostram grande variação cariotípica ao nível inter e intraespecífico, como verificado nos gêneros *Hoplias* (Betollo et al. 1986), *Astyanax* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), *Corydoras* (Oliveira et al. 1993), *Hypostomus* (Artoni e Bertollo, 2001; Kavalco et al. 2005; Rubert et al. 2008).

Assim sendo, entre os Loricariídeos, diferentes grupos mostram diferentes tendências de evolução cariotípica, provavelmente devido às diferenças no tamanho e estrutura das populações, aliada a vagilidade, que seriam fatores preponderantes neste processo (Artoni; 1996).

Em citogenética de peixes, o domínio de técnicas de coloração diferencial dos cromossomos como nitrato de prata, bandeamento-C, cromomicina A₃, bem

como a citogenética molecular, possibilitam hoje grande avanço estudos evolutivos, sendo estas consideradas ferramentas indispensáveis às avaliações cariotípicas. A não obtenção de bandamentos mais resolutivos (bandas G/R/T) dificulta a identificação de rearranjos e, conseqüentemente, o pareamento cromossômico e a determinação de uma nomenclatura consensual para cada espécie a ser utilizada nos diferentes estudos (Paiva et al. 2009).

1.4.1. Bandamento Cromossômico

Heterocromatina Constitutiva

O bandamento C é importante como marcador cromossômico devido a sua universalidade, diversidade e variabilidade, possibilitando a identificação de cromossomos homólogos no cariótipo, a diferenciação dos padrões de heterocromatina constitutiva entre indivíduos, populações e/ou espécies (Guerra, 1988).

Yunis e Yasminesh (1971) propuseram importante papel para a heterocromatina na proteção de regiões vitais para o genoma e no auxílio de processos evolutivos de especiação. Os primeiros estudos de regiões heterocromáticas em peixes que utilizou a técnica de banda C foram com duas espécies de Salmonidae, realizado por Abel e Muramoto (1974). A técnica também pode ser utilizada para identificação de cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico (Almeida-Toledo, 1994).

A heterocromatina como atualmente compreendida, é uma classe da cromatina de replicação mais lenta e tardia e possui atividade transcricional baixa ou inexistente. A heterocromatina classificada como constitutiva é universalmente detectada pela técnica de bandamento C de Sumner (1972).

Os mecanismos que explicam a formação de bandas C não são inteiramente entendidos, mas a hipótese mais aceita é a de que o tratamento em solução ácida promove a despurinização da molécula de DNA, a qual sofreria quebras nos sítios apurínicos durante o tratamento alcalino, facilitando a extração do DNA quando da incubação na solução salina aquecida. As regiões de

heterocromatina seriam mais resistentes a essa remoção, permanecendo coradas por Giemsa (Kasahara, 2009).

Sumner (1990) acredita que a presença de proteínas não histônicas possa ser a responsável pela proteção da heterocromatina durante o ataque dos reagentes, tornando a extração do DNA heterocromático mais lento do que o eucromático.

Segundo Souza et al. (2001) a presença de heterocromatina nas regiões teloméricas e centroméricas facilita sua troca com outros cromossomos não - homólogos, podendo ocorrer posteriormente sua amplificação. Não pode ser descartada a hipótese da origem ocasional da heterocromatina por replicação espontânea saltatória de qualquer seqüência de DNA (Schweizer e Loidl, 1987).

Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) têm sido evidenciadas comumente pela técnica de impregnação por nitrato de prata, que permite localizar sítios ativos de genes ribossomais nos cromossomos (Howell e Black, 1980).

A presença de uma proteína acídica (nucleolina) nas RONs ativas na interfase anterior à mitose na qual a célula sofreu fixação, parece ser responsável pela coloração com nitrato de prata e na sua conseqüente identificação (Hsu et al. 1975). Assim, esta técnica pode ser considerada como método indireto de localização das RONs, uma vez que não há associação entre o nitrato de prata e os rDNA propriamente ditos, porém não universal (Artoni et al. 1999).

Segundo Gold (1979), a diferença de tamanho das RONs entre cromossomos homólogos pode ser decorrência não apenas de *crossing over* desigual, mas também devido à duplicação acidental do DNA ou distúrbios regionais na replicação do DNA.

Segundo Hsu et al. (1975), a ocorrência de RONs múltiplas deve ser uma situação derivada em relação a condição RONs simples. Algumas alternativas são propostas para explicar a presença de RONs múltiplas variáveis, em nível intraespecífico, intraindividual e populacional: ativação gênica diferencial, deleções, rearranjos cromossômicos dos tipos translocações e/ou transposição.

Fluorocromos

A coloração com fluorocromos base-específicos representa uma metodologia muito promissora e imprescindível nas análises cromossômicas de vertebrados, em especial entre os não-mamíferos, na medida em que pode caracterizar mais detalhadamente os cariótipos, condição de grande importância em citogenética comparativa (Kasahara, 2009).

Existem duas categorias de fluorocromos, com especificidade para as bases AT e para as bases GC, muitos deles são antibióticos, como é o caso, entre outros, da cromomicina A₃, mitramicina, olivomicina, ou não, como o 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI), o 4'-6-bis (2'-imidazolinil-4'-5'-H)-2-fenilindol (DIPI), 2'-2-(4-hidroxifenil)-6-benzimidazol-trihidroclorídrico (Hoechst 33258); e os resultados produzidos nos cromossomos podem ser variáveis, dependendo se são utilizados combinados ou não com outros corantes, em geral não-fluorescentes, com afinidade para bases AT, como a distamicina A (DA), ou para bases GC, como actinomicina D (AMD) (Kasahara, 2009).

Em alguns peixes, fluorocromos GC específicos apresentam uma notável relação com as RONS. A coincidência de localização entre as marcações obtidas pela aplicação de fluorocromos GC específicos e as resultantes da impregnação pelo nitrato de prata, seria possível, segundo Pendás et al. (1993), pelo fato da provável ocorrência de altos conteúdos de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou outras seqüências de DNA repetitivos adjacentes a eles. Desta forma, esta técnica permitiria a identificação das RONS independentemente de sua atividade durante o ciclo celular anterior. Entretanto, é importante ressaltar que, em várias espécies de peixes, vários sítios não associados à organização nucleolar também se mostram destacados pela cromomicina (Artoni et al. 1999; Kavalco et al. 2004; Vicari et al. 2006).

Mayr et al. (1988), estudando três espécies de salmonídeos, pôde constatar a presença de vários blocos heterocromáticos centroméricos ricos em bases A-T, quando tratados com DAPI/Actinomicina D, mostrando heterocromatina rica em bases AT nesses peixes. Regiões ricas em AT são raramente descritas em peixes, mas são encontradas em algumas espécies de Siluriformes (Artoni e Bertollo, 1999)

1.5. Estudos Citogenéticos da Família Loricariidae

Estima-se que aproximadamente 70 espécies da família Loricariidae já tenham sido estudadas citogeneticamente (Kavalco et al. 2005). Este grupo apresenta ampla variação no número diplóide que vai de 36 cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano–Caetano, 1998) a 96 cromossomos em *Upsilon* sp. (Kavalco et al. 2005).

Com base em dados obtidos de análise cladística, considerou-se $2n = 54$ como o número diplóide basal para esta família. Diferentes tendências de evolução cariótica foram verificadas em nível de diferentes subfamílias: Hypostominae e Loricariinae apresentam-se bastante diversificadas na macroestrutura cariótica, ao lado de outras, como Ancistrinae, que parecem ter uma estrutura cariótica mais conservada (Artoni e Bertollo, 2001). Contudo, mesmo entre os Ancistrinae têm sido verificado recentemente, com o aumento de espécies amostradas, que a presença de cromossomos sexuais diferenciados morfológica e de origem independente parece ser bastante representativa (Marioto et al. 2004; Oliveira et al 2007, 2008).

Artoni e Bertollo (2001) consideram que espécies com número diplóide acima de $2n = 54$, devam representar formas carióticas mais derivadas, especialmente verificadas no gênero *Hypostomus*.

Dentre os Loricariidae, situação bastante divergente é verificada para os Hypoptomatinae, onde se evidencia uma constância mais elevada quanto ao número cromossômico, variações quanto à localização das RONS e aos padrões de bandas C, diferenças morfológicas na macroestrutura dos cariótipos, presença de cromossomos supranumerários e sexuais (Andreatta et al. 1994).

Os casos de diferenças sexuais carióticas em peixes Neotropicais têm sido progressivamente informados, desde as primeiras descrições nos gêneros *Hoplias malabaricus* (Bertollo, 1978). Entre as espécies com cromossomos sexuais, 64% apresentam fêmeas heterogaméticas e 36% machos heterogaméticos. Oitenta por cento dos cromossomos sexuais correspondem ao sistema simples (77% ZZ/ZW e 23% XX/XY) e 20% correspondem a mecanismos de cromossomos sexuais múltiplos (Centofante et al. 2002).

Sete diferentes sistemas de determinação sexual têm sido detectados em peixes Neotropicais: ZZ/ZW, XX/XY, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY₁Y₂, XX/X0 ZZ/ZW₁W₂ e Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂, cada um caracterizado por determinada linha geral de eventos evolutivos (Oliveira e Feldberg, 2008). A presença de cromossomos sexuais na família Loricariidae, é apresentada na tabela a seguir.

Tabela 1.1 Sistemas de determinação sexuais, presente na família Loricariidae.

Espécie	Sistema Cromossômico	Referência
Hypostominae		
<i>Hypostomus ancistroides</i>	XX/XY	Michelle et al.(1977)
<i>Hypostomus macrops</i>	XX/XY	Michelle et al. (1977)
<i>Hypostomus</i> sp.	ZZ/ZW	Artoni et al. (1998)
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	ZZ/ZW	Mariotto et al. (2004)
<i>Ancistrus</i> n. sp. 1	XX/X0	Alves et al. (2006)
<i>Hemiancistrus spilomma</i>	ZZ/ZW	Oliveira et al. (2006)
<i>Ancistrus</i> sp. 1	XX/XY ₁ Y ₂	Oliveira e Feldberg, (2008)
<i>Ancistrus</i> sp. 2	Z ₁ Z ₁ Z ₂ Z ₂ /Z ₁ Z ₂ W ₁ W ₂	Oliveira e Feldberg, (2008)
Loricariinae		
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	ZZ/ZW	Scavone e Júlio Jr. (1995)
<i>Harttia carvalhoi</i>	XX/XY ₁ Y ₂	Centofante et al. (2006)
Hypoptopomatinae		
<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	XX/XY	Andreatta et al. (1992)
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	ZZ/ZW	Andreatta et al. (1994)
<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	ZZ/ZW	Andreatta et al. (1993)
<i>Hisonotus</i> sp.	ZZ/ZW	Andreatta et al. (1993)
<i>Otocinclus aff. vestitus</i>	ZZ/ZW	Andreatta et al. (1993)

Além da ocorrência de cromossomos sexuais, um aspecto também interessante entre os Loricariidae se refere à presença de cromossomos B relatados para diferentes espécies de distintas famílias de peixes, procedentes de diferentes bacias hidrográficas. Variações quanto ao número, tamanho e forma destes cromossomos supranumerários são freqüentes. Estes cromossomos

podem apresentar-se totalmente ou parcialmente heterocromáticos, embora existam casos de B totalmente eucromáticos (Moreira-Filho, 2006).

Em relação aos Loricariidae, Andreatta et al. (1993) observaram de 0 a 2 cromossomos B em *Hisonotus leucrofrenatus*, em 9 indivíduos, sendo estes cromossomos grandes e metacêntricos. Foram encontrados de 1 a 2 cromossomos B em *Microlepidogaster leucrofrenatus* (Andreatta et al. 1994), e em *Loricaria* sp e *Loricaria prolixa* foram descritos de 1 a 5 B (Scavone e Júlio Jr., 1994)

Em algumas espécies de peixes também já foram relatadas a presença de cromossomos B concomitantemente com a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais e de triploidia. Devido às peculiaridades dos cromossomos Bs no decorrer do seu processo evolutivo, ele vai se tornando diferenciado de parte ou do cromossomo do qual se originou. Assim, com o tempo, pode atingir um alto grau de diferenciação, impedindo que se encontre alguma estrutura que possa ser compartilhada com os cromossomos do complemento padrão, tornando-se, portanto, imprescindível resgatar sua história para entender sua origem (Moreira-Filho, 2006).

1.6. Citogenética da Subfamília Hypostominae

Esta subfamília é composta por 45 gêneros (Isbrucker, 1980), e em apenas cinco (*Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pogonopoma* e *Pterygoplichthys*) foram desenvolvidos algum tipo de trabalho citogenético (Giuliano–Caetano, 1998).

A maioria dos estudos citogenéticos já realizados são referentes ao gênero *Hypostomus* (Giuliano–Caetano, 1998). Este gênero de cascudo domina os rios brasileiros, apresentando número diplóide que varia de $2n = 52$ para *H. emarginatus*, descrita por Artoni e Bertollo, (2001), como (*Squaliforma emarginata*) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2–rio Perdido-MS, sendo que o número diplóide mais comum é de 72 (Cereali et al. 2008).

Pelo fato dos peixes do gênero *Hypostomus* não ser representado por espécies consideradas grandes migradoras e geralmente formarem pequenas populações (Britski et al. 1984), a fixação dos rearranjos cromossômicos nestas

populações pode ter sido facilitada (Rubert, 2007) por outros mecanismos ainda desconhecidos. Por outro lado, pode-se supor que a atual organização taxonômica do grupo não reflita um agrupamento natural de espécies.

Em conjunto, os dados disponíveis para os gêneros *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinielepis*, *Pogonopoma*, *Pterygoplichthys*, *Megalancistrus*, *Panaque*, *Ancistrus* e *Hemiancistrus* indicam que tanto rearranjos robertsonianos, quanto inversões pericêntricas atuaram no processo de diversificação cariotípica (Kavalco et al. 2005).

Situações polimórficas envolvendo número e posição das RONS, heterocromatinas supranumerárias e rearranjos estruturais são mais freqüentes. As regiões organizadoras de nucléolos se mostraram bastante diversificadas, sendo que no gênero *Hypostomus*, a situação de múltiplos organizadores nucleolares é mais freqüente. Estes dados, somados a estudos morfológicos, osteológicos, de estrutura populacional, comportamental e molecular, são de grande importância para o resgate da história da biologia evolutiva dos Loricariidae (Artoni, 1996).

