UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

VANESSA BUENO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA BÁSICA E MOLECULAR EM Hypostomus spp. LACÉPÈDE, 1803 DO RIO PIQUIRI (PR).

> CASCAVEL-PR Fevereiro/2012

VANESSA BUENO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA BÁSICA E MOLECULAR EM *Hypostomus* spp. LACÉPÈDE, 1803 DO RIO PIQUIRI (PR).

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

CASCAVEL-PR Fevereiro/2012

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO (CIP)

BIBLIOTECA CENTRAL DO CAMPUS DE CASCAVEL – UNIOESTE

Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

S584c	Silva, Vanessa Bueno da Caracterização citogenética básica e molecular em Hypostomus spp. Lacépède, 1803 do Rio Piquiri (PR). / Vanessa Bueno da Silva— Cascavel, PR: UNIOESTE, 2012. 120 p.
	Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.
	Bibliografia. 1. Diversidade cariotípica. 2. Evolução cromossômica. 3. AgRONs. 4. Heterocromatina. 5. DNAr 5S. 6. DNAr 18S. 7. Citogenética. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título. CDD 21.ed. 572.8

VANESSA BUENO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA BÁSICA E MOLECULAR EM *Hypostomus* spp. (LACÉPÈDE, 1803) DO RIO PIQUIRI (PR)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:

Iladom la

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido Universidade Estadual do Oeste do Paraná(Presidente/Orientador)

Prof^a Dr^a Maristela Cavicchioli Makrakis Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari Universidade Estadual de Ponta Grossa

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2012. Local da defesa: Unioeste, Prédio de Salas de Aula, sala 56, Cascavel-PR.

Dedico este trabalho ao meu irmão, Eduardo, e a meus pais, Edson e Bernardete

"Nas mãos inspiradas nascem antigas palavras com novo matiz."

Helena Kolody

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela estrutura que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais e aos professores, pelo suporte e auxílio.

À Fundação Araucária e CNPq pelo financiamento de projetos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis pela concessão da licença de coleta.

Ao professor Dr. Vladimir Pavan Margarido pelo conhecimento compartilhado, incentivo, (muita) paciência, confiança e orientação, muito obrigado!! O laboratório e a qualidade de nossos trabalhos têm crescido graças aos seus esforços constantes para trazer novas técnicas, equipamento e material de trabalho.

À professora Dr.^a Norma Catarina Bueno, pelo grande esforço para garantir o funcionamento do programa e constante auxílio aos discentes.

Ao professor Dr. Cláudio Henrique Zawadzki pela coorientação, identificação dos espécimes, e apoio durante a elaboração deste trabalho.

À professora Dr^a. Onildes Maria Taschetto, pelo esforço em relação à estruturação do laboratório de citogenética.

Ao professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari e à professora Maristela Cavicchioli Makrakis pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo, mesmo nos momentos complicados e decisões difíceis. Ao meu irmão Eduardo, pelas horas divertidas, pela companhia e apoio. Obrigada por passarem por tudo comigo.

À Elis, pela amizade, pelos passeios, pelos desabafos e por estar sempre presente desde a graduação. Ao Lucas Piloto por estar perto mesmo estando longe e pela amizade por todos esses anos, pelos conselhos e por apoiar minhas idéias malucas. Ao Leandro, Ariádine, Íris, Paulo, Giovanna e Simone pela amizade.

À professora MSc. Jocicléia Konerat pelas longas conversas, amizade e apoio dentro e fora do laboratório. Ao pessoal que passou ou continua no laboratório de citogenética, Cássia, Raul, Mauricio, Lucas, Leonardo e aos colegas de mestrado.

Ao técnico do laboratório de genética, Fernandes João Luzzi, e a secretária do programa de pós-graduação, Antônia Telles pelo auxílio em diversos momentos. A todos aqueles que auxiliaram nas coletas, em especial Prof. Dr. Sérgio Makrakis, Profa. Dra. Maristela Cavicchioli Makrakis, Prof. Dr. Paulo César Vênere, MSc. Rafaela Maria Moresco, Leonardo Marcel Paiz, Adélio Ortiz e Geraldo S. Zientarski.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
1. APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS	1
2. INTRODUÇÃO	3
2.1 Bacia do rio Tocantins-Araguaia	3
2.2 Bacia do rio Paraná	4
2.3 Considerações sobre Hypostominae e Hypostomus	5
2.4 Citogenética de Hypostomus	
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Material e locais de coleta	11
3.2 Preparação de cromossomos mitóticos	15
3.3 Preparo de lâminas	16
3.4 Detecção de regiões organizadoras de nucléolos	16
3.5 Determinação de heterocromatina	16
3.6 Estudos cariotípicos	17
3.7 Dupla coloração CMA ₃ /DAPI	
3.8 Hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes	
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
5. CAPÍTULO 1 - Tendências na evolução cromossômica no gênero H	lypostomus
Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): uma nova perspectiva sobre a	correlação
entre número diplóide e tipos cromossômicos	
Resumo	
Abstract	
Introdução	
Material e Métodos	
Resultados	35
Discussão	

Agradecimentos	39
Referências Bibliográficas	39
Referencias Bionograneas	57
6. CAPÍTULO 2 - Diversificação cariotípica em Hypostomus Lacépède, 18	303
(Siluriformes, Loricariidae): perspectivas biogeográficas e filogenéticas	48
Resumo	52
Abstract	53
Introdução	54
Material e Métodos	55
Resultados	. 55
Discussão	. 57
Agradecimentos	61
Referências Bibliográficas	. 62
7. CAPÍTULO 3 - Composição e distribuição da heterocromatina em Hyposton	nus
Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), com implicações para a diversificaç	ção
cromossômica no gênero	71
Resumo	75
Abstract	76
Introdução	.77
Material e Métodos	78
Resultados	78
Discussão	81
Agradecimentos	355
Referências Bibliográficas	86
8. CAPITULO 4 - Mapeamento físico do DNAr 5S e 18S em dez espécies de <i>Hyposton</i>	nus
Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae)	.92
Resumo	.98
Abstract	.99
Introdução1	100
Material e Métodos1	01
Resultados1	02
Discussão1	105

	Agradecimentos	. 108
	Referências Bibliográficas	. 109
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	. 119

LISTA DE FIGURAS

Material e Métodos

Figura 1 Localização dos pontos de coleta das espécies de <i>Hypostomus</i> 12
Figura 2 Espécimes de (a) Hypostomus strigaticeps (250 mm) e (b) Hypostomus topavae
(155 mm)

Figura 4 Exemplares de (a) *Hypostomus faveolus* (100 mm), (b) *Hypostomus hermanni* (150 mm), (c) *Hypostomus* aff. *paulinus* (160 mm) e (d) *Hypostomus regani* (250 mm). . 14

Capítulo 1

Figura 1	Vista	lateral	de (a)	Hypostomus	ancistroides	(255	mm) e (b)	Hypostomus	topavae
(125 mm)					•••••			48

 Figura 2 Cariótipo corado por Giemsa de (a) Hypostomus ancistroides e (b) Hypostomus

 topavae
 49

Capítulo 2

Figura	1 Cariótipos	corados po	r Giemsa d	le (A) Hypos	tomus coc	hliodon; ((B) <i>H</i>	Iypostomus
faveolu.	s; (C) Hypost	omus comn	<i>iersoni</i> e (I	D) Hypostom	us herman	ni		71

 Figura 3 Pares cromossômicos portadores de AgRONs das espécies analisadas de

 Hypostomus
 73

Capítulo 3

Figura	1 Cariótipos	s C-bandados	de (a)	Hypostomus	faveolus	(b)	Hypostomus	cochliodon
(c) Hype	ostomus com	amersoni e (d)	Hypos	stomus ancist	roides			

Figura 2 Cariótipos C-bandados de (a) Hypostomus hermanni (b) Hypostomus regani	(c)
Hypostomus strigaticeps (d) Hypostomus albopunctatus (e) Hypostomus aff. paulinus	(f)
Hypostomus topavae	93

Figura 3 Metáfases coradas por fluorocromos de (a) *Hypostomus faveolus* (b) *Hypostomus cochliodon* (c) *Hypostomus ancistroides* (d) *Hypostomus commersoni.......*94

Figura	5	Metáfases	coradas	por	fluorocromos	de	(a)	Hypostomus	albopunctatus	(b)
Hyposta	omi	us topavae								. 96

Capítulo 4

 Figura 4 Metáfases hibridizadas com sondas de DNAr 5S e 18S de (a) Megalancistrus

 parananus e (b) Pterygoplichthys anisitsi.

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

Fabela 1 Locais de coleta e número de indivíduos coletados1	1
--	---

<u>Capítulo 1</u>

Tabela 1 Dados citogenéticos publicados em revistas científicas para Hypostomus.	
Tabela 2 Dados citogenéticos publicados em eventos para Hypostomus	

<u>Capítulo 2</u>

Tabela 1 Número e sexo	dos indivíduos coletados em cada locali	dade68
Tabela 2 Dados citogenét	icos disponíveis para Hypostomus	

<u>Capítulo 3</u>

Tabela 1 Número e sexo dos indivíduos coletados em cada localidade	91
--	----

Capítulo 4

Tabela 1 Número e sexo dos indivíduos e locais de coleta.	11	14	4	•
---	----	----	---	---

1. APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Hypostomus é o gênero mais especioso da subfamília Hypostominae, com 130 espécies nominais. O elevado número de espécies novas para o gênero que ainda não foram propriamente descritas e a grande variação intraespecífica na morfologia e padrões de coloração dificultam a identificação das espécies. Consequentemente, um grande número de estudos é realizado com espécies não identificadas impedindo análises comparativas amplas sobre o gênero. Este cenário também é válido para estudos citogenéticos, que consistem principalmente em descrições citogenéticas de espécies novas ou não identificadas.

Embora os estudos citogenéticos em *Hypostomus* tenham iniciado em 1968, com a descrição de *H. plecostomus*, os conhecimentos sobre a evolução e diferenciação cromossômica do gênero ainda são vagos. Os números diplóides variam amplamente entre as espécies, de 54 cromossomos em *H. plecostomus* a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2, sendo o número diplóide de 54 cromossomos considerado ancestral para os Hypostominae. Acredita-se que espécies com números diplóides maiores apresentem uma maior proporção de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, o que sugere que a evolução cromossômica neste gênero tenha ocorrido através de fissões. A existência de variações estruturais entre cariótipos de espécies com o mesmo número diplóide indica ainda a ocorrência de diferenciação cromossômica entre as espécies através de alterações cromossômicas estruturais, como inversões pericêntricas.