1.7. Referências Bibliográficas

Abel, S., Muramoto, J., 1974. Differential staining of chromosomes of two salmonid species, *Salvelinus leucomaenis* (Pallis) and *Salvelinus malma* (Walbaum). Proc. Japan. Acad. 501: 507-511.

Almeida-Toledo, L.F., 1994. Técnicas de bandeamento na análise citogenética de peixes. Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada de peixes neotropicais. 5, Programa e Resumos. Instituto de Biociências – Unesp, Botucatu 74-77p.

Alves A.L., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F., 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. Genetica, 128: 1-8 p.

ANA, Agencia Nacional de Águas. O Turismo e o Lazer e sua interface com o setor de Recursos Hídricos. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/pnrh_novo/Tela_Apresentacao.htm > Acesso em: 11 de Março de 2006.

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

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

Andreato A.A., Almeida-Toledo, L.F., Oliveira, C., Toledo-Filho, S.A., 1994. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). 111. Analysis of seven species. *Caryologia*, 47: 27-37.

Armbruster, J.W., 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool. J. Linnean Soc.* 141: 1–80.

Artoni, R.F., 1996. Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 161p.

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

Artoni R.F., Bertollo, L.A.C., 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209–214.

Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C., 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201–210.

Baccaro, C.A., Medeiros, S.M., Ferreira, I.L., Rodrigues, S.C., 2004. Mapeamento geomorfológico da bacia do rio Araguari (MG). In: *Gestão do rio Araguari rumo ao desenvolvimento sustentável*. Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia/ Instituto de Geografia; Brasília; CNPq

Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O., 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1: 103-120 p.

Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., Galetti Jr., P.M., 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology* 28:153-159.

Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S., Moreira-Filho, O., 2000. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias*

malabaricus. Karyotypic survei, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8: 603-613.

Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S., 1984. Manual de identificação dos peixes da região de Três Marias, Minas Gerais (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3ed. CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca. Brasília, 143p.

Cereali, S.S., Pomini, E., Rosa, R., Zawadzki, C. H., Froehlich, O., Giuliano-Caetano, L. 2008. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7 (3): 583-591.

Centofante, L., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., 2002. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryol*, 55: 139-150.

Centofante, L., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., 2006. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosomes system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 112: 320-324.

Eletrobras, 1999. A contribuição do setor elétrico ao conhecimento de novos peixes/Centrals Elétricas Brasileiras, S.A. Área de meio Ambiente, Rio de Janeiro: 32p.

Feldberg, E., Rebelo Porto, J.I., Bertollo, L.A.C., 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon Region. I. Studies on the Genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Rev. Bras. Genet.*, 15: 369-383.

Ferreira, L.A., 2003. A geração de energia elétrica e os impactos socioambientais causados às populações rurais: A construção da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães. Curso de Pós-graduação apresentado à Universidade Federal do Tocantins, Planejamento e Gestão Ambiental, Palmas. 56-57 p.

Galetti Jr., P.M., Mestriner, C. A., Venere, P.C., Foresti, F., 1991. Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenetics and Cell Genetics*, Basel, 56 (2): 116-121.

Guerra, M.S., 1988. Introdução à Citogenética Geral. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 137p.

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

Gold, J.R., 1979. *Cytogenetics*. Fish Physiology, Academic Press, 8: 353-405.

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

Hsu, T.C., Spirito S.E, Pardue, M.L., 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genome. *Chromosoma*, 53: 41-51.

IGAM. Bacia do Rio Araguari. Disponível em: < www.igam.mg.gov.br/banco-de-noticias/1-ultimas-noticias>. Acesso em 05 de junho de 2010.

Isbrücker, I.J.H., 1980. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Verslagen en Technische Gegevens*, 22: 1-181.

Kasahara, S., 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. 1ª Ed. Ribeirão Preto. SBG, 160p.

Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., 2004. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, 141: 237-242.

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

Lewinsohn, T.M., Prado, P.I., 2002. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo. Contexto. 176 p

Lucinda, P.H.F., Freitas, I.S.A., Soares, B., Marques, E.E.C., Agostinho, S., Oliveira, R.J., 2007. Fish, Lajeado Reservoir, rio Tocantins drainage, State of Tocantins, Brazil. *Check List*, 3(2): 70-81.

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

Maistro, E.L., Oliveira, C., Foresti, F., 1998. Comparative cytogenetic and morphological analyses of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 201-206.

Maistro, E.L., Oliveira, C., Foresti, F., 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23 (2): 365-369.

Mayr, B., Kalat, M., Rab, P., 1988. Heterochromatins and band karyotypes in three species of salmonids. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 45-53.

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

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

Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C., 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Braz J Genet*, 14:331-357.

Moreira-Filho, O., 2006. Os cromossomos B em peixes neotropicais. XI Brazilian Symposium on fish cytogenetics and genetics I International Congresso of fish genetics, São Carlos. 253 p.

Nascimento, J.B., 2006. Conhecendo o Tocantins: história e geografia. Goiânia, Alternativa, 140p.

Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*. 4ª Ed. Canada, Edmonton, 601p.

Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F., Mori, L., Toledo-Filho, S. A., 1993. Cytogenetic and DNA content studies of armoured catfishes of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. *Brazil. J. Genet*, 16: 617-629.

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

Oliveira, R.R., Feldberg, E., Anjos, M.B., Zuanon, J., 2007. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 5: 301-306.

Oliveira, R.R., Feldberg, E., Anjos M.B., Zuanon, J., 2008. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and ZZZ₂Z₂/ZZ₂WW₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica*, 134: 243-249.

Oliveira, C., Foresti, F., Hilsdorf, A.W.S. 2009. Genetics of Neotropical Fish: From chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, 35: 81-100.

Paiva, S.R., Dergam, J.A., 1999. Padrões de semelhança de marcadores moleculares RAPD – PCR em populações de *Astyanax aff. bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae): implicações nas políticas de conservação da bacia do rio Paranaíba. São Carlos. XII Encontro Brasileiro de Ictiologia. 445p.

Paiva, L.R.S., Paiva, G.H.R.G; Alves, J.C.P, Oliveira, C., Foresti, F., 2009. Bandamento G versus compartimentalização genômica: o que os peixes nos ensinam? 1º Encontro de Citogenéticas. Água de Lindóia, 2623-2624.

Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., 1995. Encyclopedia of fishes. San Diego: Academia Press.

Pendás, A.M., Morán, P., Garcia-Vazquez, E., 1993. Multi-chromosoma location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. Chrom. Res.1: 63-67.

Reis, R.E., Weber, C., Malabarba, L.R., 1990. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae. Revue Suisse Zool, 97: 729 – 766.

Reis R.E., Kullander, S.O., Ferraris, Jr., C.J., 2003. Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre, Edipucrs,742p.

Ribeiro, M.C.L.B., Petreire, J.R.M., 1991. Life strategies of some long-distance migratory catfish in relation to hydroelectric dams in the Amazon basin. Biological Conservation, 55: 339-345.

Rubert, M., 2007. Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae). Dissertação, Universidade Estadual de Londrina, 92p.

Rubert, M., Zawadzki, C.H., Giuliano-Caetano, L., 2008. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). Neotropical Ichthyology, 6(1): 93-100.

Santos, L., Baccaro, C.A.D., 2004. Caracterização geomorfológica da bacia do Rio Tijucu. Caminhos de Geografia, 1(11): 1–21.

Scavone, M.D.P., Júlio Jr., H.F., 1994. Cytogenetics analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females (Loricariidae-Siluriformes) from the Paraná river basin. Revista de ictiologia, 2/3 (1/2): 41-44.

Scavone, M.D.P., Júlio Jr., H.F., 1995. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). Rev. Brazil. Genet, 18(1): 31–35.

Schweizer, D., Loidl, J., 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. Chromosomes Today, 9: 61–74.

Sczepanski, T.S., 2008. Caracterização cromossômica de espécies da família Ariidae (Teleostei, Siluriformes) pertencentes ao litoral Paranaense Curitiba – PR. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, 72p

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

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

Sumner, A.T., 1990. *Chromosome Banding*. Cambridge University Press. 434p.

Venere, P.C., Galetti Jr., P.M., 1989. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical *Characiformes* of the family *Curimatidae*. *Braz. J. Genetic*, 12:17-25.

Venere, P.C., Souza, I.L., Silva, L.K.S., Anjos, M.B., Oliveira, R.R., Galetti Jr., P.M., 2008. Recent chromosome diversification in the evolutionary irradiation of the freshwater fish *Curimatidae*. *Journal of Fish Biology*, 72: 1976-1989.

Vicari, M. R., Pazza, R., Artoni, R.F., Margarido, V. P., Bertollo, L. A. C., 2006. Cytogenetics and Biogeography: considerations about of natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú River. *Brasilian archives of biology and technology*, 49 (2): 297-303.

Weber, C., 2003. Subfamília Hypostominae. In: Reis, R.E., Kullander S.O., Ferraris, J.R., C.J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. Edipucrs, 351-395 p.

Yunis, J.J., Yasminesh, W.G., 1971. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. *Science*, 174: 1200-1209.

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

CAPÍTULO II

VARIABILIDADE DA MACRO E MICROESTRUTURA CARIOTÍPICA EM *Hypostomus* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) *

* Este artigo será submetido à publicação na revista Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.

2. VARIABILIDADE DA MACRO E MICROESTRUTURA CARIOTÍPICA EM *Hypostomus* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE).

Vanessa Carolina de Sena Correia, Sandra Morelli

A subfamília Hypostominae é composta por 45 gêneros, porém, em apenas cinco (*Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pogonopoma* e *Pterygoplichthys*) foram desenvolvidos estudos citogenéticos. *Hypostomus* é o gênero que apresenta o maior número de espécies cariotipadas. No presente trabalho são apresentados os resultados obtidos em quatro espécies do gênero *Hypostomus*: *H. regani*, *H. paulinus*, *H. margaritifer* e *H. strigaticeps*, coletados no rio Araguari e Tijuco, Uberlândia-MG; submetidos aos estudos citogenéticos por meio da coloração convencional, impregnação por nitrato de prata, bandamento-C e pelos fluorocromos CMA₃ e Hoechst 33258. Na análise convencional *H. regani* apresentou $2n = 72$, $10m+18sm+44st/a$; *H. strigaticeps* $2n = 74$, $6m+14sm+54st/a$; *H. margaritifer* $2n = 74$, $10m+24sm+40st/a$; com um indivíduo atípico apresentando o 1º par metacentric pair on the size, and *H. paulinus* $2n = 76$, $6m+12sm+58st/a$. A impregnação com nitrato de prata evidenciou RONS múltiplas para a maioria das espécies analisadas, com exceção de *H. paulinus*. A heterocromatina está distribuída nas regiões teloméricas e intersticiais. A coloração com CMA₃ revelou marcações positivas em *H. paulinus*, *H. margaritifer* e *H. strigaticeps*, e bandas negativas em *H. regani* e *H. margaritifer*. A coloração com Hoechst revelou bandas fluorescentes positivas em *H. regani* e *H. strigaticeps*. Os resultados obtidos no presente trabalho visam contribuir para uma melhor caracterização citogenética dos *Hypostomus* e compreensão da evolução tanto do grupo, quanto da família Loricariidae.

Palavras-chaves: *Hypostomus margaritifer*, fluorocromos, RONS e heterocromatina

2. VARIABILITY OF MACRO AND MICROSTRUCTURE KARYOTYPE ON *Hypostomus* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE).

Vanessa Carolina de Sena Correia, Sandra Morelli

The Hypostominae subfamily comprises 45 genera, and in only five (*Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinielepis*, *Pogonopoma* and *Pterygoplichthys*) some sort of cytogenetic work has been developed, being *Hypostomus* genus the largest in number of karyotyped species. Four species of the genus *Hypostomus* from Araguari and Tijuco rivers, Uberlândia-MG, were analyzed: *H. regani*, *H. paulinus*, *H. margaritifer* e *H. strigaticeps*, through cytogenetic techniques such as conventional staining, silver nitrate impregnation, C-banding and fluorochromes CMA₃ and Hoechst 33258. In the conventional analysis *H. regani* presented $2n = 72$, $10m+18sm+44st/a$; *H. strigaticeps* $2n = 74$, $6m+14sm+54st/a$; *H. margaritifer* $2n = 74$, $10m+24sm+40st/a$, with an individual presenting an unusual heteromorphic metacentric pair on the size, and *H. paulinus* $2n=76$, $6m+12sm+58st/a$. The impregnation with silver nitrate showed multiple NORs, for the most species examined, except *H. paulinus*. The heterochromatin is distributed in the interstitial and telomeric regions. Staining with CMA₃ showed positive markings for *H. paulinus*, *H. margaritifer* and *H. strigaticeps*, and negative bands in *H. regani*, *H. margaritifer*. Hoechst staining showed positive fluorescent bands in *H. regani*, *H. strigaticeps*. The results obtained in this study contribute to a better characterization of *Hypostomus* cytogenetics and understanding of evolution within the group and the Loricariidae family. *H. regani* and *H. margaritifer*. Hoechst staining showed fluorescent bands in *H. regani* and *H. strigaticeps*. The results obtained in this study contribute to a better cytogenetics characterization of *Hypostomus* and understanding of evolution within the group and the Loricariidae family.

Key words: *Hypostomus margaritifer*, fluorochromes, heterochromatin and NORs.

2.1. Introdução

Os Hypostominae, conhecidos como cascudos são peixes teleósteos, Siluriformes encontrados em diversos rios brasileiros. *Hypostomus* é o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros (Isbrücker, 1980), apresentando cerca de 130 espécies. Entretanto, sua correta identificação taxonômica é bastante difícil devido às discretas diferenças morfológicas entre as espécies (Zawadzki et al. 2002).

Os Hypostominae são restritos a água doce, com exceção de *Hypostomus watwata*, que vive em águas estuárinas; são espécies bentônicas que podem ser encontradas em bancos de areia ou rios rochosos. A maioria destes animais possui hábitos crepusculares e durante o dia ficam embaixo das pedras ou em troncos de árvores mortas (Weber, 2003).

A subfamília Hypostominae é composta por 45 gêneros (Isbrucker, 1980), e em apenas seis (*Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pogonopoma*, *Glyptoperichthys* e *Pterygoplichthys*) foram desenvolvidos algum tipo de trabalho citogenético, sendo *Hypostomus* o gênero que apresenta o maior número de espécies cariotipadas (Alves et al. 2006).

A maioria das subfamílias de Loricariidae apresenta uma predominância do número diplóide 52 e 54 cromossomos. Hypostominae é a que possui maior variação para o número diplóide, estando entre as que apresentam maior derivação cariotípica entre os Siluriformes (Alves, 2000).

A estrutura não conservada do cariótipo dos *Hypostomus* proporciona condições de caracterizar individualmente diferentes espécies, podendo-se considerar como caracteres diagnósticos alguns dados cromossômicos tais como: número diplóide, fórmula cromossômica, número e posição das RONS, além da quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva (Artoni, 1996).

Neste trabalho é apresentada a análise citogenética de quatro espécies do gênero *Hypostomus*, visando contribuir para uma melhor caracterização citogenética do gênero e uma melhor compreensão da evolução cromossômica tanto do grupo quanto da família Loricariidae.

2.2. Material e Métodos

Os pontos de amostragem foram o rio Araguari (S 18° 39. 395' W 048° 26 600', elevação 520m) e o rio Tijuco (S 19° 10. 006' W 048° 44. 212', elevação 638m) no município de Uberlândia–Minas Gerais.

Foram analisadas quatro espécies do gênero *Hypostomus* como apresentado na (Tabela 2.1). As espécies foram identificadas pelo pesquisador Cláudio H. Zawadzki e depositadas como testemunhos no Núcleo de Pesquisa em limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá.

Tabela 2.1. Número de espécies coletadas em relação aos pontos de amostragem

Espécie	Nº de indivíduos				Total de indivíduos
	Rio Araguari		Rio Tijuco		
<i>Hypostomus</i> cf. <i>regani</i> (Ihering, 1905)	5♂	5♀	2♂	2♀	14
<i>Hypostomus</i> cf. <i>paulinus</i> (Ihering, 1905)	—	—	5♂	3♀	8
<i>Hypostomus</i> aff. <i>margaritifer</i> (Regan, 1908)	1♂	2♀	1♂	1♀	5
<i>Hypostomus</i> <i>strigaticeps</i> (Regan, 1908)	—	—	—	1♀	1

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica convencional adaptada para estudos cromossômicos em peixes por Bertollo et al. (1978). Os cromossomos foram classificados em três grupos: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos – acrocêntricos (st-a), segundo sugestões de Levan et al. (1964), com modificações.

A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada pela impregnação por nitrato de prata (Howell e Black, 1980).

A heterocromatina constitutiva foi obtida por meio da técnica descrita por Sumner (1972). Para determinação dos sítios “ricos” em GC utilizou-se a técnica de coloração com cromomicina A₃ (Schimid, 1980) e Hoechst 33258 foi utilizado para o reconhecimento de regiões “ricas” em bases AT (Latt et al. 1974).

2.3. Resultados

Os estudos citogenéticos em *H. regani* (Fig. 2.1A) por meio da coloração convencional com Giemsa demonstraram um número diplóide de 72 cromossomos para ambos os sexos e populações, com fórmula cariotípica: 10m+18sm+44st/a. Pela impregnação por nitrato de prata foram evidenciados cinco cromossomos marcados (1sm, e 4st-a), com as RONS localizadas na posição terminal dos braços curtos dos pares 13, 17 e 33 e com ocorrência de heteromorfismos entre os homólogos (Fig. 2.1A). A heterocromatina foi localizada na região intersticial e telomérica da maioria dos cromossomos st-a e no centrômero de dois cromossomos submetacêntricos. O 1º par de metacêntricos se destaca por apresentar o braço longo praticamente todo heterocromático (Fig. 2.3B).

A coloração com CMA₃ evidenciou bandas negativas na maioria dos cromossomos (st-a), correspondendo aos blocos intersticiais e teloméricos de heterocromatina constitutiva. Observaram-se marcações positivas com CMA₃ no braço curto de três cromossomos não-homólogos (1sm e 2st-a). No Hoechst as regiões negativas evidenciadas com CMA₃ apresentaram-se positivas (Figs. 2.3C-D).

H. paulinus (Fig. 2.1B) apresentou número diplóide igual a 76 cromossomos para ambos os sexos, com fórmula cariotípica: 6m+12sm+58st/a. Duas regiões organizadoras de nucléolos foram observadas na região terminal do braço longo do par número 16 (st-a), apresentando heteromorfismo de tamanho entre os homólogos em 90% das células analisadas (Fig. 2.1B). A heterocromatina está distribuída na região intersticial e telomérica da maioria dos cromossomos st-a (Fig. 2.4B).

A coloração com CMA₃ evidenciou um par (st-a) marcado na região terminal do braço longo (Fig. 2.4C). Na coloração com Hoechst foram observadas bandas negativas (Fig. 2.4D).

H. margaritifer (Figs. 2.2A-B) apresentou número diplóide igual 74 cromossomos para ambos os sexos e populações, com: 10m+24sm+40st/a. O único indivíduo macho coletado no rio Araguari apresentou um heteromorfismo de tamanho no 1º par de metacêntrico (Fig. 2.2B), em todas as células analisadas

para este indivíduo, sendo este cariótipo atípico não verificado nas fêmeas das duas amostras populacionais (Fig. 2.2A) e dos outros dois indivíduos (♀ e ♂) coletados no rio Tijuco.

Por meio da impregnação por nitrato de prata foram evidenciadas variações entre os indivíduos, observando desde RONS localizada na região terminal do braço longo de um único cromossomo submetacêntrico a três cromossomos marcados (2sm não homólogos e 1a) no indivíduo com cariótipo atípico.

A heterocromatina esta distribuída na maioria dos cromossomos, na região centromérica, pericentromérica, intersticial e terminal, considerando que a localização na região terminal é a mais freqüente (Fig. 2.5E). O indivíduo de cariótipo atípico apresentou um metacêntrico heteromórfico com braço curto totalmente heterocromático, sendo este o maior do complemento cromossômico (Fig. 2.5B).

A coloração com CMA₃ evidenciou um cromossomo submetacêntrico marcado na região terminal (Fig. 2.5F), e bandas intersticiais e teloméricas negativas correlacionadas à presença de heterocromatina constitutiva (Figs. 2.5C-F).

O número diplóide de *H. strigiceps* (Fig. 2.2 C) é 74 cromossomos, com fórmula cariotípica: 6m+14sm+54st/a, verificando até cinco cromossomos portadores de RONS, localizadas em região intersticial no braço curto de dois submetacêntricos e em posição terminal em três subtlocêntricos-acrocêntricos (Fig. 2.2C).

Blocos de heterocromatina constitutiva foram observados na região terminal do braço longo de até sete cromossomos (st-a), sendo que a maioria apresenta blocos grandes (Fig. 2.6B).

A coloração com CMA₃ evidenciou quatro cromossomos (st-a) marcados na região terminal do braço longo e dois submetacêntricos com marcações intersticiais no braço curto (Fig. 2.6C). A coloração com Hoechst apresentou blocos grandes na região terminal de cromossomos (st-a), correspondendo à presença de heterocromatina constitutiva rica em AT (Fig. 2.6D).

Tabela 2.2 Resumo geral sobre a caracterização das espécies em relação ao número 2n, número fundamental, fórmula cariotípica, posição das RONS e Banda C.

Espécie	2n	NF	Fórmula Cariotípica	RONS	Banda C
<i>H. regani</i>	72	100	10m+18sm+44st/a	RONS múltiplas, teloméricas, braço curto e heteromórfica.	Centromérica, intersticial e telomérica.
<i>H. margaritifera</i>	74	108	10m+24sm+40st/a	RONS múltiplas, teloméricas, braço longo.	Centromérica, pericentromérica, intersticial e telomérica.
<i>H. strigaticeps</i>	74	94	6m+14sm+54st/a	RONS múltiplas, intersticiais e teloméricas.	Telomérica.
<i>H. paulinus</i>	76	94	6m+12sm+58st/a	RONS simples, teloméricas, braço longo e heteromórfica	Intersticial e telomérica.

2.4. Discussão

Os resultados obtidos pela coloração convencional com Giemsa mostraram uma variação do número diplóide de $2n = 72$ (*H. regani*) a $2n = 76$ (*H. paulinus*), sendo que o número diplóide mais comum observado no gênero está entre 72 e 76, segundo Rubert (2007). A Tabela 2.3 apresenta algumas espécies da família Hypostominae já estudadas. Verifica-se pelos dados apresentados que outras populações de *H. regani*, *H. margaritifera*, *H. paulinus* e *H. strigaticeps* apresentam fórmulas cariotípicas distintas daquelas aqui observadas, evidenciando tendências evolutivas distintas, devendo ser melhor testado o epíteto específico nestes casos.

Segundo o modelo alopátrico de Mayr (1977), após um isolamento geográfico, alterações cromossômicas podem ocorrer independentemente entre as populações separadas. Esta é uma hipótese que deve ser considerada para a diversificação em *Hypostomus*, podendo constituir um bom exemplo de especiação alopátrica, principalmente entre espécies encontradas em bacias

hidrográficas isoladas, ou seja, as diferenças cromossômicas encontradas devem representar um passo importante no sentido de separação dessas, em unidades evolutivas independentes.

Mesmo nessas espécies com maior fluxo gênico devido à alta vagilidade, como *H. regani*, rearranjos cromossômicos, do tipo robertsonianos, devem ter sido fixados no processo de especiação. Contudo, se os rearranjos cromossômicos precederam a especiação ou foram conseqüências de histórias evolutivas distintas, é uma questão bastante complexa e ainda em aberto (Artoni, 1996).

As populações de *H. regani* apresentam maior número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos do que *H. paulinus* que possui um maior número cromossômico, demonstrando que nas espécies com menores números diplóides predominam cromossomos com dois braços (m-sm), situação que de modo geral se inverte nas espécies com maiores números diplóides, onde predominam os cromossomos subtelo-acrocêntricos (Artoni, 1996).

Comparando-se os resultados deste trabalho (Tabela 2.2) com os presentes na literatura (Tabela 2.3), se observa diferenças entre as populações no que se refere a macro e micro-estrutura cariotípica. Os dados cariotípicos de *H. regani* ($2n = 72$), coincidem com aqueles verificados para as populações do rio Jacutinga e rio Tibaji – PR estudada por Rubert (2007), mas a fórmula cariotípica diverge dos resultados de Artoni (1996) e Alves et al. (2006). A espécie *H. paulinus* ($2n = 76$) difere em relação aos dados cariotípicos apresentados por Michelle et al. (1977), especialmente para o número diplóide com $2n = 74$ cromossomos.

H. margaritifera ($2n = 74$) apresentou número cromossômico e morfologia divergente das populações desta espécie estudadas por Lorscheider et al. (2009) e Penteado et al. (2009) com $2n = 72$ cromossomos. No presente trabalho, entre as três espécies amostradas no rio Araguari – MG observou-se um cariótipo atípico na única fêmea coletada, destacando o 1º par de metacêntricos heteromórfico presentes em todas as células analisadas. Artoni e Bertollo (1999) analisaram dois machos de *Hypostomus* sp. B e evidenciaram um cromossomo metacêntrico, com destaque por ser o maior do complemento, mas o número

cariotípico encontrado para esta espécie foi $2n=72$ e este correspondia ao 21^o cromossomo (st-a) do cariótipo que não possuía par.

O cariótipo de *Hypostomus* sp. B foi designado como atípico e Artoni e Bertollo, (1999) sugeriram duas explicações: A primeira seria a ocorrência de heteromorfismo de cromossomo sexual na espécie, mas a ocorrência de machos e fêmeas com cariótipo padrão (sem este cromossomo), não sustentaram este propósito. A segunda hipótese seria um polimorfismo na região pericentromérica heterocromática rica em GC amplificada de um cromossomo (st/a), originando um novo braço heterocromático em um dos cromossomos do par homólogo.

O cromossomo heteromórfico do cariótipo atípico de *H. margaritifer* apresentado neste trabalho, se parecia com outro metacêntrico ímpar, mas o fato de ser amostrado um único indivíduo com este polimorfismo dificultou a determinação da posição do par heteromórfico, devido à diferença de condensação das metáfases, contudo, não podemos descartar uma situação semelhante à verificada por Artoni e Bertollo (1999) em *Hypostomus* sp. B, dadas as evidências de localização (um braço totalmente heterocromático) e natureza (GC rica) da heterocromatina, ou ainda a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, necessitando um aumento da amostragem para testar estas hipóteses

Tabela 2.3 Dados citogenéticos para as espécies da subfamília Hypostominae.

Espécie	2n	Local	Morfologia	Ref.
<i>Glyptoperichthys gibbiceps</i>	52	Rio Oniroco-Venezuela	20m+24sm+8st	1
<i>Hypostomus affinis</i>	66	Córr. Jacuí-SP	14m+14sm+12st+26a	10
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	_____		13
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	Córr. Monjolinho-SP, Rio Mogi Guaçu-SP	16m+18sm+34st/a	2
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	Rio Araquá-SP.	18m+10sm+12st+28a	1
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	Rib. Três Bocas-PR; Rio Taquari-PR; Águas das Pedras-R; Rio Tibaji-PR; Rio Águas do Pato-SP.	10m+26sm+32st/a	18
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	Rio Piracicaba-SP	10m+20sm+44st/a	7
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	Rio Mogi Guaçu-SP	10m+20sm+44st/a	2
<i>Hypostomus aff. auroguttatus</i>	76	Rio Mogi Guaçu-SP	8m+30sm+38st/a	2
<i>Hypostomus cochliodon</i>	64	Córr. Salobrinha, Rio Salobra- MS		9
<i>Hypostomus commersoni</i>	68	Quedas do Iguaçu-PR	10m+18sm+8st+32a	8
<i>Hypostomus derby</i>	66	Parque Costa Curitiba-PR		12
<i>Hypostomus derby</i>	68	Quedas do Iguaçu-PR	10m+8sm+16st+34a	8
<i>Hypostomus goyazensis</i>	72	Rio Vermelho-GO	10m+16sm+10st+36a	1
<i>Hypostomus macrops</i>	68	_____	10m+14sm+44st/a	13
<i>Hypostomus margaritifer</i>	72	Rio Piquiri-PR	10m+16sm+14st+32a	11
<i>Hypostomus margaritifer</i>	72	Rio Pardo-SP	32m/sm+40st/a	17