Poucos estudos foram realizados sobre marcadores citogenéticos em *Hypostomus*. As regiões organizadoras de nucléolos parecem variar consideravelmente e o pequeno número de estudos com hibridização *in situ* de sítios de DNA ribossomal não permite a verificação de alguma tendência para o gênero. Em relação aos padrões de distribuição de heterocromatina, a presença de blocos heterocromáticos centroméricos e teloméricos está correlacionada a espécies com números diplóides menores e a presença adicional de blocos intersticiais a espécies com números diplóides elevados, sugerindo a ocorrência de dispersão de heterocromatina entre cromossomos não homólogos.

Tendo em vista o número baixo de descrições citogenéticas de espécies nominais de *Hypostomus*, principalmente em relação à descrição da heterocromatina e mapeamento de DNA ribossomal, e a necessidade de estudos comparativos amplos e atualizados, o presente trabalho propôs realizar as análises citogenéticas das espécies de *Hypostomus*, principalmente do rio Piquiri (Paraná). Os dados obtidos foram analisados em conjunto com os presentes na literatura, buscando possíveis tendências evolutivas ou características de subgrupos dentro do gênero e fornecendo subsídios à sistemática e filogenética deste complexo grupo de peixes.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Bacia do rio Tocantins-Araguaia

A Divisão Hidrográfica Nacional foi instituída pelo Conselho Nacional de Recursos Hídricos a partir da Resolução nº. 32, de 15 de outubro de 2003, que estabeleceu doze regiões hidrográficas que orientariam o Plano Nacional de Recursos Hídricos. Esta divisão foi baseada na localização e características naturais, sociais e econômicas das regiões, tendo em vista que seria utilizada para o planejamento e gerenciamento de recursos. As regiões consistem na região hidrográfica Amazônica, do Tocantins-Araguaia, Atlântico Nordeste Ocidental, do Parnaíba, Atlântico Nordeste Oriental, São Francisco, Atlântico Leste, Atlântico Sudeste, do Paraná, do Uruguai, Atlântico Sul e do Paraguai (CNRH, 2003).

A região hidrográfica do Tocantins-Araguaia apresenta uma superfície de 918.273 km², cobrindo cerca de 10% do território nacional e incluindo cinco estados brasileiros e o Distrito Federal. O clima da região é tropical, com dois períodos climáticos (chuvas e seca) bem definidos. O rio Tocantins é formado pelo rio das Almas e Maranhão, e tem uma extensão de aproximadamente 1.960 km. Seu principal afluente é o rio Araguaia, com 2.600 km de extensão (MMA, 2006a).

Um levantamento de espécies de peixes realizado no parque estadual do Cantão, no estado do Tocantins, permitiu a identificação de 271 espécies de peixes, sendo as ordens mais representativas os Characiformes (52,4%) e os Siluriformes (26,9%). A ictiofauna é composta por uma mistura de espécies do rio Amazonas, dos escudos do Brasil Central e das Guianas, além de espécies típicas do rio Tocantins. O parque onde o levantamento foi realizado apresenta aproximadamente 890 km², uma área pequena considerando a área

total da bacia, o que sugere a existência de uma diversidade de espécies muito maior na totalidade da bacia (Ferreira *et al.*, 2011).

2.2 Bacia do rio Paraná

O rio Paraná é formado pela confluência dos rios Grande e Paranaíba, drenando uma área de 2.800.000 km² e percorrendo cerca de 3.800 km, sendo 810 km em território brasileiro. É um rio de planalto, caracterizado por uma grande quantidade de corredeiras e quedas d'água (Godoy, 1986; Stevaux *et al.*, 1997). A bacia do rio Paraná apresenta três tipos de clima: tropical quente, temperado e subtropical úmido. A precipitação média anual mantém-se em torno de 1.500 mm, com os maiores valores ocorrendo na região da bacia do rio Iguaçu e as mais baixas nas regiões dos rios Paranapanema e Tietê (Godoy, 1986). Os principais conflitos pelo uso de água na região hidrográfica do Paraná envolvem consumo excessivo na irrigação e problemas causados pela poluição, gerada pela suinocultura intensiva e aglomerações urbanas (MMA, 2006b). A Região Hidrográfica do Paraná apresenta seis unidades hidrográficas: Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema, Paraná e Iguaçu (MMA, 2006c).

A unidade hidrográfica do Iguaçu representa 7,5% da região hidrográfica do Paraná, com uma área de 65.558 km². É uma das unidades menos populosas da região hidrográfica do Paraná, porém recebe cargas de poluição de origem doméstica e industrial significativas da região metropolitana de Curitiba. A bacia do Iguaçu apresenta um elevado grau de endemismo. São descritas 86 espécies para a bacia, sendo 29 endêmicas (Ingenito *et al.*, 2004; IAP, 2008).

Considerado parte da unidade hidrográfica do Paraná, o rio Piquiri é um importante afluente do rio Paraná. Suas nascentes estão localizadas na divisa dos municípios Turvo e Guarapuava. Drena uma área de 24.156 km², percorrendo cerca de 560 km até desaguar no rio Paraná (IAP, 2008). Apresenta águas rápidas e declividade de 2,2 m/km (Agostinho *et al.*, 1997). A ictiofauna do rio Piquiri é composta principalmente por mais de 60 espécies, sendo as ordens mais representativas os Siluriformes, com 29 espécies, e Characiformes, com 26 espécies (Gubiani *et al.*, 2006). As espécies encontradas variam entre os pontos do próprio rio e em relação ao rio Paraná, com diversas espécies consideradas raras em outros ambientes (Pavanelli, 2006).

2.3 Considerações sobre Hypostominae e Hypostomus

A ordem dos Siluriformes é diversa e amplamente distribuída, ocorrendo em todos os continentes e compreendendo cerca de 3.000 espécies (Ferraris, 2007). Habitam principalmente águas doces, com representantes marinhos pertencentes principalmente às famílias Ariidae e Plotosidae (de Pinna, 1988). São caracterizados pelo corpo nu ou coberto por placas dérmicas, apresentando grande diversidade na forma, tamanho e habitats (Reis, 1998).

A maior parte dos Siluriformes possui hábito noturno. Muitos apresentam olhos pequenos, utilizando barbilhões na busca por alimento e exploração do ambiente. Um grande número de espécies possui os raios anteriores das nadadeiras peitorais e dorsal convertidos em um acúleo forte e afiado que o peixe mantém ereto quando alarmado. O acúleo é mantido ereto através de um sistema de trava por fricção. As superfícies ásperas necessárias a esse sistema são utilizadas para a produção de sons por alguns peixes, provavelmente servindo como alerta a predadores (McNeill, 1981).

Loricariidae é a maior família da ordem dos Siluriformes, com cerca de 960 espécies (Froese & Pauly, 2012). Está distribuída pela Costa Rica, Panamá e América do

Sul, sendo encontrados em altitudes de até 3.000 metros (Nelson, 2006). Sete subfamílias são aceitas em Loricariidae até o ano de 2011: Delturinae, Hypoptomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Otothyrinae (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006; Chiachio *et al.*, 2008). Em 2011, Cramer *et al.* (2011) publicam a filogenia molecular de Neoplecostominae e Hypoptopomatinae, invalidando a subfamília Otothhyrinae.

A subfamília Hypostominae contém cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini (Armbruster, 2004). A maior parte das espécies é restrita a ambientes de água doce, com a maior diversidade de espécies nas drenagens costais do leste e sudeste brasileiros. Apresentam uma variabilidade intraespecífica considerável na morfologia e padrões de coloração, dificultando a delimitação da variabilidade dos táxons, além de um grande número de espécies ainda não descritas. Graças a estas características, existe um grande número de espécies de caráter taxonômico incerto na subfamília, principalmente no gênero *Hypostomus* (Weber, 2003).

O gênero *Hypostomus* pertence à tribo Hypostomini, contendo cerca de 130 espécies (Froese & Pauly, 2012). Segundo Armbruster (2004), é o único gênero válido da tribo, considerando *Aphanotorulus, Cochliodon, Isorineloricaria, Squaliforma* e *Watwata* como sinônimos de *Hypostomus*. Embora não tenham sido realizadas pesquisas posteriores sobre as relações filogenéticas em Hypostomini, ainda não existe consenso em relação a quais gêneros devem ser sinonimizados e alguns trabalhos posteriores (e.g. Ferraris, 2007) não adotaram esta proposta. As relações entre as espécies do gênero também não estão bem definidas. O elevado número de espécies nominais dificulta a elaboração de uma filogenia completa para o gênero. As propostas publicadas até o momento incluem um número relativamente baixo de espécies nominais frente ao total existente no gênero, além de algumas espécies novas ou não identificadas, de tal forma que a sobreposição e comparação entre as propostas são inviáveis (Armbruster, 2003; Montoya-Burgos, 2003; Armbruster, 2004; Martinez, 2009).

Não existem muitos subgrupos definidos em *Hypostomus*. Uma das exceções é o grupo *Hypostomus cochliodon*, com espécies encontradas principalmente nas bacias do norte da América do Sul que formam um grupo monofilético (Armbruster, 2003). Também são comentados os grupos *Hypostomus emarginatus* e *Hypostomus unicolor* na literatura (Armbruster, 2004), porém estes grupos contêm espécies pertencentes aos gêneros *Squaliforma* e *Aphanotorulus*, respectivamente, sendo válidos somente se estes gêneros forem considerados sinônimos de *Hypostomus*. Além destes, Muller e Weber (1992) propuseram os grupos *Hypostomus regani* e *Hypostomus plecostomus*, com base no número de dentes e padrão de coloração. Esta divisão é frequentemente utilizada como referência e reflete parcialmente os resultados obtidos nas análises filogenéticas moleculares propostas por Montoya-Burgos (2003) e Martinez (2009), que também separam *Hypostomus* em dois grandes subgrupos.

A única análise biogeográfica de *Hypostomus* foi realizada por Montoya-Burgos (2003). Através da análise do *D-loop* do DNA mitocondrial e regiões de ITS do DNA nuclear, o autor elaborou uma proposta filogenética, que foi correlacionada com os pontos de coleta dos espécimes para testar a hipótese hidrológica de que as mudanças nos padrões dos rios teriam agido como forças de diversificação das espécies de peixes. Os resultados indicam que mudanças hidrológicas provavelmente tenham originado as principais cladogêneses observadas no gênero.

2.4 Citogenética de Hypostomus

As análises citogenéticas em *Hypostomus* começaram em 1968, com a análise de *Hypostomus plecostomus* (Muramoto *et al.*, 1968). Estudos posteriores foram realizados somente em 1977, com análises em *Hypostomus paulinus*, *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus macrops* e *Hypostomus strigaticeps* (Michele *et al.*, 1977). Estas publicações trouxeram os primeiros dados sobre os números diplóides e fórmulas cariotípicas do gênero. A partir de 1996, análises citogenéticas em *Hypostomus* passaram a ser publicadas com maior frequência, e novas técnicas foram aplicadas às análises, com a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da impregnação por nitrato de prata e determinação dos padrões de bandamento C (e.g. Artoni & Bertollo, 1996; 1999; 2001). A primeira análise molecular foi realizada somente em 2004, com o mapeamento do DNAr 5S em *Hypostomus affinis* (Kavalco *et al.*, 2004a).