Tabela 2.3:Continuação

Espécie	2n	Local	Morfologia	Ref.
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	Rio Mogi Guaçu-SP	8m+20sm+48st/a	18
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	Rib. Três Bocas-PR; Rio Tibaji-PR	6m+20sm+50st/a	18
<i>Hypostomus paulinus</i>	74	_____	10m+20sm+44st/a	13
<i>Hypostomus paulinus</i>	76	Rib. Três Bocas-PR; Rio Tibaji-PR	6m+16sm+54st/a	18
<i>Hypostomus plecostomus</i>	54	_____	38m+sm+18st/a	14
<i>Hypostomus regani</i>	72	Rio Mogi Guaçu-SP	10m+20sm+42st/a	2
<i>Hypostomus regani</i>	72	Rio Araquá-SP	12m+18sm+26st+16a	1
<i>Hypostomus regani</i>	72	Rio Jacutinga-PR; Rio Tibaji-PR	10m+18sm+44st/a	18
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	74	Rio Mogi Guaçu-SP.	8m+4sm+62st	13
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	Rib. Três Bocas-PR; Rio Jacutinga-PR; Rio Taquari-PR; Águas das Pedras-PR; Rio Tibaji-PR; Rio Águas do Pato-SP.	10m+16sm+46+st/a	18
<i>Hypostomus tietensis</i>	68	Rio Paranapanema-SP	14m+12sm+42st	15
<i>Hypostomus unae</i>	76	Rio das Contas, Rio Oricó, Rio Criciúma-BA		6
<i>Hypostomus</i> sp.	64	_____		3
<i>Hypostomus</i> sp. A	70	Rib. Rincão-SP	18m+14sm+38st/a	2
<i>Hypostomus</i> sp.B	72	Rib. Rincão-SP; Rio Mogi Guaçu-SP	12m+18sm+42st/a	2
<i>Hypostomus</i> sp.B	72	Rio Mogi Guaçu-SP	13 m+18sm+41st/a	4
<i>Hypostomus</i> sp.C	72	Rio Mogi Guaçu-SP	6m+18sm+44st/a	2
<i>Hypostomus</i> sp.D	72	Rio Mogi Guaçu-SP	1º(10m+26sm+36st/a) 2º(14m+20sm+38st/a)	2
<i>Hypostomus</i> sp.E	80	Rio Mogi Guaçu-SP	8m+16sm+56st/a	2
<i>Hypostomus</i> sp.F	76	Rio São Francisco;Três Maria-MG	10m+16sm+50st/a	2
<i>Hypostomus</i> sp.	80	Córr. da Lapa; Rio Passa-Cinco-PR		19

Tabela 2.3:Continuação

<i>Hypostomus</i> sp 2	84	Rio Perdido-MS	6m+16sm+62st/a	9
<i>Hypostomus</i> sp 3	82	Córr. Salobrinha-MS	6m+14sm+62st/a	9
<i>Liposarcus</i> sp.	52	Rio Preto-SP	16m+24sm+8st+4a	2
<i>Liposarcus anisitsi</i>	52	Rio Piracicaba-SP	16m+28sm+6st+2a	7
<i>Liposarcus anisitsi</i>	52	Rio Tietê-SP	28m+12sm+8st+4a	1
<i>Liposarcus anisitsi</i>	52	Rio Miranda-MS	8m+14sm+14st+16a	1
<i>Liposarcus multiradiatus</i>	52	Rio Orinoco - Venezuela	22m+18sm+12st	1
<i>Pogonopoma wertheimeri</i>	54	Rio Mucuri Taquarinha -BA	20m+30sm+4st	5
<i>Pterygoplichthys joselimaianus</i>	52	Lago Quatro Bocas - MT	28m+16sm+8st/a	16
<i>Rhinelepis aspera</i>	54	Rio Paraná Guairá – PR	20m+26sm+8st	5

1. Alves *et al.* (2006), 2. Artoni (1996), 3. Artoni *et al.* (1998), 4. Artoni e Bertollo (1999), 5. Artoni e Bertollo (2001), 6. Bitencourt *et al.* (2008), 7. Camilo (2004), 8. Casale *et al.* (2002), 9. Cereali *et al.* (2008), 10. Kavalco *et al.* (2005), 11. Lorscheider *et al.* (2009), 12. Maurutto *et al.* (2008), 13. Michelle *et al.* (1977), 14. Muramoto *et al.* 1968, 15. Oliveira e Foresti (1993), 16. Oliveira *et al.* (2006), 17. Penteado *et al.* (2009) 18. Rubert (2007), 19. Traldi *et al.* (2008).

As análises de *H. strigiceps* ($2n = 74$), coincidem em número diplóide com o trabalho de Michelle *et al.* (1977), divergindo em relação a fórmula cariótica analisada por esta mesma autora e Rubert (2007), reforçando a possibilidade de variações geográficas ou até mesmo especiação alopátrica.

Em síntese, as diferenças entre os citótipos são resultados de dificuldades no pareamento ou classificação cromossômica, devido ao valor da relação de braços (RB) muitas vezes estar próxima aos limites estabelecidos, ou ainda pode estar relacionado à diferença na condensação relativa entre alguns cromossomos, ou serem resultados de rearranjos ocorridos entre as populações, ou até mesmo erro na identificação das espécies.

Em três das espécies analisadas (*H. regani*, *H. margaritifera*, *H. strigiceps*) observou-se RONS múltiplas, com variação de número e tamanho entre os indivíduos da mesma espécie, corroborando um alto nível de variação já demonstrado anteriormente neste gênero em nível de microestrutura cariotípica (Artoni e Bertollo, 2001; Rubert *et al.* 2008). Em *H. regani* a variação de RONS é

mais freqüente, evidenciando de 4 a 6 cromossomos (st-a) marcados no telômero do braço curto.

Nas espécies que possuem um único par de organizadores nucleolares, as duas Ag-RONs aparecem em geral marcadas em todas as metáfases, mas com freqüência são heteromórficas. As variações nos padrões de Ag-RON podem ser decorrentes de atividade gênica diferencial, ser devido a diferentes quantidades de unidades de transcrição e até mesmo de ausência total de seqüências de DNAr (Kasahara, 2009). Segundo Markovic et al. (1978), a diferença no tamanho das NORs entre cromossomos homólogos é possivelmente resultante da provável duplicação em tandem de uma das NORs ou são resultados de permutas desiguais, podendo ainda ser transmitidos por herança.

A coloração com cromomicina A₃ mostrou que em todas as espécies, as Ag-RONs estão associadas às heterocromatinas CMA₃⁺. Uma exceção parece ser *H. regani*, espécie na qual apenas três das cinco regiões organizadoras de nucléolos aparecem como regiões CMA₃⁺.

O padrão de banda C, nas quatro espécies analisadas, evidenciou marcas nas regiões terminais em cromossomos (st-a) e intersticiais (com exceção de *H. strigaticeps*), e no centrômero de dois cromossomos submetacêntricos em *H. regani*, *H. margaritifer* e *H. paulinus*.

Rubert (2007) analisou 62 exemplares de *H. strigaticeps* provenientes do ribeirão Três Bocas e rio Jacutinga e observou polimorfismos intra e interpopulacionais. Todos os exemplares apresentaram em comum a presença de heterocromatina na região pericentromérica de um par metacêntrico, correspondente ao 3º par do complemento, observando variações correspondentes aos pares 18, 28, 29 e 31. Neste trabalho observou-se em *H. strigaticeps* heterocromatina apenas nas regiões teloméricas.

As espécies *H. regani* e *H. margaritifer* apresentaram bandas negativas a coloração com CMA₃, e *H. strigaticeps* e *H. regani* bandas fluorescentes com Hoechst, indicando que a heterocromatina é possivelmente rica em bases AT. Regiões ricas em AT são raramente descritas em peixes, mas são encontradas em algumas espécies de Siluriformes (Artoni e Bertollo, 1999; Rubert, 2007; Garcia, 2005; Traldi et al. 2008).

Segundo Artoni e Bertollo (1999), as espécies do gênero *Hypostomus*, apresentam diversidade cariotípica morfológica e numérica, que parece acompanhar sua variabilidade na natureza. Isso sugere que estes peixes passam por um extenso processo de diferenciação, e indicam que o grupo apresenta uma evolução cromossômica microestrutural bastante divergente, corroborado pelos dados aqui apresentados.

De maneira geral os dados apresentados são bastante relevantes em relação à subfamília Hypostominae, mostrando uma variabilidade no comportamento das heterocromatinas, RONS e polimorfismo cromossômico em *H. margaritifera*, que possibilitam em seu conjunto uma boa caracterização de novas populações.

Essas informações são importantes, pois auxiliam na compreensão de alguns dos mecanismos associados ao isolamento geográfico e especiação no grupo. Dentro das possibilidades, se faz necessário o complemento dos estudos com outras técnicas mais modernas, como FISH para a correta interpretação dos rearranjos cromossômicos, e mesmo os estudos com base em marcadores moleculares como, por exemplo, a utilização de DNA mitocondrial com o objetivo de melhor caracterizar cada uma das populações estudadas.

2.5. Referências

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

Alves, A.L., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, 128: 1-8 p.

Artoni, R.F., 1996. Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 161p.

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

Artoni R.F., Bertollo, L.A.C., 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209–214.

Artoni, R.F., Bertollo, L.A., 2001. Trends in karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201-210.

Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira Filho O., 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1: 103-120 p.

Bitencourt, J.A., Affonso, P.R.A.M., Carneiro, P.L.S., Giuliano-Caetano, L., Dias A.L., 2008. Estudos citogenéticos de *Hypostomus unae* (Hypostominae, Loricariidae) na bacia do rio das Contas (BA). XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Uberlândia. 139p.

Camilo, F.M., 2004. Estudos Citogenéticos em algumas espécies de peixes da família Loricariidae pertencentes à Bacia do rio Piracicaba. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 76p.

Casale, V.C., Tchaicka, L., Pegoraro, J.L., Margarido, V.P., 2002. Relações filogenéticas em quatro espécies de *Hypostomus* (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) baseados em análise citogenética, dados de isoenzimas e coloração de corpo. IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Maringá –PR.

Cereali, S.S., Pomini, E., Rosa, R., Zawadzki, C. H., Froehlich, O., Giuliano-Caetano, L., 2008. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7 (3): 583-591.

Garcia, C., 2005. Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 88p.

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

Isbrücker, I.J.H., 1980. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Verslagen en Technische Gegevens*, 22: 1-181.

Kasahara, S., 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. 1ª Ed. Ribeirão Preto. SBG, 160p.

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

Latt, S.A., Davidson, R.L., Lins, M.S., Gerald, P.S., 1974. Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33258 Hoechst. *Experientia Cellular Research*, 87: 425-429.

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

Lorscheider, C.A., Martins, I.C., Margarido, V.P.R., Lui, L., Vicari, M.R., 2009. Primeiros dados citogenéticos de *Hypostomus margaritifer* (Siluriformes, Loricariidae) coletada no rio Piquiri, Paraná. XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Ponta Grossa. 19p.

Mayr, E., 1977. Sinbling or cryptic species among animals. In: *Evolution and diversity of life*. The Berknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 721p.

Markovic, V.D., Worton, R.G., Berg, J.M., 1978. Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. *Hum. Genet.*, 41: 181-187.

Maurutto, F.A.M., Manvailer, L.F.S., Cestari, M.M., Artoni, R.F., 2008. Caracterização citogenética de *Hypostomus derbyi* (Loricariidae, Hypostominae). XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Uberlândia. 101p.

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

Muramoto, J., Ohno, S., Atkin, N.B., 1968. On the diploid state of the fish Order Ostariophysi. *Chromosoma*, 24: 59-66.

Oliveira, C., Foresti, F., 1993. Cariótipo, RONS e Bandas C de *Hypostomus tietensis* (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). X Encontro Brasileiro de Ictiologia. São Paulo. 174p.

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

Penteado, P.R., Brandão, K.O., Kavalco, K.F., Pazza, R., Almeida-Toledo, L. F., 2009. Diversidade cromossômica e distribuição de heterocromatina constitutiva no gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Ponta Grossa. 105p.

Reis, R.E., Weber, C., Malabarba, L.R., 1990. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae. *Revue Suisse Zool*, 97: 729 – 766.

Rubert, M. 2007. Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae). Dissertação, Universidade Estadual de Londrina, 92p.

Rubert, M., Zawadzki, C.H., Giuliano-Caetano, L., 2008. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(1): 93-100.

Schimid, M., 1980. Chromosome banding in Amphibia: IV: Differentiation of CG and ar rich chromosomes regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.

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

Traldi, J.B., Blanco, D.R., Martinez, J.F., Lui, R.L., Moreira-Filho, O. 2008. Caracterização citogenética de *Hypostomus* sp (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) do rio Passa- Cinco. XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Uberlândia. 153p.

Weber, C. 2003. Subfamília Hypostominae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, J.R., C.J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. Edipucrs, 351 - 395 p.

Zawadzki, C.H., Weber, C., Pavanelli, C.S., Renesto, E., 2002. Morphological and biochemical comparison of two allopatrid populations of *Hypostomus margaritifer* (Regan, 1907) (Osteichthyes, Loricariidae) from the upper Paraná River basin, Brazil. *Acta Scientiarum Maringá*, 24(2): 499-505.