O número de espécies de *Hypostomus* citogeneticamente analisadas ainda é relativamente baixo, levando em consideração o número total de espécies descritas para o gênero. Uma parte significativa das análises ainda é realizada em espécies novas ou não identificadas, e estes dados frequentemente são publicados somente como "grey literature", dificultando o acesso a essas informações (Bueno *et al.*, 2012). Embora as descrições citogenéticas de espécies novas e não identificadas auxiliem no entendimento geral do grupo, podem gerar dados duplicados e dificultar a comparação com outros dados existentes na literatura.

Dentre as espécies citogeneticamente analisadas de *Hypostomus*, a maior parte foi coletada na bacia do rio Paraná, com algumas espécies de bacias costeiras, rio São Francisco, bacia do rio Araguaia, rio Xingu e bacia do rio Paraguai (Milhomem *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011). Considerando a

ampla distribuição do gênero, verifica-se a ausência de análises principalmente de espécies do norte da América do Sul. Os dados existentes demonstram a existência de uma diversidade cromossômica considerável no gênero, com números diplóides variando de 2n=54 cromossomos em *H. plecostomus* (Muramoto *et al.*, 1968) a 2n=84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008).

Além da extensa variação nos números diplóides, também é verificada variação na fórmula cariotípica entre espécies com o mesmo número diplóide, inclusive entre populações da mesma espécie, como *Hypostomus ancistroides*, que apresenta 2n=68 cromossomos e ao menos oito fórmulas cariotípicas distintas descritas (Bueno *et al.*, 2012). Foram verificadas duas espécies com sistema de cromossomos sexuais, *Hypostomus macrops*, com um provável sistema do tipo XX/XY; e *Hypostomus* sp., com um sistema do tipo ZZ/ZW (Michele *et al.*, 1977; Artoni *et al.*, 1998). Duas espécies apresentaram cromossomos supranumerários, *Hypostomus* sp. 3, da bacia do rio Paraguai, e *Hypostomus* sp. Xingu-3, do rio Xingu (Cereali *et al.*, 2008; Milhomem *et al.*, 2010).

Os estudos relacionados à evolução cariotípica em *Hypostomus* concentram-se principalmente em esclarecer a ampla variação observada nos números diplóides e fórmulas cariotípicas. O número diplóide de 54 cromossomos é considerado basal para Loricariidae, indicando que números diplóides mais baixos sejam plesiomórficos para *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 2001). O aumento no número diplóide e variabilidade de fórmulas cariotípicas teriam sido originados por fissões cêntricas, que causaram o aumento do número diplóide, e rearranjos do tipo inversões que originaram diversidade de fórmulas cariotípicas entre espécies com o mesmo número diplóide (Michele *et al.*, 1977; Artoni & Bertollo; 2001; Alves *et al.*, 2005; Kavalco *et al.*, 2005; Bueno *et al.*, 2012).

Artoni e Bertollo (1996) consideram a presença de RONs simples, em posição terminal do braço longo de um cromossomo metacêntrico ancestral para Loricariidae.

Kavalco *et al.* (2005) também verificaram esta característica em *Hemipsilichthys* sp., provavelmente *Hemipsilichthys gobio* (citado como *Upsilodus* sp.), pertencente à subfamília Delturinae, que é o grupo considerado primitivo para todos os loricariídeos exceto Lithogeneinae (Kavalco *et al.*, 2005; Reis, 2006). Em *Hypostomus* são observadas tanto RONs simples quanto múltiplas, com variações inclusive entre populações da mesma espécie (Artoni & Bertollo, 1996; 2001; Mendes-Neto *et al.*, 2011).

Diferentes padrões de distribuição de heterocromatina são observados em *Hypostomus*. Algumas espécies, como *Hypostomus affinis*, apresentam blocos heterocromáticos conspícuos somente nas regiões das RONs e pouca heterocromatina em outras regiões, de composição principalmente GC-rica e ausência de heterocromatina AT-rica (Kavalco *et al.*, 2004b). *Hypostomus* sp. E, em contrapartida, apresenta um grande número de blocos heterocromáticos intersticiais equilocais, predominantemente AT-ricos, com regiões GC-ricas nas RONs (Artoni & Bertollo, 1999). Além destes padrões, existem espécies, como *Hypostomus paulinus*, que apresentam uma quantidade intermediária de heterocromatina, com regiões GC e AT-ricas (Rubert *et al.*, 2011). Segundo Artoni e Bertollo (1999), espécies com números diplóides mais elevados apresentam uma maior quantidade de heterocromatina.

As análises citogenéticas publicadas até o momento são principalmente descritivas ou buscam esclarecer tendências evolutivas dentro de Hypostominae e Loricariidae. Estudos visando o entendimento dos processos de diferenciação cromossômica ainda são escassos e incluem poucas espécies, tornando análises comparativas relevantes para a continuidade dos estudos sobre o gênero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e locais de coleta

Hypostomus regani

Hypostomus aff. paulinus

Hypostomus strigaticeps

Hypostomus topavae

Megalancistrus parananus

Pterygoplichtys anisitsi

Foram coletados exemplares de dez espécies de *Hypostomus* provenientes do rio Piquiri, municípios de Nova Laranjeiras e Formosa do Oeste – PR, rio Iguaçu, município de Foz do Iguaçu – PR, e rio Taquaralzinho, município de Barra do Garças – MT (Figura 1). Além destes, exemplares de *Megalancistrus parananus* e *Pterygoplichthys anisitsi* foram obtidos do rio Piquiri (Nova Laranjeiras – PR) e do rio Paraná (Guaíra - PR), respectivamente. Os animais foram sacrificados por *overdose* de óleo de cravo (Griffiths, 2000) (conforme Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas da Unioeste: Protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste, licença número 10522-3 IBAMA - SISBIO). O número de indivíduos e o local de coleta de cada espécie estão demonstrados na Tabela 1. Fotos de exemplares de cada espécie podem ser observadas nas Figuras 2, 3 e 4.

Espécie Machos Fêmeas Localidade Hypostomus albopunctatus 3 3 Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR 4 Hypostomus ancistroides 11 Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR Hypostomus cochliodon 4 1 Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR 0 1 Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR Hypostomus commersoni 1 Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR Hypostomus commersoni 1 7 2 Rio Taquaralzinho, Barra do Garças, MT Hypostomus faveolus 5 Hypostomus hermanni 4 Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR Hypostomus regani 4 2 Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR

4

7

7

6

0

1

1

6

8

9

2

0

Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR

Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR

Rio Paraná, Guaíra, PR

Tabela 1 Locais de coleta e número de indivíduos coletados por espécie e por sexo.



Figura 1 Localização dos pontos de coleta das espécies de Hypostomus.



Figura 2 Exemplares de (a) Hypostomus strigaticeps (250 mm) e (b) Hypostomus topavae (155 mm).



Figura 3 Exemplares de (a) *Hypostomus albopunctatus* (220 mm), (b) *Hypostomus ancistroides* (255 mm), (c) *Hypostomus cochliodon* (180 mm) e (d) *Hypostomus commersoni* (270 mm).



Figura 4 Exemplares de (a) *Hypostomus faveolus* (100 mm), (b) *Hypostomus hermanni* (150 mm), (c) *Hypostomus* aff. *paulinus* (160 mm) e (d) *Hypostomus regani* (250 mm).

3.2 Preparação de cromossomos mitóticos (Bertollo et al., 1978)

O órgão utilizado para a obtenção de metáfases mitóticas foi a porção anterior do rim.

 Foi injetada colchicina 0,025% na cavidade abdominal, na proporção 1 mL/100 g de peso animal durante 30-40 minutos, após o qual foi sacrificado o animal e retirada a porção anterior do rim.

2. O material, previamente lavado em solução hipotônica, foi colocado em uma cuba de vidro contendo 7-10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M.

3. O material foi dissociado com pinças de dissecação para separar as células, processo completado com o auxílio de uma seringa hipodérmica.

4. O material foi incubado em uma estufa a 37°C durante 25-30 minutos.

5. Foram pingadas de 5 a 10 gotas de fixador metanol-ácido acético (3:1) no material, que foi posteriormente ressuspendido e centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm.

6. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi retirado o sobrenadante e acrescentado 7-10 mL de fixador. O material foi ressuspendido e centrifugado durante 10 minutos.

7. O passo número 6 foi repetido mais duas vezes.

 Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado de 1 a 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material.

9. O material foi novamente ressuspendido e acondicionado em tubos de plástico tipo *Eppendorf*, sendo guardado no refrigerador.

1. Foram pingadas 1-3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, que foi seca ao ar.

A lâmina foi corada com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄ x 12H₂O), pH=6,8, por 7 minutos, ou tratada segundo as técnicas de bandas-C, impregnação por prata ou hibridização *in situ* por fluorescência.

3.4 Detecção de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) através da impregnação por prata (Howell & Black, 1980)

1. Foram colocadas sobre uma lâmina previamente preparada de 2 a 3 gotas de solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina incolor + 50 mL de H_2O +0,5 mL de ácido fórmico).

2. Sobre cada gota de gelatina foram adicionadas 1 gota de H_2O e 2 gotas de $AgNO_3$

 A lâmina foi coberta com uma lamínula e colocada em estufa a 60°C durante 3-6 minutos.

- 4. A lamínula foi removida debaixo de água corrente
- 5. A lâmina foi seca ao ar e observada ao microscópio.

3.5 Determinação de heterocromatina (Sumner, 1972) com modificações propostas por Lui *et al.* (2009)

Para a determinação da localização das regiões heterocromáticas foi utilizado o bandamento C com hidróxido de bário.

1. Por 12 minutos, a lâmina foi tratada com HCl 0,2N a 42°C.

2. A lâmina foi lavada em água corrente e seca ao ar.

 Durante 1 minuto e 20 segundos a lâmina foi colocada em solução aquosa de Ba(OH)₂.8H₂O 5% a 42°C.

4. A lâmina foi mergulhada três vezes em HCl 0,2N, lavada em água corrente e seca ao ar.

5. A lâmina foi colocada em solução salina 2xSSC por 30 minutos.

6. A lâmina foi lavada em água corrente, seca ao ar e coradas com iodeto de propídeo.

3.6 Estudos cariotípicos (Levan et al., 1964)

As preparações foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão. As melhores metáfases foram capturadas com a câmera digital DP 71 acoplada ao microscópio de epifluorescência BX 61, e os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntricos-submetacêntricos, subtelocêntricos-acrocêntricos).