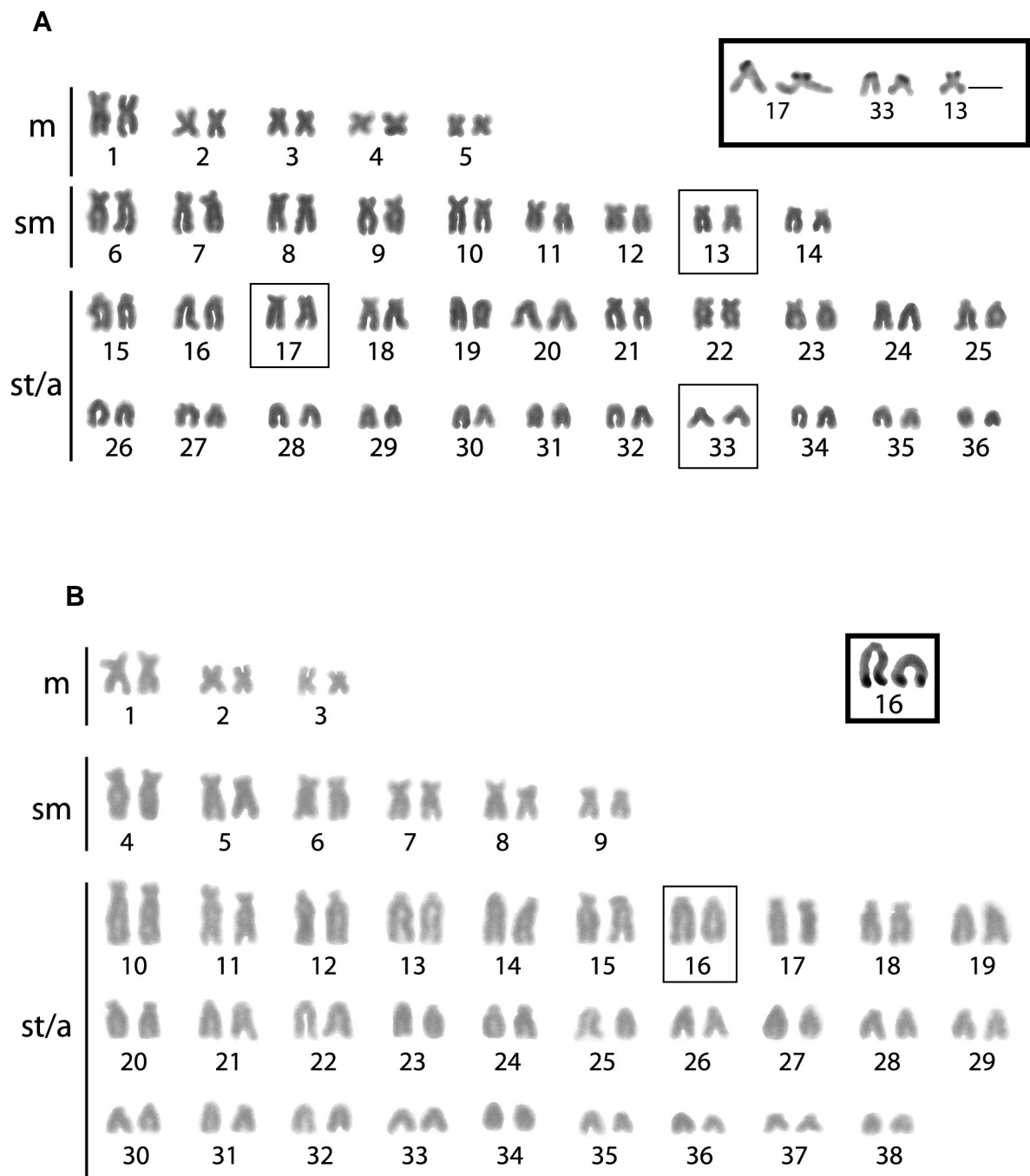


Fig. 2.1 Cariótipos corados por Giemsa e RONS: **A)** *H. regani* $2n=72$; **B)** *H. paulinus* $2n=76$. Os cromossomos portadores das RONS se encontram em destaque no Box.

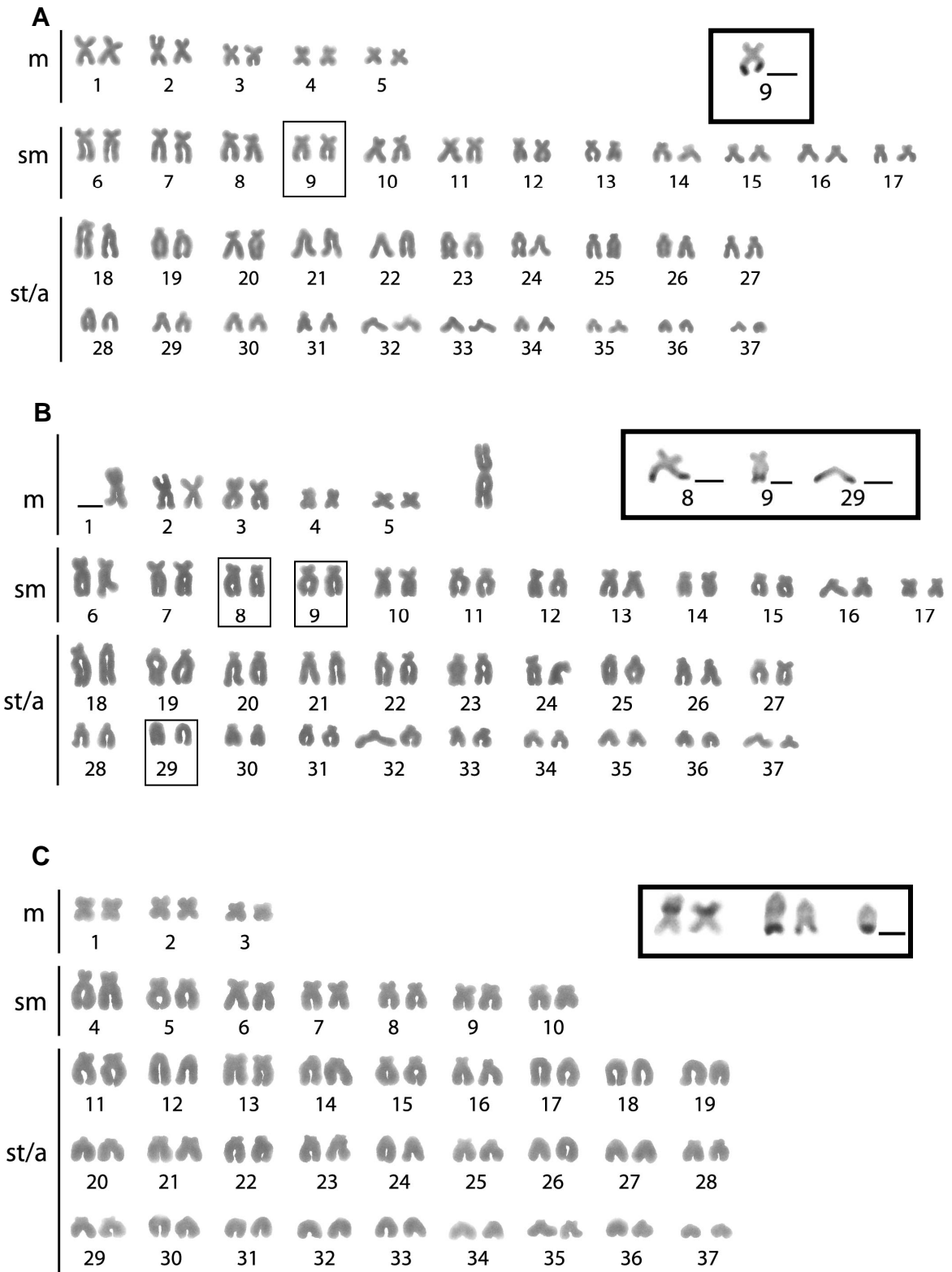


Fig. 2.2 Cariótipos corados por Giemsa e RONS: **A)** *H. margaritifer* $2n=74$; **B)** *H. margaritifer* (cariótipo atípico) $2n=74$ **C)** *H. strigaticeps* $2n=76$. Os pares portadores das constrições secundárias se encontram em destaque. No Box os cromossomos portadores das RONS.

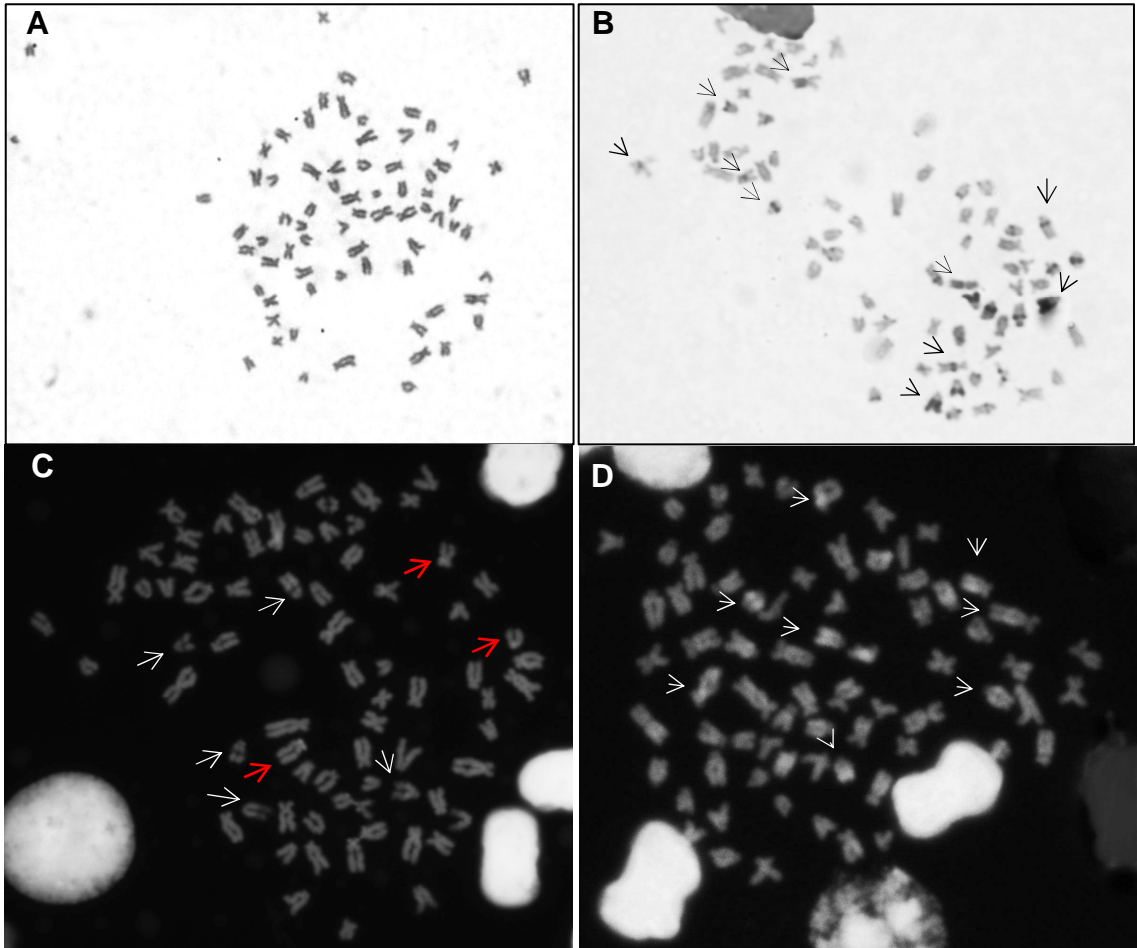


Fig. 2.3 Metáfases de *H. regani* coradas por: **A)** Giemsa; **B)** Banda-C; **C)** CMA₃ **D)** Hoechst. As setas em **(B)** indicam a presença de heterocromatina **(C)** as setas em branco indicam CMA₃⁻, e as vermelhas as regiões CMA₃⁺ ricas em GC **(D)** as regiões ricas em AT.

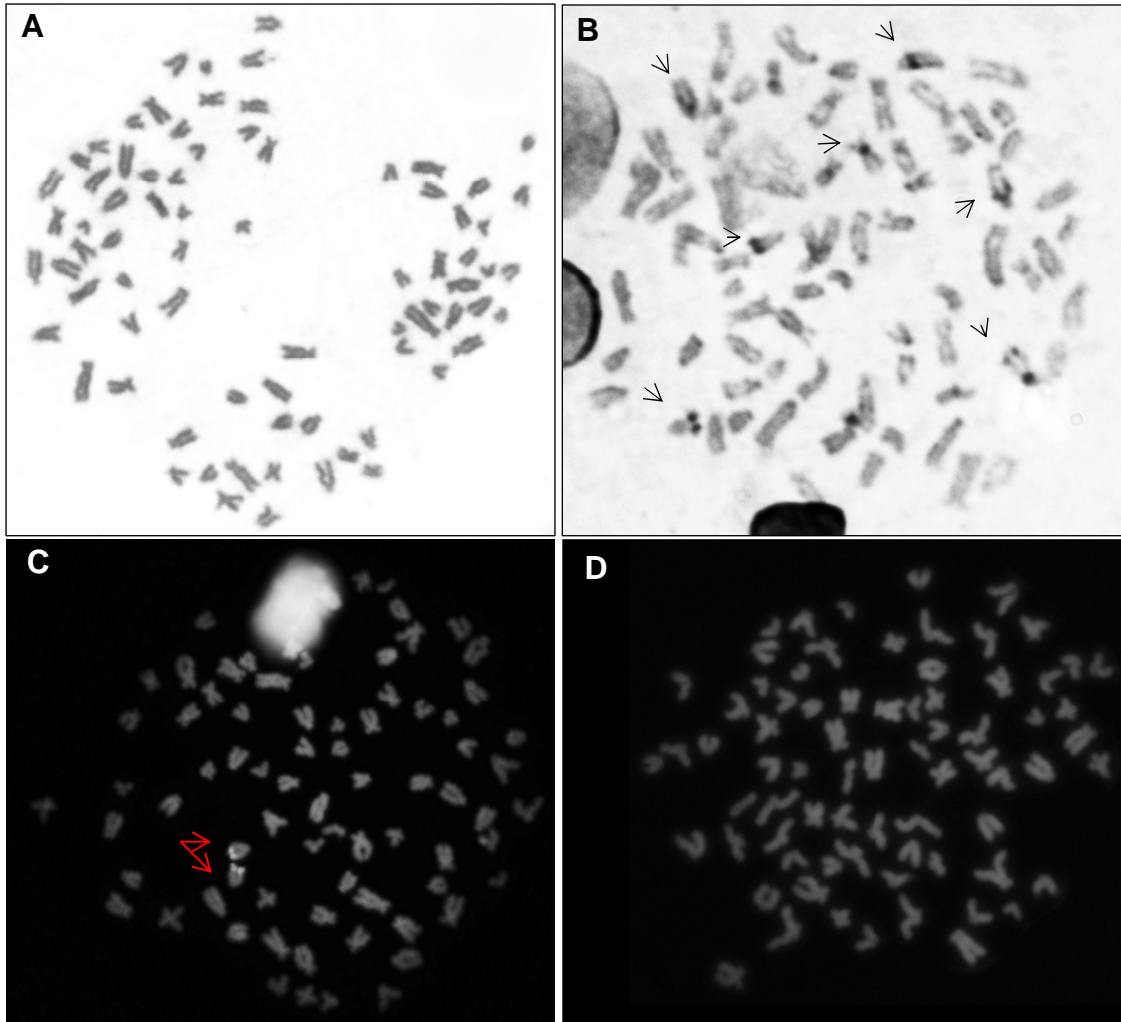


Fig. 2.4 Metáfases de *H. paulinus* coradas por: **A)** Giemsa; **B)** Banda-C; **C)** as setas em vermelho indicam as regiões CMA₃⁺ ricas em GC; **D)** Hoechst. As setas em **(B)** indicam a presença de heterocromatina e as setas em **(C)** indicam as regiões ricas em GC.