A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan *et al.* (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

RB= 1,00-1,70 , metacêntrico (m); RB= 1,71-3,00 , submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a)

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a)

3.7 Dupla coloração CMA₃/DAPI (Schweizer, 1980)

 50 μL de solução de cromomicina foram colocados sobre cada lâmina, que foi, em seguida, coberta com uma lamínula e deixada no escuro por 1 hora;

2. A lamínula foi removida e a lâmina lavada em água e tampão McIlvaine;

3. Depois de seca, a lâmina foi montada com 30 µL de DAPI/Antifading.

3.8 Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (Pinkel *et al.*, 1986; Margarido & Moreira-Filho, 2008)

Primeiro dia (tarde)

Preparação da sonda:

- 1. Sonda (a quantidade necessária para 1 µg a 1,2 µg de DNA sonda).
- 2. H₂O *mili*-Q autoclavada (para completar os 16 µL de solução total).
- 3. 4µL de mix de reação (Kit).
- 4. 20µL (volume total da reação).

5. A solução foi homogeneizada com uma micropipeta e levada ao banho-maria (isopor) por 2 horas a 15-16°C.

6. Adicionar 1μL de EDTA 0,5 M, pH=8,0, e aquecer a 65°C por 10 minutos para finalizar a reação.

 O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total) mais etanol 100% gelado (2 vezes o volume), de preferência *overnight*. Segundo dia

Sonda (manhã):

1. O material foi centrifugado em velocidade máxima por 15 minutos e o sobrenadante descartado vertendo o tubo para baixo.

2. O material foi lavado com 100µl de etanol 70% gelado.

3. Por 15 minutos, o material foi centrifugado em velocidade máxima, sendo o sobrenadante descartado em seguida. O material foi seco em estufa a 37°C até o começo da tarde.

4. As lâminas foram pingadas e deixadas em estufa a 37°C até o começo da tarde para secar.

Preparação das Lâminas (tarde):

 As lâminas foram incubadas em 90 μl de RNAse (O,4% RNAse/2xSSC), sob lamínula, a 37°C por uma hora em câmara úmida com água e 2xSSC;

2. Lavadas 2 vezes por 5 minutos em 2xSSC com agitação;

3. Incubadas em 2xSSC a 72,5°C por 45 minutos;

4. Desidratadas em série de 70% etanol e 100% por 5 minutos cada, a temperatura ambiente, secando ao ar;

5. Denaturadas em 0,05N NaOH/2xSSC por 3 minutos exatos;

6. Desidratadas em série de etanol 70% e 100% por 5 minutos cada, a temperatura ambiente, secando ao ar.

Hibridização:

1. Foram adicionados ao tubo 6μ L de cada sonda em TE + 6μ L de 20xSSC + 30μ L de formamida + 12μ L de sulfato dextrano 50% por lâmina.

 A solução de hibridação foi colocada no banho-maria a 100°C por 10 minutos para desnaturar a sonda.

 A solução de hibridação foi retirada do banho-maria e colocada imediatamente no gelo.

4. Foi colocado 58µl de solução de hibridação em lamínula para cada lâmina. As lâminas foram arrumadas em câmara úmida e incubadas a 37°C por 12 horas (*overnight*).
A câmara úmida foi preparada com 2xSSC e H₂O.

Terceiro dia

- 1. As lâminas foram lavadas em 1xSSC por 5 minutos a 37°C com agitação;
- 2. Lavadas em 1xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação;
- 3. Lavadas em Tween 0,05%/4xSSC 2 vezes por 5 minutos cada com agitação.

Detecção e amplificação do Sinal:

1. As lâminas foram incubadas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos;

2. Lavadas 2 vezes por 5 minutos com *Tween* 0,05%/4xSSC, a temperatura ambiente (sob agitação);

3. Incubadas com 88 μ L de Rodamina+FITC (0,5 μ L de Rodamina + 0,2 μ L de FITC + 90 μ L 5% *NFDM*/4xSSC por lâmina) durante 60 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

4. Lavadas uma vez com tampão 5% *NFDM*/4xSSC a temperatura ambiente por 5 minutos, sem agitação;

5. Lavadas 2 vezes por 5 minutos com *Tween* 0,05%/4xSSC, ambiente (sob agitação);

6. Lavadas com 4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação);

7. Deixadas em 1xSSC por 5 minutos, e secas ao ar.

Montagem da Lâmina:

1. Foram misturados 200 μ L de *antifading* e 1 μ L de DAPI (0,2 mg/ mL).

2. 25 μ L da mistura foram colocados sobre cada lâmina, que foi coberta com uma lamínula e guardada no escuro.
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho AA, Júlio Jr. HF, Gomes LC, Bini LM, Agostinho CS (1997). Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: Vazoller AEAM, Agostinho AA, Hahn NS (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*, Maringá: EDUEM, 179-208.

Alves AL, Oliveira C, Foresti F (2005). Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica* 124:127-136

Armbruster JW (2003). The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa* 249:1-60.

Armbruster JW (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 141:1-80.

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

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

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

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

Artoni RF, Vicari MR, Bertollo LAC (2000). Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biology and Health Sciences* 6:43-60.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1:103-120.

Bueno V, Zawadzki CH, Margarido V (2012). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22:241-250.

Cereali SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, 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* 7:583-591.

Chiachio MC, Oliveira C, Montoya-Burgos JI (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:606-617.

CNRH - Conselho Nacional de Recursos Hídricos (2003). Resolução nº. 32, 15 de outubro de 2003 - Institui a Divisão Hidrográfica Nacional. Diário Oficial da União, 17 de dezembro de 2003.

Cramer CA, Bonatto SL, Reis RE (2011). Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59:43-52.

De Pinna MCC (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, Porto Alegre: EDIPUCRS, 279-330.

Ferraris CJ (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418:1-628.

Ferreira E, Zuanon J, Santos G, Amadio S (2011). A ictiofauna do Parque Estadual do Cantão, Estado do Tocantins, Brasil. *Biota Neotropica* 11:277-284.

Froese R, Pauly D. 2012. FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em http://www.fishbase.org. Acesso em 12 de março de 2012.

Godoy MP (1986) Peixes e pesca do rio Paraná: área do futuro reservatório de Ilha Grande, Florianópolis: Eletrosul, 448pp. Griffiths SP (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57:1453-1464.

Gubiani EA, Holzbach AJ, Baumgartner G, Rezende-Neto LB, Bergmann F (2006). Fish, Piquiri River, upper Paraná river basin, Paraná state, Brazil. *Check list* 2:9-14.

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

IAP - Instituto Ambiental do Paraná (2008). Avaliação Ambiental Integrada – Bacia do rio Piquiri. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteu do=1074. Acesso em 01 de Janeiro de 2012.

Ingenito LFS, Duboc LF, Abilhoa V (2004). Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arquivos de ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar* 7:23-36.

Kavalco KF, Pazza R. Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004a). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetics and Genome Research* 106:107-110.

Kavalco KF, Pazza R. Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004b). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas* 141:237-242.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94:180-186.

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

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco basin (MG, Brasil). *Micron* 40:552-559.

Margarido VP, Moreira-Filho O (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostaariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* 31:235-238.

Martinez ERM (2009). Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em carcteres cromossômicos e seqüências de DNA. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista.

Martinez ERM, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C (2011). Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetics and Molecular Biology* 34:562-568.

McNeill AR (1981). Carps and perches. In: McNeill AR. *The Chordates*. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 173-206.

Mendes-Neto EO, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O (2011). Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in Hypostomus. *Comparative Cytogenetics* 5:133-142.

Michele JL, Takahashi CS, Ferrari I (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 42:539-546.

Milhomem SSR, Castro RR, Namagashi CY, Souza ACP, Feldberg E, Pieczarka JC (2010). Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comparative Cytogenetics* 4:45-54.

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2006a). Caderno da Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia. 132pp.

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2006b). Plano Nacional de Recursos Hídricos.
 Panorama e estado dos recursos hídricos do Brasil, volume 1. 281pp.

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2006c). *Caderno da Região Hidrográfica do Paraná*. 240pp.

Montoya-Burgos JI (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular ecology* 12:1855-1857.

Muller S, Weber C (1992). Les dents des sous-families Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue Suisse de Zoologie* 99:747-754.

Muramoto JI, Ohno S, Atkin NB (1968). On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma* 24:59-66.

Nelson JS (2006). Fishes of the World, New York: John Wiley and Sons, 601 pp.

Pavanelli CS (2006). New species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the Rio Piquiri, upper rio Paraná basin, Brasil. *Copeia* 2006:89-95.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:2934-2938.

Reis RE (1998). Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* 124:105-168.

Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 147:277-299.

Rubert M, Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC, Giuliano-Caetano L (2011) Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal variety. *Comparative Cytogenetics* 5:397-410.

Schweizer D (1980). Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 27:190-193.

Stevaux JC, Souza-Filho EE, Jabur IC (1997). A história quaternária do rio Paraná em seu alto curso. In: Vazoller AEAM, Agostinho AA, Hahn NS (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*, Maringá: EDUEM, 47-72.

Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306.

Weber C (2003). Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr., eds. *Check list* of the freshwater fishes of South and Central America, Porto Alegre: Edipucrs, 351-372.

5. CAPÍTULO 1

Tendências na evolução cromossômica no gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): uma nova perspectiva sobre a correlação entre número diplóide e tipos cromossômicos

Bueno V, Zawadzki CH, Margarido V (2012). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology*

and Fisheries 22:241-250.

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da publicação científica:

Reviews in Fish Biology and Fisheries

Normas para publicação disponíveis em: http://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/11160?print_view=true&detailsPa ge=pltci_1060192

Resumo

As relações filogenéticas e identificação de espécies do gênero Hypostomus ainda não são claras. Considerando isto, a citogenética tem-se mostrado uma ferramenta útil no entendimento da sistemática do gênero. Revisões em Hypostomus indicam que o número diplóide varia de 54 a 84 cromossomos e o aumento do número diplóide foi associado a porcentagens maiores de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos. Embora exista um número grande de espécies no gênero, existem relativamente poucos artigos relacionados à citogenética de Hypostomus, e a maior parte dos dados é publicada em comunicações de simpósios. Com o objetivo de entender a evolução cromossômica do gênero (correlação entre número diplóide x tipos cromossômicos), H. ancistroides e H. topavae do rio Piquiri, bacia do Alto Paraná, foram citogeneticamente analisados, sendo observados os números diplóides de 68 e 80 cromossomos respectivamente. Dados adicionais sobre o número cromossômico e fórmula cariotípica foram compilados de 27 análises publicadas em artigos e 77 de resumos. Nossa análise não mostrou correlação entre números cromossômicos e porcentagens de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos na maior parte das espécies, já que existe variação considerável entre estas porcentagens mesmo entre espécies com o mesmo número diplóide, indicando que a proporção entre tipos cromossômicos não está sempre associada ao número diplóide.

Palavras-Chave: *Hypostomus ancistroides*; *Hypostomus topavae*; diversidade cariotípica; citogenética de peixes.

Abstract

Phylogenetic relationships and identification of species of the genus Hypostomus is still unclear. Considering this, cytogenetics may prove itself as an important tool in understanding the systematic of this genus. Reviews in Hypostomus indicate that the diploid number ranges from 54 to 84 chromosomes, and the increase in diploid number has been associated to higher percentages of subtelocentric and acrocentric chromosomes. Although there is a high number of species in the genus, there are relatively few papers concerning *Hypostomus* cytogenetics, and most of the data is published as grey literature. With the aim to understand the chromosomal evolution in the genus (correlation between diploid number x chromosomes types), H. ancistroides and H. topavae from the Piquiri River, Upper Paraná River Basin, were cytogenetically analyzed, and the diploid number observed was 68 and 80 chromosomes, respectively. Additional data on the diploid number and chromosome formulae was compiled from 27 analysis from papers and 77 from grey literature. Our analysis shows no correlation between chromosome numbers and percentages of subtelocentric and acrocentric chromosomes for most of the species, since there is considerable variation between these percentages even between species with the same diploid number, indicating that the proportion of chromosome types is not always associated to diploid numbers.

Keywords: *Hypostomus ancistroides; Hypostomus topavae*; karyotypic diversity; fish cytogenetics.

Introdução

A família Loricariidae é um dos táxons mais especiosos entre os Siluriformes, com cerca de 700 espécies agrupadas em sete subfamílias: Delturinae, Hypoptomatinae, Hypostominae, Lithogeneine, Loricariinae, Neoplecostominae e Otothyrinae (Reis et al. 2006; Ferraris 2007; Chiachio et al. 2008). As relações filogenéticas entre os Hypostominae não são muito claras, especialmente no gênero *Hypostomus*. O estudo mais recente sobre os relacionamentos entre os Hypostominae foi publicado por Armbruster (2004). O autor apresentou uma análise detalhada sobre as relações dentro de Loricariidae, e sinonimizou os gêneros originalmente contidos na tribo Hypostomini (*Aphanotorulus, Cochliodon, Isorineloricaria, Squaliforma e Watawata*) como *Hypostomus*. Montoya-Burgos (2003), através de análises de seqüências *D-loop*, encontrou *Aphanotorulus, Isorineloricaria e Hypostomus emarginatus* fora do clado principal de *Hypostomus*. O autor reconheceu os gêneros *Aphanotorulus* e *Isorineloricaria*, e considerou *Hypostomus*. Mesmo com oum grupo polifilético, devido à não inclusão de *Hypostomus emarginatus*. Mesmo

Dados citogenéticos acumulados podem ser utilizados no estabelecimento de tendências evolutivas, identificação de espécies novas e distinção de espécies crípticas (Artoni et al. 2000; Bellafronte et al. 2010; Blanco et al. 2010; Perazzo et al. 2010). Considerando as dificuldades na identificação de diversas espécies de *Hypostomus* e sua filogenia obscura, a citogenética pode provar-se uma ferramenta importante no entendimento da sistemática do gênero.

Revisões sobre os dados citogenéticos existentes para *Hypostomus* foram apresentados por Artoni e Bertollo (1999; 2011), Kavalco et al. (2005) e Alves et al. (2006). Os números diplóides em *Hypostomus* variam de 54 cromossomos em *Hypostomus*

plecostomus (Muramoto et al. 2968) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali et al. 2008). Artoni e Bertollo (2001) consideram o número diplóide de 54 cromossomos basal para Hypostominae, usando Trichomycteridae como *outgroup*. Os autores observaram uma proporção maior de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos em espécies com números diplóides mais elevados, sugerindo que a evolução cromossômica em *Hypostomus* tenha ocorrido através de fissões cêntricas. Além disso, uma variação estrutural considerável entre espécies que compartilham o mesmo número diplóide foi observada, indicando diferenciação cariotípica através de mudanças estruturais como rearranjos robertsonianos e inversões pericêntricas (Kavalco et al. 2005).

A maior parte dos dados sobre a citogenética de *Hypostomus* parece ser publicada como "grey literature", provavelmente por causa das complicações envolvidas na identificação de espécies, o número substancial de novas espécies e a grande variação citogenética entre populações. A publicação de dados em eventos e o elevado número de espécies não identificadas ou supostamente novas para a ciência dificulta a compilação e análise dos dados, impedindo uma análise mais ampla do gênero. Portanto, uma revisão extensa dos dados citogenéticos disponíveis sobre *Hypostomus*, incluindo também os resumos publicados nos principais eventos de citogenética, permitiria uma visão mais precisa sobre os resultados obtidos para este grupo.

Material e Métodos

Duas espécies do gênero *Hypostomus* (Fig. 1) do rio Piquiri foram citogeneticamente analisadas: *H. ancistroides* (4 machos e 11 fêmeas) de Formosa do Oeste (Paraná, Brasil) e *H. topavae* (9 machos e 6 fêmeas), de Nova Laranjeiras (Paraná, Brasil). Os indivíduos foram sacrificados com overdose por óleo de cravo (Griffiths,

2000). Espécimes testemunho foram depositadas na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia – Universidade Estadual de Maringá, Brazil (NUP 3902 – *H. ancistroides* e NUP 11430 – *H. topavae*). Células metafásicas foram obtidas a partir do rim (Bertollo et al. 1978). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com Levan et al. (1964).

A revisão dos dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus* incluiu dados publicados em revistas científicas e em resumos apresentados nos Simpósios de Citogenética e Genética de Peixes, desde sua primeira edição, em 1986, até a última, em 2009. Dados repetidos ou inconsistentes não foram incluídos e análises de populações diferentes de uma mesma espécie foram levadas em consideração quando estes dados estavam disponíveis. A regressão linear e análise de variância com um fator foram conduzidas utilizando o *software* Statistica 7, utilizando os análises disponíveis nas Tabelas 1 e 2 que continham informação sobre a fórmula cromossômica. A análise de variância foi realizada considerando o número diplóide como fator de agrupamento, e cada número diplóide foi considerado como um grupo individual. As análises foram realizadas (1) considerando somente os dados publicados em revistas científicas e (2) considerando os dados publicados tanto em revistas científicas como em eventos.

Resultados

Hypostomus ancistroides apresentou 2n = 68 cromossomos ($14 \ m + 14 \ sm + 8 \ st + 32 \ a$) para ambos os sexos (Fig. 2a). *Hypostomus topavae* apresentou 2n = 80 cromossomos ($14 \ m + 10 \ sm + 26 \ st + 30 \ a$) para ambos os sexos (Fig. 2b). As tabelas 1 e 2 foram feitas considerando 27 análises compiladas de revistas científicas e 77 análises

provenientes de trabalhos apresentados em eventos, respectivamente. A regressão linear para o número cromossômico e a porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos mostraram valores de correlação de r = 0,648, P = 0,0008, considerando somente os dados publicados (Fig. 3), e r = 0,3215, P = 0,002, considerando os dados publicados tanto em revistas científicas quanto em eventos (Fig. 4). A análise de variância mostrou que a diferença na porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos não é significativa entre populações com números diplóides diferentes, com P = 0,05343, considerando somente os dados publicados, e P = 0,16714, considerando ambas as classes de dados.

Discussão

Considerando o elevado número de espécies em *Hypostomus*, mais de 120 de acordo com Zawadzki et al. (2010), existe relativamente poucos dados citogenéticos disponíveis na literatura (Tabela 1), e a maior parte dos dados disponíveis para o gênero é apresentada em publicações de eventos (Tabela 2). A revisão aqui apresentada mostra que o número diplóide em *Hypostomus* varia de 54 a 84 cromossomos. Algumas revisões anteriores consideram 2n=52 cromossomos em *Hypostomus emarginatus* o menor número diplóide para o gênero (Artoni e Bertollo 2001; Alves et al. 2006). Embora *Squaliforma* tenha sido considerado sinônimo de *Hypostomus* por Armbruster (2004), suas conclusões não são consensuais e existe um número de publicações que consideram *Squaliforma* como gênero válido (e.g. Weber 2003; Nelson 2006; Ferraris 2007; Froese e Pauly 2010). Os dados citogenéticos aqui apresentados sustentam a última conclusão, já que *S. emarginata* possui um número diplóide reduzido comparada às outras espécies de *Hypostomus*.

Artoni e Bertollo (1996; 2001) observaram que espécies com números diplóides mais elevados também apresentaram uma maior proporção de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, quando comparadas a espécies com números diplóides próximos de 54 cromossomos. Os autores analisaram a regressão linear entre os números diplóides e porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, encontrando uma correlação significativa (r = 0.8122, P < 0.0001), propondo que fissões cêntricas teriam sido importantes na evolução do gênero. Desde seus estudos, não foram realizadas novas análises sobre esta correlação. Nossa análise considerando somente dados publicados inclui uma quantidade relativamente pequena de dados novos comparada à análise de Artoni e Bertollo (2001), mesmo assim, os novos dados fazem o coeficiente de correlação diminuir para r = 0,6048, P = 0,0008. A análise realizada considerando também os dados publicados em eventos revela um coeficiente de correlação ainda menor (r =03215, P = 0,002), sugerindo que não é possível associar o aumento do número de cromossomos a maiores porcentagens de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos para a maior parte das espécies. A restrição a maiores proporções de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos parece ser característica ao grupo de espécies com 2n = 80cromossomos ou mais (incluindo H. topavae), onde cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos representam de 70,00 a 82,50% do cariótipo (Fig. 4), enquanto os grupos com números diplóides mais baixos apresentam uma grande variação nesta proporção. Além disso, a análise de variância realizada sobre estes dados mostra que estas diferenças não são significativas em nenhuma das situações (somente com os dados publicados em revistas científicas ou com todos os dados obtidos), indicando que a porcentagem de tipos cromossômicos e números diplóides não estão sempre associados (P-valor igual a 0,05343 e 0,16714, respectivamente).

Entre as espécies com números diplóides mais baixos, a porcentagem média de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos é de cerca de 61,00%, porém esta porcentagem varia consideravelmente mesmo entre espécies que compartilham o mesmo número diplóide, não sendo possível correlacionar os números diplóides com a predominância de determinados tipos cromossômicos para a maior parte das espécies (Fig. 4). A espécie com o menor número diplóide do gênero (*H. plecostomus*, com 54 cromossomos) possui 55,56% de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, um número maior do que o observado em algumas espécies como *Hypostomus* sp. G (40,63%), *Hypostomus ancistroides* (44,12%) e *Hypostomus* sp. D1 (50,00%) com números diplóides mais elevados (64, 68 e 72 cromossomos, respectivamente, Tabela 1). Estes dados mostram que não é possível associar números diplóides a porcentagens de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos em *Hypostomus*. A existência de variações nos cariótipos de espécies com o mesmo número diplóide indica que rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas representaram um papel importante da diferenciação cariotípica de *Hypostomus* (Kavalco et al. 2005).