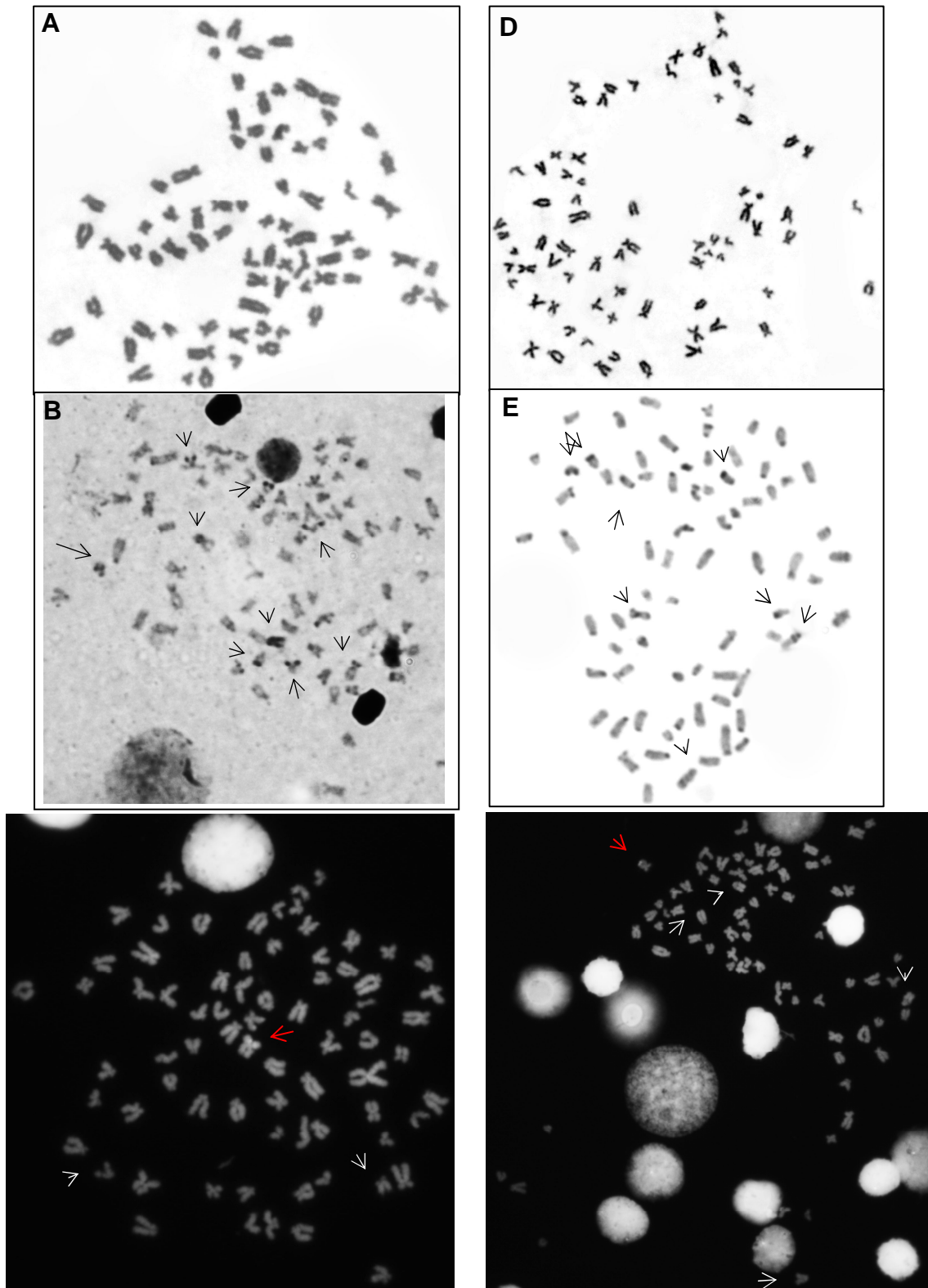


Fig. 2.5 Metáfases atípica de *H. margaritifera* (A, B, C) e comum (D, E, F) coradas por: (A, D) Giemsa; (B, E) Banda-C; (C, F) CMA₃. As setas em (B, E) indicam a presença de heterocromatina e as setas em (C, F) as setas em branco indicam CMA₃⁻, e as vermelhas as regiões CMA₃⁺ ricas em GC.

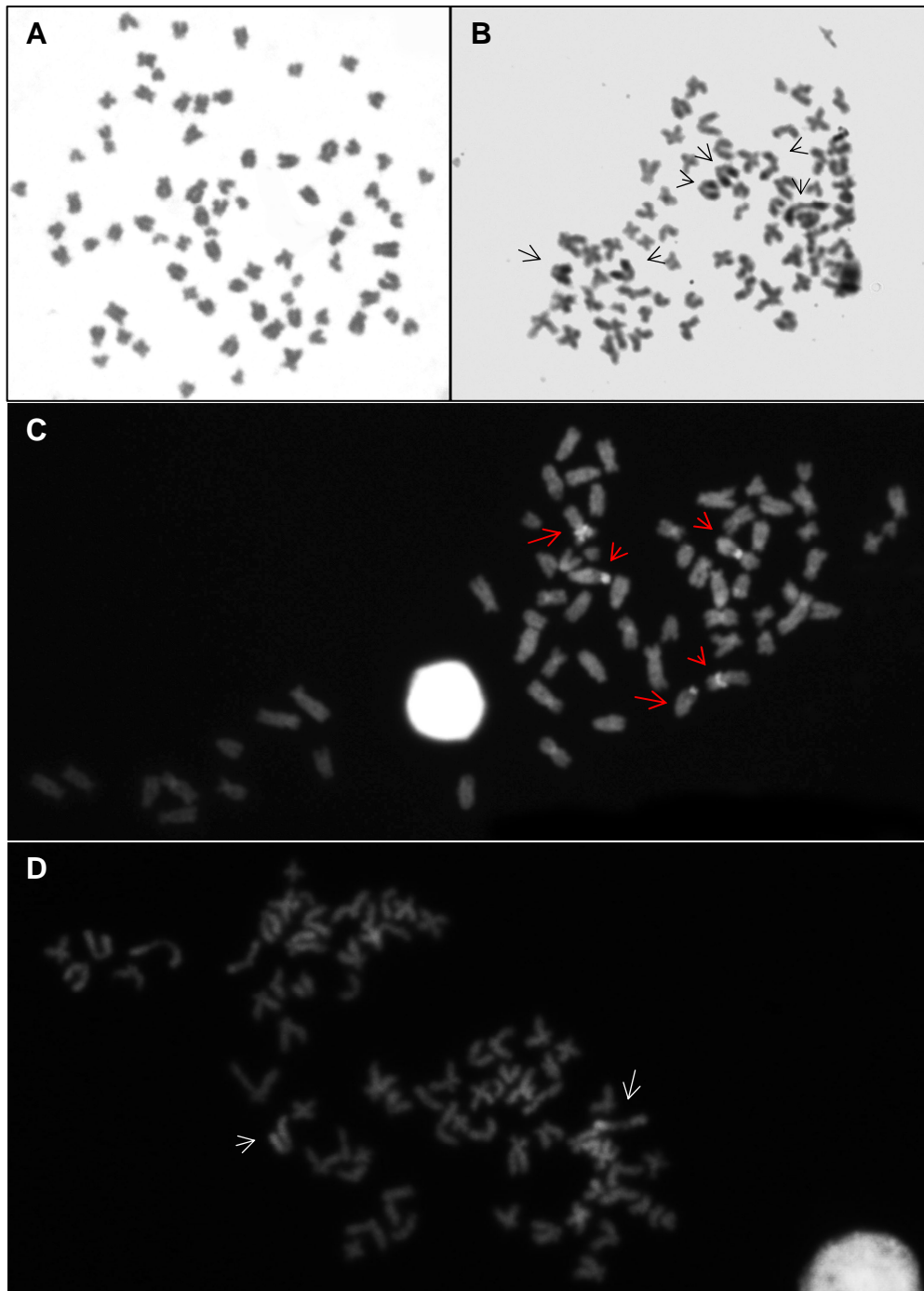


Fig. 2.6 Metáfases de *H. strigaticeps* coradas por: **A)** Giemsa; **B)** Banda-C; **C)** as setas em vermelho indicam as regiões CMA₃⁺ ricas em GC;; **D)** Hoechst. As setas em **(B)** indicam a presença de heterocromatina e as setas em **(C)** indicam as regiões ricas em GC e em **(D)** as regiões ricas em AT.

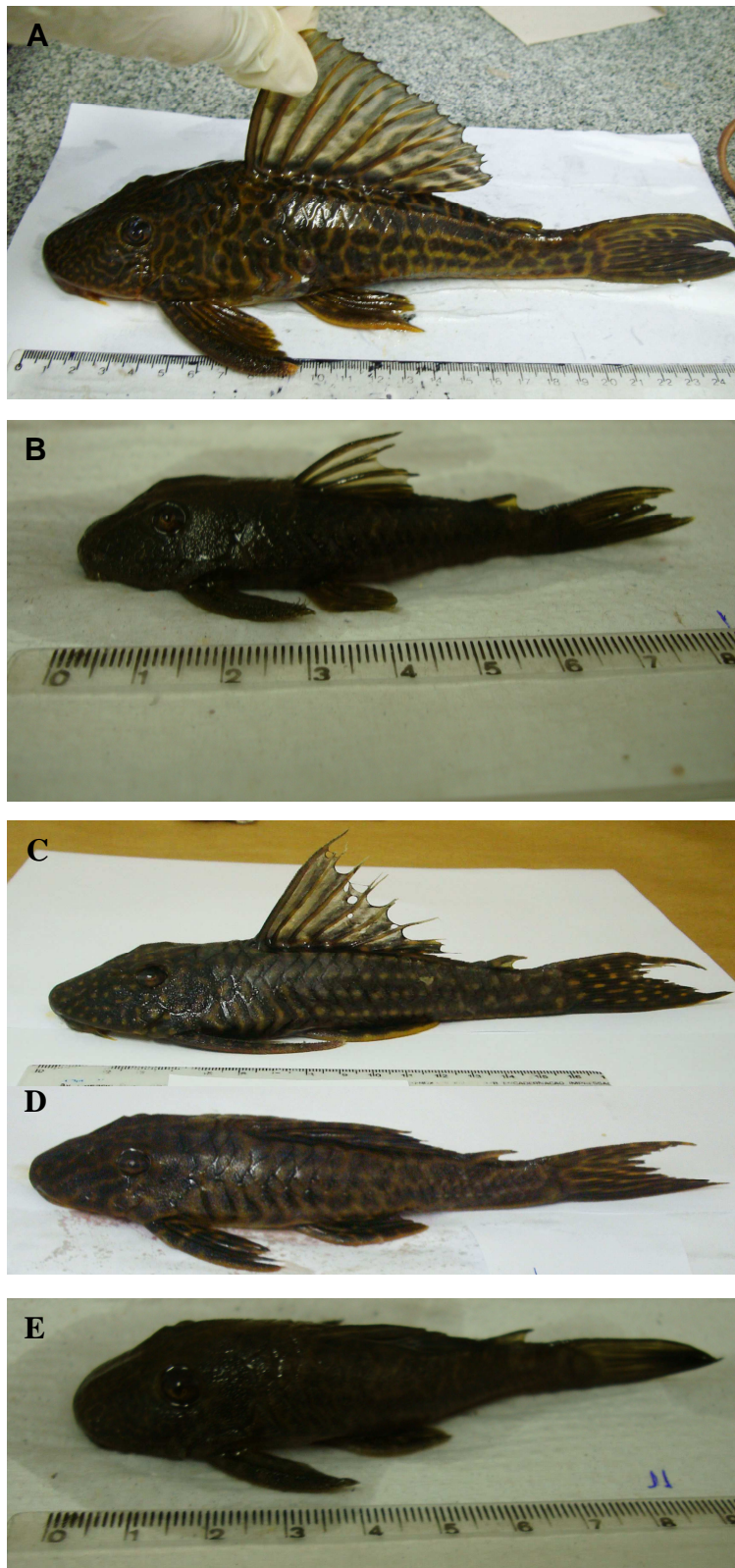


Fig. 2.7. Fotos de exemplares: **A)** *H. regani* (♂) coletado no rio Araguari; **B)** Exemplar de *H. paulinus* (♀) coletado no rio Tijuco; **C)** *H. margaritifer* (♂) cariótipo atípico e **D)** *H. margaritifer* (♀) cariótipo comum coletados no rio Araguari; **E)** *H. strigaticeps* (♀) coletado do rio Tijuco.

CAPÍTULO III

ANÁLISE CITOGÉNÉTICA DE *Squaliforma emarginata* E *Pterygoplichthys joselimaianus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE). PERTENCENTES AO RESERVATÓRIO DO RIO TOCANTINS, PORTO-NACIONAL-TO *

*

* Este artigo será submetido à publicação na revista Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.

3. Análise Citogenética de *Squaliforma emarginata* e *Pterygoplichthys joselimaianus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae) Pertencentes ao Reservatório do Rio Tocantins, Porto Nacional-TO.

Vanessa Carolina de Sena Correia, Sandra Morelli

Estima-se que aproximadamente 70 espécies dessa família Loricariidae já tenham sido estudadas citogeneticamente. Dentro desta família, a subfamília Hypostominae apresenta a maior quantidade de estudos citogenéticos, e para acrescentar estes dados, este trabalho teve como objetivo caracterizar o cariótipo de *Squaliforma emarginata*, que é citada por Artoni et al. (2001) como *Hypostomus emarginatus* e *Pterygoplichthys joselimaianus*. Os exemplares foram coletados em Porto–Nacional-TO, no reservatório formado com o represamento das águas do rio Tocantins, com a implantação da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães. Realizou-se estudos citogenéticos por meio da coloração convencional, impregnação por nitrato de prata, bandamento-C e pelos fluorocromos cromomicina A₃ e Hoechst 33258. A análise convencional confirmou o $2n = 52, 14m+36sm+2st$ para *S. emarginata* e $2n = 52, 20m+22sm+10st$ para *P. joselimaianus*. A impregnação com nitrato de prata em *S. emarginata* evidenciou variação no padrão de RONS múltiplas entre os indivíduos enquanto *P. joselimaianus* apresentou RONS simples. A heterocromatina está distribuída nas regiões teloméricas e intersticial of most chromosomes. A coloração com CMA₃ apresentou marcações positivas em *S. emarginata* correspondentes a heterocromatina associada à AgRONS, enquanto o corante Hoechst evidencou bandas negativas em ambas as espécies. Os resultados obtidos no presente trabalho têm como finalidade compreender alguns dos possíveis mecanismos de evolução cromossômica, fornecer alguns subsídios para a taxonomia do grupo e contribuir com estudos futuros relacionados à conservação destas espécies.