Além da variação na proporção de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos ser observada entre espécies com o mesmo número diplóide, também é observada entre populações da mesma espécie, como em *H. ancistroides*, uma das espécies mais estudadas do gênero. Embora todas as populações analisadas apresentem 2n = 68 cromossomos, a fórmula cariotípica varia (Tabelas 1 e 2). A porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos nesta espécie varia de 44,00% em uma população analisada por Michele et al. (1977) a 79,00%, em uma população do ribeirão Carrapato (Tabela 2).

Considerando Hypostomus como um gênero rico em espécies e sua variação genética e morfológica, o número de espécies citogeneticamente analisadas ainda é

pequeno, e uma elevada proporção das espécies analisadas é constituída por espécies novas ou não identificadas.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (MMA/IBAMA) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências Bibliográficas

Alves AL, 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 128:1-9

Armbruster JW (2004) Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. Zool J Linn Soc 141:1-80

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

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

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

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

Artoni RF, Vicari MR, Bertollo LAC (2000) Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. Publicatio UEPG 6:43-60

Bellafronte E, Schemberger MO, Moreira-Filho O, Almeida MC, Artoni RF, Margarido VP, Vicari MR (2010) Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. Rev Fish Biol Fisheries. doi: 10.1007/s11160-010-9177-3

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

Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Diniz D, Moreira-Filho O (2010) Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). Rev Fish Biol Fisheries 20:1-8

Cereali SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, Froehlich O, Giuliano-Caetano L (2008) Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. Genet Mol Res 7:583-591

Chiachio MC, Oliveira C, Montoya-Burgos JI (2008) Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). Mol Phylogenet Evol 49:606-617.

Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418:1-628

Froese R, Pauly D (2010) FishBase. World Wide Web electronic publication. http://www.fishbase.org. Accessed 18 November 2010

Griffiths SP (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. J Fish Biol 57:1453-1464

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004) Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). Hereditas 141:237-242 Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Heredity 94:180-186

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

Michele JL, Takahashu CS, Ferrari I (1977) Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). Cytologia 42:539-546

Muramoto JI, Ohno S, Atkin NB (1968) On the diploid state of the fish order Ostariophysi. Chromosoma 24:59-66

Nelson JS (2006) Fishes of the world. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey

Perazzo G, Noleto RB, Vicari MR, Machado PC, Gava A, Cestari MM (2010) Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. Rev Fish Biol Fisheries. doi: 10.1007/s11160-010-9170-x

Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW (2006) Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. Zool J Linn Soc 147:277-299

Rubert M, Zawadzki CH, Giuliano-Caetano L (2008) Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). Neotrop Ichthyol 6:93-100

Weber C (2003) Subfamily Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (eds.) Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 351-372

Fspécie	2n	Fórmula cariotípica				st-a%	Localidade	UF	Referência	
	211	m	sm	st	а	51 470	Locandade	01	Referencia	
Hypostomus affinis	66	14	14	12	26	57.58	Córrego Jacuí	SP	Kavalco et al. 2004; Kavalco et al. 2005	
Hypostomus albopunctatus	74	10	20	2	14	59.46	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus ancistroides	68	14	14	8	32	58.82	Rio Piquiri	PR	Presente esudo	
Hypostomus ancistroides	68	16	18	3	34	50.00	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus ancistroides	68	18	10	12	28	58.82	Rio Araquá	SP	Alves et al. 2006	
Hypostomus ancistroides	68	10	28	3	30	44.12	-	-	Michele et al. 1977	
Hypostomus aff. auroguttatus ²	76	8	30	3	38	50.00	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus goyazensis	72	10	16	10	36	63.89	Rio Vermelho	GO	Alves et al. 2006	
Hypostomus macrops	68	10	14	2	14	64.71	-	-	Michele et al. 1977	
Hypostomus nigromaculatus	76	8	20	2	48	63.16	Rio Mogi-Guaçu	SP	Rubert et al. 2008	
Hypostomus nigromaculatus	76	6	20	4	50	65.79	Rio Tibagi	PR	Rubert et al. 2008	
Hypostomus paulinus	74	10	20	2	14	59.46	-	-	Michele et al. 1977	
Hypostomus plecostomus	54	2	24	12	18	55.56	-	-	Muramoto et al. 1968	
Hypostomus regani	72	10	20	2	42	58.33	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo, 1996	
Hypostomus regani	72	12	18	26	16	58.33	Rio Araquá	SP	Alves et al. 2006	
Hypostomus strigaticeps	74	8	4	6	52	83.78	-	-	Michele et al. 1977	
Hypostomus topavae	80	14	10	26	30	70.00	Rio Piquiri	PR	Presente esudo	
Hypostomus sp. 2	84	6	16	6	52	73.81	Rio Perdido	MS	Cereali et al. 2008	
Hypostomus sp. 3	82	6	12	6	54	78.05	Córrego Salobrinha	MS	Cereali et al. 2008	
Hypostomus sp. A	70	18	14	3	38	54.29	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus sp. B	72	12	18	2	42	58.33	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus sp. C	72	10	18	2	14	61.11	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus sp. D1	72	10	26	3	36	50.00	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus sp. D2	72	14	20	3	38	52.78	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus sp. E	80	8	16	4	56	70.00	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	Artoni e Bertollo 1996	
Hypostomus sp. F	76	10	16	4	50	65.79	Rio São Francisco	MG	Artoni e Bertollo, 1999	
Hypostomus sp. G	64	14	24	2	26	40.63	Rio Araguaia	MT	Artoni et al. 1998	

Tabela 1 Dados citogenéticos publicados em revistas científicas para Hypostomus

Espécie	2n	Fórmula cariotípica				st-a%	Localidade	UF	Referência	Encontro ¹
Lipecie	Espècie 21		sm	st	а	50 470	Locurado			2
Hypostomus albopunctatus	74	8	18	14	34	64.86	Rio São João	PR	Casale et al. 2002	5
Hypostomus albopunctatus	74	10	20	4	4	59.46	Rio Piracicaba	SP	Rubert et al. 2009a	9
Hypostomus albopunctatus	74	10	20	4	4	59.46	Rio Mogi-Guaçu	SP	Rubert et al. 2009b	9
Hypostomus albopunctatus	74	8	12	5	4	72.97	Rio Paranapanema	-	Penteado et al. 2009	9
Hypostomus ancistroides	68	14	16	12	26	55.88	Córrego Cambira	PR	Paiva et al. 2008	8
Hypostomus ancistroides	68	8	6	26	28	79.41	Córrego Carrapato	SP	Martinez et al. 2008	8
Hypostomus ancistroides	68	14	14	8	32	58.82	Rio Piquiri	PR	Schneider et al. 2008	8
Hypostomus ancistroides	68	14	16	12	26	55.88	Rio Mogi-Guaçu	SP	Brandão et al. 2008	8
Hypostomus ancistroides	68	14	16	22	16	55.88	Rio Passa-cinco	SP	Traldi et al. 2009b	9
Hypostomus cf. ancistroides	68	16	6	26	20	67.65	Córrego Maringá	PR	Endo et al. 2006a	7
Hypostomus cf. ancistroides	68	8	10	16	34	73.53	Córrego Ximbaúva	-	Endo et al. 2006a	7
Hypostomus cf. ancistroides	68	11	15	16	26	61.76	Córrego Tatupeba	PR	Endo et al. 2006b	7
Hypostomus cf. ancistroides	68	12	14	16	26	61.76	Córrego Tauá	PR	Endo et al. 2006b	7
Hypostomus cf. ancistroides	68	16	6	26	20	67.65	Córrego Maringá	PR	Endo et al. 2006b	7
Hypostomus auroguttatus	74	14	42	18		24.32	Rios Santo Antônio e Casca	PR	Eler et al. 2002	5
Hypostomus cochliodon	62	-	20	42		67.74	Planalto da Bodoquena	MS	Cereali et al. 2004	6
Hypostomus cochliodon	64	-	-	-	-	-	Rio Salobra e córrego Salobrinha	MS	Cereali et al. 2008	8
Hypostomus commersoni	68	10	18	8	32	58.82	Rio Iguaçu	PR	Casale et al. 2002	5
Hypostomus commersoni	66	12	16	10	28	57.58	Ponta Grossa	PR	Maurutto et al. 2009	9
Hypostomus derbyi	68	10	8	16	34	73.53	Rio Iguaçu	PR	Casale et al. 2002	5
Hypostomus derbyi	66	-	-	-	-	-	Bacia do Alto Iguaçu	PR	Maurutto et al. 2008	8
Hypostomus derbyi	68	10	8	16	34	73.53	Rio 14	PR	Candiotto et al. 2009	9
Hypostomus aff. derby	80	-	24	5	6	70.00	Ribeirão Keller	PR	Lara-Kamei e Júlio-Júnior 2002	5
Hypostomus heraldoi	74	8	20	4	-6	62.16	Rio Mogi-Guaçu	SP	Rubert et al. 2009b	9
Hypostomus heraldoi	74	8	20	4	-6	62.16	Rio Pirapitinga	GO	Rubert et al. 2009b	9
Hypostomus hermanni	68	12	14	10	32	61.76	Ribeirão Keller	PR	Lara-Kamei e Júlio-Júnior 2002	5
Hypostomus hermanni	72	8	18	4	-6	63.89	Rio Piracicaba	SP	Rubert et al. 2009a	9

 Tabela 2 Dados citogenéticos publicados em eventos para Hypostomus

Tabela 2 cont.