Palavras-chaves: cariótipo, fluorocromos, RONS e heterocromatina.

3. Cytogenetic Analysis of *Squaliforma emarginata* and *Pterygoplichthys joselimaianus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae) belonging to the reservoir Tocantins river, Porto Nacional-TO.

Vanessa Carolina de Sena Correia, Sandra Morelli

It is estimated that approximately 70 species of the Loricariidae family have been studied cytogenetically. This study aimed to characterize the karyotype of *Squaliforma emarginata*, which is cited by Artoni et al. (2001) as *Hypostomus emarginatus* and *Pterygoplichthys joselimaianus*. Specimens were collected in Porto – Nacional -TO, the reservoir formed by damming the waters of the Tocantins River, for the implementation of the Power Plant Luis Eduardo Magalhaes. We performed cytogenetic studies by conventional staining, silver nitrate impregnation, C-banding, fluorochromes, CMA₃ and Hoechst. The conventional analysis of *S. emarginata* showed $2n=52$, $14m+2sm+36st$ and *P. joselimaianus* $2n=52$, $20m+22sm+10st$. Impregnation with silver nitrate in *S. emarginata* showed variation in the pattern of NORs between individuals, while *P.joselimaianus* showed single NORs. The heterochromatin is distributed in the interstitial and telomeric regions. Staining with CMA₃ showed positive markings in *S. emarginata* corresponding to heterochromatin associate the AgRONS, while the dye Hoechst showed negative bands in both species. In *P. joselimaianus* staining CMA₃⁺ showed heterochromatin rich in GC, confirmed whit Hoechst negative staining. The results obtained in this study are intended to understand the mechanism of evolution, to explain the taxonomic determinations and contribute to future conservation studies for these species

Key words: karyotype, fluorochrome, NORs and heterochromatin.

3.1. Introdução

A família Loricariidae pertence à ordem de Siluriformes e possui aproximadamente 683 espécies válidas, distribuídas na região Neotropical desde o norte da Costa Rica ao sul da Argentina. A maioria das espécies é encontrada ao leste dos Andes, existindo também várias espécies que são restritas à encosta oeste desta cadeia de montanhas (Reis et al. 2003).

Os Loricariidae, conhecidos popularmente como “acaris” ou “cascudos” são peixes de hábitos tipicamente bentônicos, permanecendo junto ao fundo, raspando algas do substrato ou caçando invertebrados (Endo, 2006).

Estes peixes constituem uma das famílias da ordem Siluriformes cuja filogenia ainda não se encontra bem estabelecida. Suas relações de parentesco vêm sendo constantemente revisada, tanto com estudos de osteologia e morfometria (Armbruster, 2004) quanto molecular com a utilização de DNA mitocodrial (Montoya – Burgos, 2003), ou isoenzimas (Zawadzki et al. 2001), entre outras abordagens.

Isbrücker (1980) determinou seis subfamílias para Loricariidae: Ancistrinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae. Segundo Armbruster (2004) Hypostominae foi dividida em cinco tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. As tribos Ancistrini e Pterygoplichthini são grupos irmãos e os dados citogenéticos reforçam a relação entre estas tribos, sugerindo que $2n=52$ pode ser um número primitivo para estes grupos (Oliveira et al. 2006).

Estima-se que aproximadamente 70 espécies da família Loricariidae já tenham sido estudadas citogeneticamente (Kavalco et al. 2005). Este grupo apresenta ampla variação no número diplóide que vai de 36 cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano–Caetano, 1998) a 96 cromossomos em *Upsilous* sp. (Kavalco et al. 2005). Tais diversidades indicam a ocorrência de vários rearranjos cromossômicos direcionando para uma evolução cariotípica bastante divergente (Artoni e Bertollo, 2001).

Segundo Reis et al. (2003) o gênero *Squaliforma* é constituído por doze espécies e *Pterygoplichthys* por apenas três. Em relação à análise cariotípica,

existem poucos registros sobre estas espécies, podendo ser citados os trabalhos sobre *Squaliforma emarginata* (Artoni, 1996; Artoni e Bertollo, 2001; Silva et al. 2009), *Pterygoplichthys joselimaianus* (Oliveira et al. 2006) e *Pterygoplichthys etentaculatus* (Barros et al. 2009).

A subfamília Hypostominae apresenta diferença na quantidade, tamanho e localização do padrão e distribuição de heterocromatina e das RONS, possuindo RONS simples a RONS múltiplas, sendo esta última a mais freqüente, podendo apresentar polimorfismo de tamanho (Artoni e Bertollo, 2002).

O presente trabalho objetivou revisar o cariótipo de *S. emarginata* e *P. joselimaianus* em outras populações distintas das primeiras descrições cariotípicas, com vistas à citotaxonomia e evolução cariotípica dos Loricariidae.

3.2. Material e Métodos

As coletas foram realizadas no reservatório da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães, formado com o represamento das águas do rio Tocantins (S 10° 28. 757' W 048° 23. 409,' elevação 220m) no município de Porto – Nacional - TO.

Foram analisados nove exemplares machos da espécie *Squaliforma emarginata* (Valenciennes, 1840) e: 2 machos e 6 fêmeas de *Pterygoplichthys joselimaianus* (Weber, 1991). A identificação das espécies foi realizada pelo Ictiólogo Cláudio H. Zawadzki e os exemplares depositados no Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica convencional descrita por Bertollo et al. (1978). A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada pela impregnação por nitrato de prata (Howell e Black, 1980). A heterocromatina constitutiva foi evidenciada por meio da técnica descrita por Sumner (1972). Para determinação dos sítios “ricos” em GC utilizou-se a técnica de coloração com cromomicina A3 (Schimid, 1980) e Hoechst

33258 foi utilizado para o reconhecimento de regiões “ricas” em bases AT (Latt et al. 1974).

Os cromossomos foram classificados em três grupos: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos-acrocêntricos (st-a), segundo Levan et al. (1964), com modificações. Verificou-se o NF (número fundamental), considerando bibraciais os cromossomos (m-sm) e unibraciais os cromossomos (st-a).

3.3. Resultados

Por meio da coloração convencional com Giemsa *S. emarginata* (Fig. 3.1) apresentou $2n = 52$ cromossomos, com fórmula cariotípica: $14m+36sm+2st$ e NF = 102, com a presença de constrição secundária com variação intraespecífica, com indivíduos com até seis cromossomos submetacêntricos marcados na posição terminal do braço longo dos pares 9, 11, 12 (Fig. 3.1).

A heterocromatina está distribuída nas regiões teloméricas e intersticiais de cerca de 16 cromossomos, apresentando grandes blocos heterocromáticos que ocupam o braço longo de cinco cromossomos, tornando-os totalmente heterocromáticos (Fig. 3.2B). A coloração com cromomicina A_3 evidenciou seis cromossomos submetacêntricos com marcações na região terminal indicando heterocromatina rica em GC intercalada e sobreposta às Ag-RONs. Algumas marcações mais claras distribuídas no braço longo de quatro cromossomos submetacêntricos sugerindo a presença de regiões heterocromática rica em pares de base AT também foram visualizadas (Fig. 3.2C).

Na coloração com Hoechst foram observadas bandas negativas na posição terminal no braço curto e longo, correspondentes a região de heterocromatina rica em GC (Fig. 3.2D).

P. joselimaianus (Fig. 3.3) apresentou $2n = 52$ cromossomos para ambos os sexos, com fórmula cariotípica: $20m+22sm+10st$ e NF = 94, com a presença de constrições secundárias na região terminal do braço curto do quinto par do complemento, que podem ser facilmente observadas em coloração convencional com Giemsa (Fig. 3.3). A heterocromatina esta distribuída na região

pericentromérica de quatro cromossomos, e situada em posição intersticial e terminal em 10 cromossomos, incluindo o quinto par que possui um par de pequenos satélites presentes na região telomérica do par portador das constrições secundárias (Fig. 3.4B).

A coloração com CMA₃ evidenciou marcações fluorescentes na região terminal de vários pares cromossômicos, notadamente daqueles associados à regiões organizadoras de nucléolos (Fig. 3.4C). Com o Hoechst foram observadas bandas negativas na posição terminal, correspondendo à presença de heterocromatina constitutiva rica em GC associada às Ag-RONs (Fig. 3.4D).

3.4. Discussão

O número diplóide encontrado em *S. emarginata* coincide com os registros citogenéticos para esta espécie, divergindo em relação à fórmula cariotípica. O presente trabalho apresenta a seguinte configuração cariotípica: 14m+36sm+2st e NF=102, enquanto Artoni e Bertollo (2001) apresentaram 16m+30sm+6st e Silva et al. (2009) observaram 18m+22sm+12st para *S. emarginata* de diferentes localidades.

Em outros gêneros da subfamília Hypostominae, também foram observados 52 cromossomos como número diplóide como em *Glyptoperichthys gibbiceps*, 20m+24sm+8st (Alves et al. 2006), *Liposarcus anisitsi* do rio Preto-SP com 16m+24sm+8st+4a (Artoni et al. 1999) e *L. anisitsi* do rio Piracicaba-SP com 16m+28sm+6st+2a (Camilo, 2004), no rio Tietê-SP com 28m+12sm+8st+4a, rio Miranda – MS com 8m+14sm+14st+16a, *L. multiradiatus* com 22m+18sm+12st (Alves et al. 2006).

Em *P. joselimaianus* com 52 cromossomos, 20m+22sm+10st e NF=94 também se observou diferenças cariotípicas, quando comparado com os dados apresentados por Oliveira et al. (2006) 28m+16sm+8 st/a, e *P. etentaculatus* com 26m+20sm+6st (Barros et al. 2009).

Diferenças cariotípicas entre espécies que apresentam mesmo número diplóide e macroestrutura cariotípica semelhante pode ser atribuída à falta de padronização do cariótipo de peixes, aos limites impostos a classificação

tipológica dos cromossomos ou mesmo representar variações geográficas ou espécies incipientes.

S.emarginata e *P. joselimaianus* apresentam uma maior predominância de cromossomos com dois braços (m-sm), confirmando a hipótese de Artoni (1996) em que para o gênero *Hypostomus*, espécies com menores números diplóides apresentam maior frequência de cromossomos com morfologia (m-sm), situação que de um modo geral se inverte nas espécies com maiores números diplóides, onde predominam os cromossomos (st-a).

De acordo com Oliveira e Gosztanyi (2000) os cariótipos com menor número diplóide são considerados basais em Siluriformes e os cariótipos com número diplóide maior os mais derivados sugerindo evolução cariotípica por processos de fissão cromossômica. No entanto, o número $2n = 52$ parece ser conservado entre alguns gêneros de Hypostominae, como entre *Squaliforma*, *Pterygoplichthys* e *Glyptoperichthys*, uma condição derivada em relação ao número diplóide basal $2n = 54$ para os Loricariidae (Artoni e Bertollo, 2001).

Em relação ao padrão de RONS, foram observadas RONS simples em posição terminal e subterminal em *H. emarginata* (Artoni e Bertollo, 2001), *S. emarginata* (Silva et al. 2009), *P. joselimaianus* (Oliveira et al. 2006), *P. etentaculatus* (Barros et al. 2009), *L. anisitsi*, *L. multiradiatus*, *G.gibbiceps*, (Alves et al. 2006).

Neste trabalho os exemplares de *S. emarginata* apresentaram variação intraespecífica, observando de dois a seis cromossomos portadores de AgRONS na posição terminal de cromossomos submetacêntricos (pares 9, 11 e 12). Esta condição reforça a diferenciação cariotípica entre esta população e outras já descritas na literatura.

Entre os mecanismos que podem produzir variabilidade no tamanho das RONS pode-se destacar o fato dos genes ribossomais serem repetitivos. Desse modo, à semelhança das regiões heterocromáticas, o emparelhamento não-homólogo na meiose e a permuta desigual resultam em duplicações e deleções de RONS, não se descartando a ocorrência de outros mecanismos, como quebra e troca desigual de cromátides-irmãs. Alguns outros mecanismos têm sido propostos para explicar o aparecimento de padrões variantes de Ag-RONS em espécies relacionadas dentro de um gênero ou gêneros distintos e em certas

populações de uma mesma espécie, como transposição de segmentos de DNAr por meio de elementos genéticos móveis, amplificação de gene único de DNAr, originando regiões organizadoras de nucléolos funcionais, erros de reinserção após a amplificação de DNAr no curso da ovogênese, mas a maioria deles sem comprovação experimental (Kasahara, 2009).

A distribuição de heterocromatina constitutiva em *S. emarginata* coincide com os outros registros citogenéticos para esta espécie por outro lado, a caracterização da heterocromatina em *P. joselimaianus* não foi realizada em trabalhos anteriores.

S. emarginata e *P. joselimaianus* apresentam blocos intersticiais e teloméricos grandes de heterocromatina ricos em GC e estão associados com a RONS, como evidenciados por Artoni e Bertollo (2001). Este fato se confirma com a coloração CMA₃ em *S. emarginata*, onde as regiões teloméricas marcadas correspondem as RONS, e a coloração com Hoechst mostraram marcações teloméricas negativas. Em *P. joselimaianus* observa-se que as regiões marcadas com a CMA₃, que correspondem à heterocromatina rica em GC, apresentaram como esperado, marcação negativa com Hoechst incluindo as constrictões secundárias.

Em síntese, os dados aqui apresentados reforçam a diversidade cariotípica evidenciada para os Loricariidae. Contudo, são evidenciadas características compartilhadas entre espécies de diferentes gêneros de Hypostominae com 2n = 52 cromossomos e derivadas em relação à fórmula basal dos Loricariidae. Em adição os dados apresentados reforçam a importância de revisar dados cariotípicos obtidos para espécies de peixes neotropicais em populações distintas com vistas a subsidiar a citotaxonomia.

3.5. Referências

Alves A.L., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F., 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, 128: 1-8 p.

Armbruster, J.W., 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. Zool. J. Linnean Soc. 141: 1–80.

Artoni, R.F., 1996. Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 161p.

Artoni R.F., Bertollo, L.A.C., 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). Genetica 106: 209–214.

Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C., 2001. Trends in karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). Hereditas, 134: 201-210.

Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C., 2002. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. Heredity, 89: 15-19.

Barros, L.C., Santos, U., Vieira, B.G., Dergam, J.A., 2009. Caracterização citogenética de *Pterygoplichthys etentaculatus* (Loricariidae) do rio Pandeiros-MG. 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia. 10p.

Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho O., 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics, 1: 103-120 p.

Camilo, F.M., 2004. Estudos Citogenéticos em algumas espécies de peixes da família Loricariidae pertencentes à Bacia do rio Piracicaba. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 76p.

Endo, K.S., 2006. Análise citogenética de espécies da subfamília Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do alto rio Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Maringá, Paraná. 47p.

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

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

Isbrücker, I.J.H., 1980. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Verslagen en Technische Gegevens, 22: 1-181.

Kasahara, S., 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. 1ª Ed. Ribeirão Preto. SBG, 160p.

- Kavalco, K.F., Pazza, R., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 94: 180-186.
- Latt, S.A., Davidson, R.L., Lins, M.S., Gerald, P.S., 1974. Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33258 Hoechst. *Experiential Cellular Research*, 87: 425-429.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, H.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.
- Montoya-Burgos, J.I., 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol*, 12: 1855–1867.
- Oliveira, C., Gosztanyi, A.E., 2000. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. *Caryologia*, 53: 31-37.
- Oliveira, R.R., Souza I.L., Venere, P.C., 2006. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*, 4: 93-97.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J., 2003. Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre, Edipucrs, 742p.
- Schimid, M., 1980. Chromosome banding in Amphibia: IV: Differentiation of CG and ar rich chromosomes regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- Silva, D.L.P, Gardinal, L.S.S., Vitorino, C.A., Souza, I.L., Venere, P.C. 2009. Caracterização cromossômica de *Squaliforma emarginata* (Siliuriformes, Loricariidae). XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Ponta Grossa. 28p.
- Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp Cell Res*, 75:304-306.
- Zawadzki, C.H., Machado, M.F.P.S., Renesto, E., 2001. Differential expression for tissue-specific isozymes in three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). *Biochem. Syst. Ecol*, 29: 911–922.

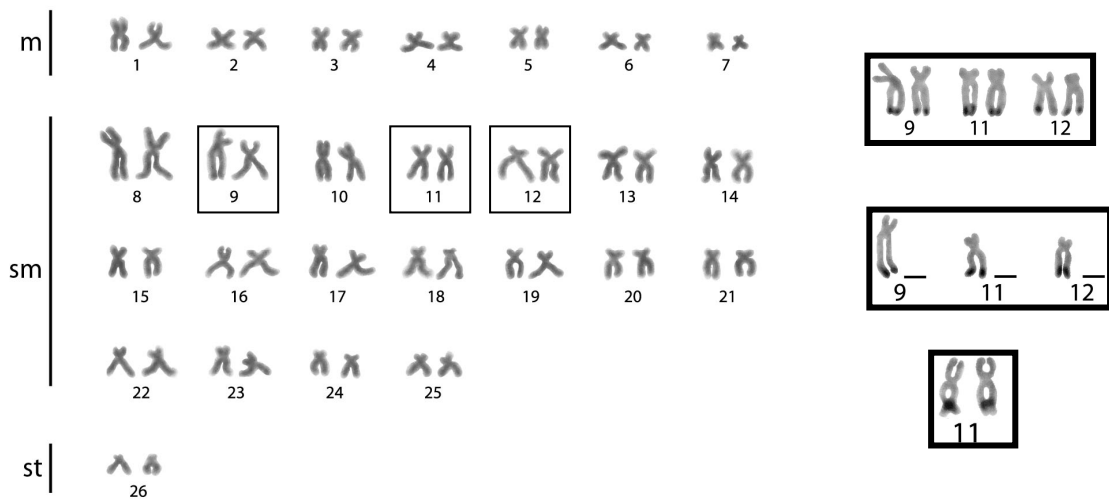


Fig. 3.1 Cariótipo corado por Giemsa e RONS: *S. emarginata* $2n=52$. Os pares portadores das constrições secundárias se encontram em destaque. No Box os cromossomos portadores das RONS.

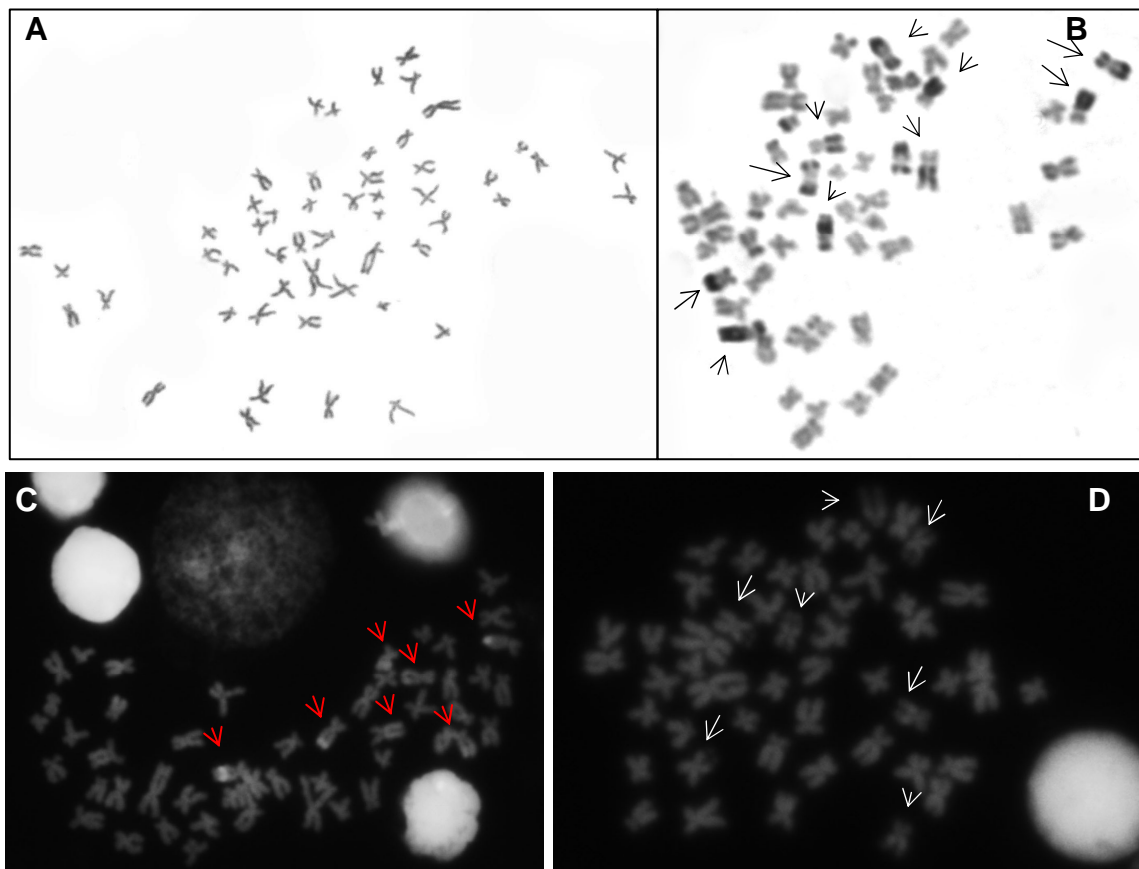


Fig. 3.2 Metáfases de *S. emarginata* coradas por: **A)** Giemsa; **B)** Banda-C; **C)** as setas vermelhas indicam as regiões coradas com CMA_3^+ , ricas em GC **D)** Hoechst. As setas em **(B)** indicam a presença de heterocromatina e as setas em **(C)** indicam as regiões ricas em GC e em **(D)** as regiões ricas em AT.

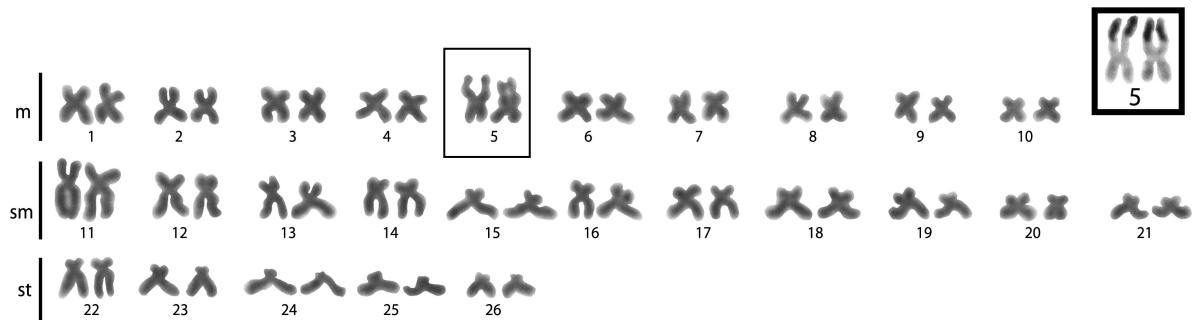


Fig. 3.3 Cariótipo corado por Giemsa e RONS: *P. joselimaianus* $2n=52$. Os pares portadores das constrições secundárias se encontram em destaque. No Box os cromossomos portadores das NORs.

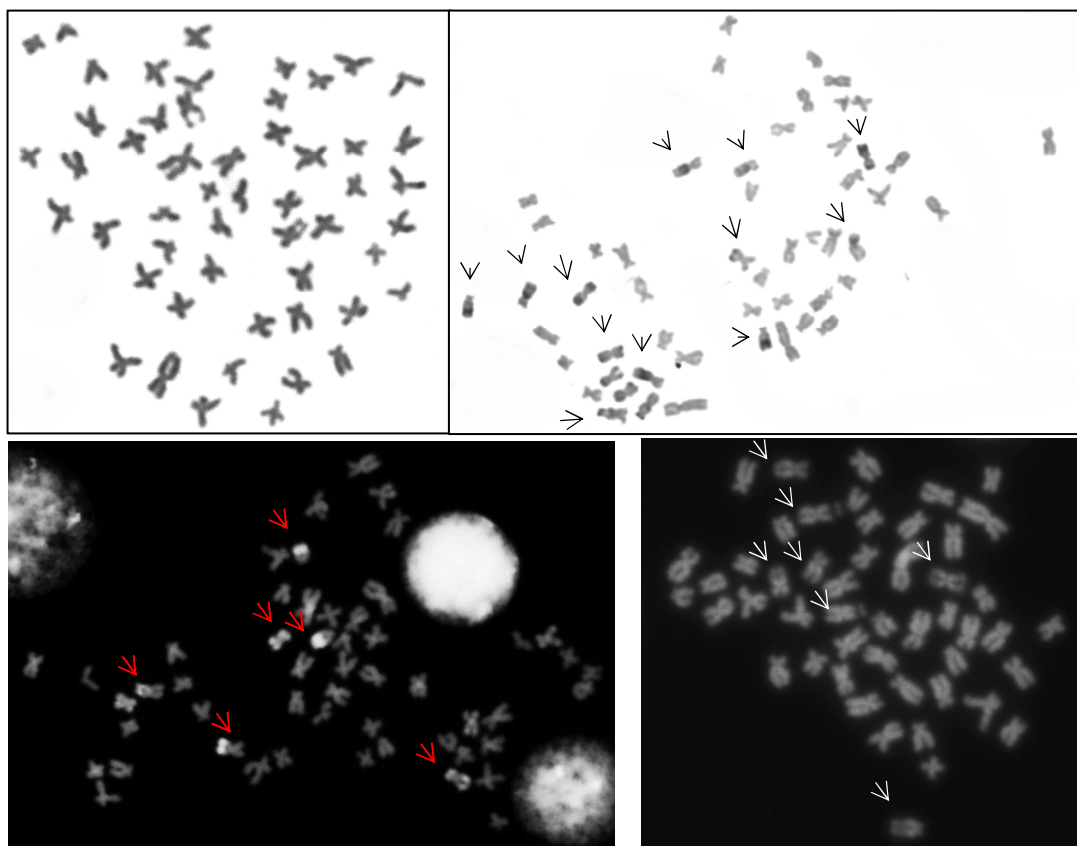


Fig. 3.4 Metáfases de *P. joselimaianus* coradas por: **A)** Giemsa; **B)** Banda-C; **C)** as setas vermelhas indicam as regiões coradas com CMA_3^+ , ricas em GC; **D)** Hoechst. As setas em **(B)** indicam a presença de heterocromatina e as setas em **(C)** indicam as regiões ricas em GC e em **(D)** as regiões ricas em AT.

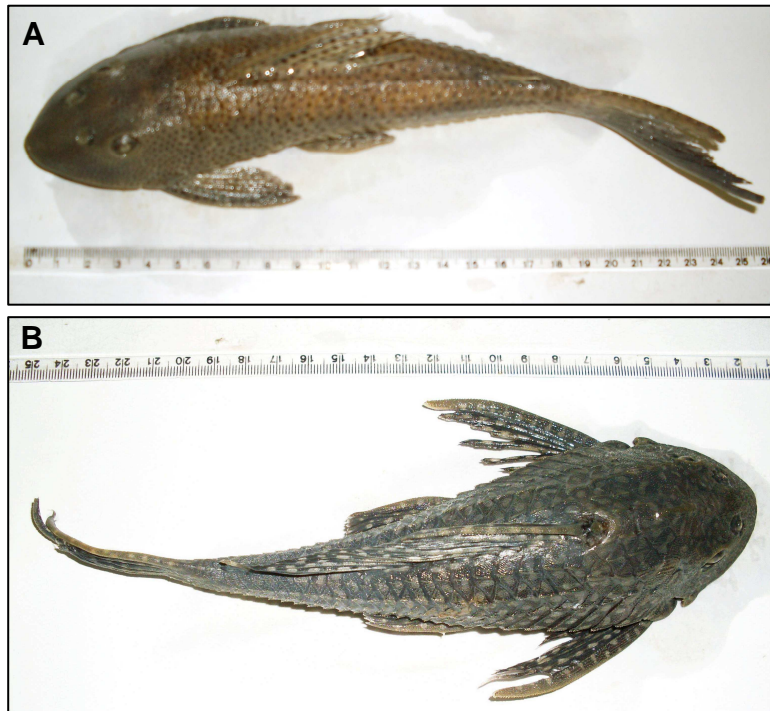


Fig. 3.5 Fotos de exemplares: **A)** *S. emarginata* ♂ **B)** *P. joselimaianus* ♀ coletados no rio Tocantins.