Fsnécies	2n	Fórmula cariotípca				l st-a%	Localidade	UF	Referência	Encontro ¹
Lapeeles	211	т	sm	st	а	31-470	Localidade	01	Referencia	Licolido
Hypostomus iheringii	80	8	16	28	28	70.00	Rio Passa-cinco	SP	Traldi et al. 2009a	9
Hypostomus cf. iheringii	80	8	14	5	8	72.50	Rio Piracicaba	SP	Rubert et al. 2009a	9
Hypostomus margaritifer	72	10	16	14	32	63.89	Rio Piquiri	PR	Lorscheider et al. 2009	9
Hypostomus margaritifer	72	3	32	4	0	55.56	Rio Pardo	-	Penteado et al. 2009	9
Hypostomus myersi	74	12	14	18	30	64.86	Rio Iguaçu	PR	Casale et al. 2002	5
Hypostomus myersi	74	12	14	10	38	64.86	Rio Iguaçu	PR	Lui e Margarido, 2006	7
Hypostomus nigromaculatus	76	6	20	5	0	65.79	Ribeirão Três Bocas	PR	Rubert e Giuliano-Caetano 2006a	7
Hypostomus nigromaculatus	76	8	20	4	8	63.16	Cachoeira Emas	SP	Rubert e Giuliano-Caetano 2006a	7
Hypostomus nigromaculatus	76	12	22	30	12	55.26	Rio Passa-cinco	SP	Traldi et al. 2009b	9
Hypostomus paulinus	76	6	16	5	4	71.05	Rio Piracicaba	SP	Rubert et al. 2009a	9
Hypostomus plecostomus	68	-	-	-	-	-	-	-	Pileggi et al. 1986	1
Hypostomus regani	72	14	12	8	38	63.89	-	-	Lara-Kamei e Júlio-Júnior 2000	4
Hypostomus regani	72	18	20	12	22	47.22	Rio Pardo	-	Penteado et al. 2009	9
Hypostomus cf. regani	72	12	18	26	16	58.33	Ribeirão Araquá	SP	Ishida et al. 2002	5
Hypostomus strigaticeps	72	10	16	4	-6	63.89	Ribeirão Três Bocas	-	Rubert e Giuliano-Caetano 2006b	7
Hypostomus strigaticeps	72	10	16	4	-6	63.89	Rio Jacutinga	-	Rubert e Giuliano-Caetano 2006b	7
Hypostomus strigaticeps	72	10	16	4	-6	63.89	Rio Araquá	-	Rubert e Giuliano-Caetano 2006b	7
Hypostomus strigaticeps	72	8	6	30	28	80.56	Córrego Carrapato	SP	Martinez et al. 2008	8
Hypostomus aff. strigaticeps	72	10	12	20	30	69.44	Reservatório de Itaipu	PR	Baumgartner et al. 2009	9
Hypostomus cf. tietensis	68	18	10	12	28	58.82	Ribeirão Araquá	SP	Ishida et al. 2002	5
Hypostomus cf. topavae	80	6	8	42	24	82.50	Córrego Carrapato	SP	Martinez et al. 2008	8
Hypostomus unae	76	-	-	-	-	-	Rio das Contas	BA	Bitencourt et al. 2008	8
Hypostomus cf. wuchereri	76	10	18	4	8	63.16	Rio Una	BA	Bitencourt et al. 2009	9
Hypostomus sp.	74	14	16	6	38	59.46	-	-	Lara-Kamei e Júlio-Júnior 2000	4
Hypostomus sp.	72	14	20	3	8	52.78	Ribeirão Apertados e rio Jataizinho	PR	Suaki et al. 2002	5
Hypostomus sp.	68	-	-	-	-	-	Ribeirão Apertados e rio Jataizinho	PR	Suaki et al. 2002	5
Hypostomus sp.	74	8	10	28	28	75.68	Ribeirão Cavalo	SC	Martinez et al. 2006	7

Tabela	2	cont.
--------	---	-------

Espácios	2n	Fe	órmula	cariotíp	oca	st a%	Localidada	UE	Pafarância	Encontro ¹
Especies	211	т	sm	st	а	St-a%	Locandade	UF	Referencia	Elicoliuo
Hypostomus sp.	74	10	6	16	42	78.38	Ribeirão Araras	MG	Mendes-Neto et al. 2006	7
Hypostomus sp.	66	12	16	12	26	57.58	Bacia do Paranapanema	SP	Brandão et al. 2006a	7
Hypostomus sp.	68	20	16	6	26	47.06	Rio Mogi-Guaçu	SP	Brandão et al. 2006b	7
Hypostomus sp.	80	-	-	-	-	-	Rio Passa-cinco	SP	Traldi et al. 2008	8
Hypostomus sp.	68	12	12	8	36	64.71	Salto Segredo	PR	Maurutto et al. 2009	9
Hypostomus sp.	76	8	20	4	8	63.16	Rio Paranapanema	-	Penteado et al. 2009	9
Hypostomus sp.	72	-	-	-	-	-	Rio Araguari	MG	Correia et al. 2009	9
Hypostomus sp. 1	68	-	-	-	-	-	Reservatório Jurumim	SP	Fontanari et al. 1996	3
Hypostomus sp. 1	64	14	24	2	6	40.63	Rio Araguaia	MT	Oliveira e Venere 2000, Oliveira et al. 2002	4, 5
Hypostomus sp. 1	76	8	16	8	44	68.42	Ribeirão Keller	PR	Lara-Kamei e Júlio-Júnior 2002	5
Hypostomus sp. 2	72	-	-	-	-	-	Reservatório Jurumim	SP	Fontanari et al. 1996	3
Hypostomus sp. 2	72	,	38	3	4	47.22	Rio Araguaia	MT	Oliveira e Venere 2000	4
Hypostomus sp. 2	74	/	26	4	8	64.86	Rio Araguaia	MT	Oliveira e Venere 2000	4
Hypostomus sp. 2	72	-	-	-	-	-	Rio Araguaia	MT	Oliveira et al. 2002	5
Hypostomus sp. 2	84	6	16	6	2	73.81	Rio Perdido	MS	Cereali et al. 2006, Cereali et al. 2008	7, 8
Hypostomus sp. 3	64	16	14	18	16	53.13	Rio Araguaia	MT	Oliveira et al. 2002	5
Hypostomus sp. 3	76	8	6	16	46	81.58	Ribeirão Keller	PR	Lara-Kamei e Júlio-Júnior 2002	5
Hypostomus sp. 3	82	6	14	6	2	75.61	Rio Salobra e córrego Salobrinha	MS	Cereali et al. 2006, Cereali et al. 2008	7, 8
Hypostomus sp. A	68	-	-	-	-	-	-	-	Bertollo e Silva 1990	2
Hypostomus sp. B	74	-	-	-	-	-	-	-	Bertollo e Silva 1990	2
Hypostomus sp. C	72	-	-	-	-	-	-	-	Bertollo e Silva 1990	2
Hypostomus sp. D	72	-	-	-	-	-	-	-	Bertollo e Silva 1990	2
Hypostomus sp. E	80	-	-	-	-	-	-	-	Bertollo e Silva 1990	2

¹ Encontros: 1 – Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada a peixes neotropicais (1986); 2 – III Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada a peixes neotropicais (1990); 3 – VI Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada a peixes neotropicais (1996); 4 – VIII Simpósio de citogenética e genética de peixes (2000); 5 – IX Simpósio de citogenética e genética de peixes (2002); 6 – X Simpósio de citogenética e genética de peixes (2004); 7 – XI Brazilian symposium on fish cytogenetics e genetics (2006) 8 – XII Simpósio de citogenética e genética de peixes (2008); 9 – XIII Simpósio de citogenética e genética de peixes (2009).



Figura 1 Vista lateral de (a) *Hypostomus ancistroides* (255 mm) e (b) *Hypostomus topavae* (125 mm).

m	ថ្ងី ឆ្នី 1	¥ # 2	# K 3	в Ж 4	¥∦ 5	n,⊯ 6	≍≋ 7			а
sm	8	b ă 9	10	義員 11	為 後 12	1 N 13	ō Ă 14			
st	15	16	4 đ 17	h A 18						
а	19 29	20 30	21 31	22 32	23 33	24 34	2 5	8 8 26	27	0 6 28
m	<i>اً ا</i> لْاً 1	8 X 2	## 3	₩¥ 4	5 5	8 X 6	* # 7			b
sm	8	9 9	ă 🎽 10	តីទី 11	ስ ቆ 12					
st	13 23	14 24	15 25	M 16	貴翦 17	₩ (18) 18	∰# 19	20	21	8 4 22
a	26	27	28	29	2 A 30	31	6 R 32	3 3	4 6 34	8 6 35
	36	37	38	39	40				_	

Figura 2 Cariótipo corado com Giemsa de (a) *Hypostomus ancistroides* e (b) *Hypostomus topavae*. A barra representa 5 μ m.



Figura 3 Regressão linear entre a porcentagem de cromossomos subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a%) e números diplóides (2n) em espécies de *Hypostomus*, considerando somente dados publicados em revistas científicas. O tamanho dos círculos representa o número de populações/espécies que compartilham o mesmo número diplóide e porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos.



Figura 4 Regressão linear entre a porcentagem de cromossomos subtelocêntricos-acrocêntricos (st-a%) e números diplóides (2n) em espécies de *Hypostomus*, considerando os dados publicados em revistas científicas e em eventos. O tamanho dos círculos representa o número de populações/espécies que compartilham o mesmo número diplóide e porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos.

Diversificação cariotípica em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): perspectivas biogeográficas e filogenéticas

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da publicação científica :

Zoological Journal of the Linnean Society

Normas para publicação disponíveis em: http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0024-4082&site=1

Resumo

Hypostomus é um gênero de peixes especioso de sistemática e filogenia complexas. Dez espécies de Hypostomus (H. albopunctatus, H. ancistroides, H. cochliodon, H. commersoni, H. faveolus, H. hermanni, H. aff. paulinus, H. regani, H. strigaticeps e H. topavae) foram citogeneticamente analisadas através de coloração por Giemsa e impregnação por prata, e os dados obtidos foram correlacionados com as análises biogeográficas e filogenéticas disponíveis para o gênero. Embora as AgRONs tenham variado significativamente entre as espécies, os números diplóides puderam ser correlacionados à distribuição das espécies em bacias do norte e sul da América do Sul. Espécies com números diplóides mais baixos (2n=64) foram associadas a bacias hidrográficas do norte e apresentaram um único par portador de AgRONs. Números diplóides de 66 a 68 cromossomos e de 70 a 84 cromossomos foram correlacionados a dois grandes clados de Hypostomus e a bacias hidrográficas do sul, e apresentaram AgRONs variando em número e posição. Os resultados apresentados demonstram que os dados citogenéticos disponíveis podem ser correlacionados com a filogenética e biogeografia do gênero, auxiliando no esclarecimento de sua complexa história evolutiva.

Palavras-chave: AgRONs – número diplóide – bacias da América do Sul – evolução cromossômica – Hypostominae

Abstract

Hypostomus is a specious fish genus with unclear systematics and phylogenetic relationships. Ten species of *Hypostomus* (*H. albopunctatus*, *H. ancistroides*, *H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H. faveolus*, *H. hermanni*, *H.* aff. *paulinus*, *H. regani*, *H. strigaticeps* and *H. topavae*) were cytogenetically analyzed through Giemsa staining and silver nitrate impregnation, and the obtained data were correlated to the available biogeographical and phylogenetic analyses for the genus. Although the AgNORs were found to vary significantly among the species, the diploid numbers could be correlated to the distribution of the species on northern and southern South America river basins. Species with the lower diploid numbers (2n=64) were associated to northern hydrographic basins and showed a single AgNOR bearing pair. Diploid numbers of 66 to 68 chromosomes and from 70 to 84 chromosomes were correlated to two major clades within *Hypostomus* and southern hydrographic basins, and showed AgNORs varying on number and position. Our results show that the available cytogenetic data can be correlated to the phylogenetics and biogeography of the genus, helping to clarify its complex evolutionary history.

Keywords: AgNORs – diploid number - South America river basins – chromosomal evolution – Hypostominae

Introdução

O gênero *Hypostomus* compreende 130 espécies, com sua maior diversidade nas bacias do Amazonas e Paraná (Ferraris, 2007; Froese & Pauly, 2012). Embora muitas tentativas tenham sido realizadas para esclarecer a sistemática e relações filogenéticas entre os táxons, existem muitos grupos não resolvidos dentro de *Hypostomus* e as filogenias propostas até o momento incluem um número limitado de espécies nominais (Montoya-Burgos 2003; Armbruster, 2003; Armbruster, 2004; Zawadzki *et al.*, 2005; Zawadzki, Renesto & Mateus, 2008a; Martinez, 2009).

Dados os problemas para estabelecer as relações filogenéticas entre espécies e o pequeno número de espécies nominais citogeneticamente analisadas, as hipóteses disponíveis sobre a evolução cromossômica em *Hypostomus* são muito vagas. Números diplóides baixos e um único par de cromossomos portadores de Regiões Organizadoras de Nucléolos detectadas por AgNO₃ (AgRONs) são consideradas características basais, e a diferenciação cariotípica das espécies supostamente foi originada por fissões cromossômicas, que causaram o aumento do número diplóide, seguido por rearranjos (i.e., inversões pericêntricas) que originaram uma diversidade de fórmulas cromossômicas (Artoni & Bertollo, 1996; 2001; Alves, Oliveira & Foresti, 2005; Kavalco *et al.*, 2005; Bueno, Zawadzki & Margarido, 2012).

Considerando a hipótese hidrogeológica para a diversificação da fauna de peixes Neotropicais, os eventos geológicos que alteraram a estrutura das bacias hidrográficas seriam responsáveis pelos principais eventos de vicariância e dispersão das espécies (Lundberg *et al.*, 1998; Montoya-Burgos, 2003). Para *Hypostomus*, um dos principais eventos cladogênicos está aparentemente associado com a separação das bacias do Amazonas e do Paraná, explicando alguns aspectos de seu cenário evolutivo (MontoyaBurgos, 2003). No presente trabalho, os dados citogenéticos existentes sobre os números diplóides e AgRONs para *Hypostomus* spp. foram comparados e correlacionados com a distribuição das espécies em bacias do norte (bacias dos rios Xingu e Tocantins-Araguaia) ou do sul (bacias dos rios Paraná e Paraguai) da América do Sul.

Material e Métodos

Dez espécies de *Hypostomus* foram coletadas e analisadas através de técnicas citogenéticas básicas. As espécies e localidade de coleta estão relacionadas na Tabela 1. Os espécimes foram anestesiados e sacrificados através de overdose por óleo de cravo (Griffiths, 2000). As preparações cromossômicas foram obtidas através da técnica proposta por Bertollo, Takahashi & Moreira-Filho (1978). As lâminas foram coradas com Giemsa e fotografadas para a determinação do número diplóide e fórmula cariotípica. Foi utilizado os softwares DP Controller 3.2.1.276 em conjunto com a câmera digital Olympus DP 71, conectada ao microscópio de epifluorescência BX 61 para a obtenção das fotografias das metáfases. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan, Fredga & Seberg (1964). As RONs foram detectadas através da impregnação por prata (Howell & Black, 1980).

Resultados

Hypostomus cochliodon Kner, 1854 apresentou o número diplóide de 64 cromossomos (12 m + 16 sm + 16 st + 20 a) (Figura 1A) e AgRONs na região telomérica do braço longo do par 28 (Figura 3).

Hypostomus faveolus Zawadzki, Brindelli & Lima, 2008 apresentou 2n=64 cromossomos (18 m + 8 sm + 22 st + 16 a) (Figura 1B) e AgRONs localizadas na região telomérica do braço curto do par 31 (Figura 3).

Hypostomus commersoni Valenciennes, 1836 apresentou 2n=68 cromossomos (12 m + 14 sm + 14 st + 28 a) (Figura 1C) e AgRONs múltiplas, localizadas na região terminal do braço curto do par 23 e em um dos cromossomos do par 17, na região intersticial do braço curto de um dos cromossomos do par 17 e na região terminal do braço longo do par 31 (Figura 3).

Hypostomus hermanni (Ihering, 1905) apresentou 2n=72 cromossomos (10 m + 8 sm + 32 st + 22 a) (Figura 1D) e AgRONs múltiplas, localizadas na região terminal do braço curto dos pares 27, 29 e 33 (Figura 3).

Hypostomus regani (Ihering, 1905) apresentou 2n=72 cromossomos (12m + 8sm + 10st + 42a) (Figura 2A) e AgRONs múltiplas, localizadas na região terminal do braço curto dos pares 32 e 35 para ambas as populações (Figura 3).

Hypostomus strigaticeps (Regan, 1908) apresentou 2n=72 cromossomos (12 m + 12 sm + 18 st + 30 a) (Figura 2B) e AgRONs múltiplas, localizadas na região terminal do braço longo dos pares 25 e 32 (Figura 3).

Hypostomus albopunctatus (Regan, 1908) apresentou o número diplóide de 74 cromossomos (8 m + 14 sm + 16 st + 36 a) (Figura 2C), e AgRONs localizadas na região terminal do braço curto do par 35. Alguns indivíduos apresentaram uma marcação adicional da região terminal do braço longo em um dos homólogos, e um indivíduo apresentou um dos cromossomos do par somente com uma marcação terminal no braço longo (Figura 3).

Hypostomus aff. *paulinus* (Ihering, 1905) apresentou 2n=74 cromossomos (10 m + 12 sm + 20 st + 32 a) (Figura 2D) e AgRONs localizadas na região terminal do braço longo do par 35 (Figura 3).

Hypostomus ancistroides (Ihering, 1911) e *H. topavae* (Godoy, 1969) do rio Piquiri já tiveram seus números diplóides e fórmulas cariotípicas descritos (Bueno *et al.*, 2012), apresentando 2n=68 cromossomos (14 m + 14 sm + 8 st + 32 a) e 2n=80cromossomos (14 m + 10 sm + 26 st + 30 a), respectivamente. A impregnação por nitrato de prata revelou AgRONs múltiplas para *H. ancistroides*, localizada na região terminal do braço curto dos pares 19 e 20, e AgRONs simples para *Hypostomus topavae*, localizadas na região terminal do braço curto do par 26.

Discussão

Espécies com números diplóides de até 68 cromossomos

De acordo com Artoni & Bertollo (2001), o número diplóide de 54 cromossomos é basal para Loricariídeos. Sendo assim, *Hypostomus faveolus* seria uma das mais basais espécies citogeneticamente analisadas, já que somente *H. plecostomus* (2n=54) apresenta um número diplóide mais baixo. Martinez (2009) considera *H. faveolus* como a espécie mais basal em sua hipótese filogenética para *Hypostomus*, através da análise de sequências do gene mitocondrial citocromo b, sequências parciais do gene de RNAr 16S e sequências parciais do gene nuclear F-Reticulon 4.

De acordo com os dados citogenéticos publicados para *Hypostomus*, as espécies com números diplóides menores parecem estar dispersas principalmente em bacias do norte da América do Sul. Além de *H. faveolus*, cinco espécies citogeneticamente
analisadas apresentam o número diplóide de 64 cromossomos ou menos: *H. cochliodon*, *Hypostomus* sp. G, *Hypostomus* sp. Xingu 1, *Hypostomus* sp. Xingu 2, com 2n=64 e *H. plecostomus* com 2n=54 (Tabela 2). Um número diplóide tão baixo para *H. plecostomus* é discrepante dos números observados para todas as outras espécies analisadas de *Hypostomus*. A falta de informações sobre a localidade de coleta dos espécimes e ausência de qualquer outra espécie de *Hypostomus* com um número diplóide semelhante indicam que o espécime provavelmente foi incorretamente identificado. Sendo assim, os números diplóides mais baixos para *Hypostomus* estariam próximos de 64 cromossomos. Além de *H. cochliodon*, todas estas espécies estão distribuídas em bacias do norte. *Hypostomus cochliodon* é a espécie com o menor número diplóide em bacias do sul, sendo a única com 64 cromossomos. Porém, *H. cochliodon* está estreitamente relacionado com espécies das bacias do norte, formando um grupo bem definido de espécies chamado de *H. cochliodon* (Armbruster, 2003), reforçando a hipótese de que as espécies de *Hypostomus* com os números diplóides mais baixos estão localizadas principalmente em bacias do norte da América do Sul.

As únicas espécies provenientes das bacias do norte que apresentaram números diplóides maiores que 64 cromossomos foi *Hypostomus* sp. Xingu 3, com 2n=66 cromossomos e *H. goyazensis*, com 2n=72 cromossomos (Tabela 2). A última foi coletada em uma localidade próxima da região de divisão entre as bacias do Tocantins-Araguaia e Paraná. Ainda, a filogenia proposta por Martinez (2009) define *H. goyazensis* como irmão de *H. cf. iheringi*, proveniente do rio Tietê, indicando que esta espécie possa estar mais relacionada às das bacias do sul. Não obstante, a proporção de espécies de *Hypostomus* provenientes das bacias do norte analisadas é surpreendentemente pequena, apesar da grande diversidade de espécies nessas regiões, sendo possível a existência de variabilidade cariotípica não documentada.

Enquanto as bacias do norte parecem conter as espécies com os menores números diplóides para o gênero, os números diplóides mais baixos para as bacias do sul provavelmente são de 2n=66 e 68 cromossomos. Este grupo contém, além de outras espécies, *Hypostomus commersoni* e *H. ancistroides*, analisados no presente trabalho, e *H. affinis*, com 2n=66 chromosomes (Tabela 2), o menor número diplóide para espécies das bacias do sul, excluindo *H. cochliodon*. A hipótese filogenética proposta por Montoya-Burgos (2003) dividiu *Hypostomus* em dois clados principais, um dos quais contém as espécies do grupo *H. cochliodon* além de algumas espécies que provavelmente representam o grupo *H. plecostomus*, proposto por Muller & Weber (2002) (Zawadzki, Birindelli & Lima, 2008b). Este grupo provavelmente é equivalente ao grupo de espécies com 2n=68 cromossomos ou menos, previamente discutido.

Espécies com 2n=70 a 2n=84 cromossomos

Além do clado formado pelos grupos *Hypostomus cochliodon* + *H. plecostomus*, existe outro clado principal com subdivisões distintas entre as filogenias propostas por Montoya-Burgos (2003) e Martinez (2009). Todas as espécies com números diplóides maiores que 68 cromossomos provavelmente são representantes deste clado (Montoya-Burgos, 2003; Martinez, 2009), inclusive *H. albopunctatus*, *H. hermanni*, *H. regani*, *H.* aff. *paulinus*, *H. strigaticeps* e *H. topavae*. A única espécie citogeneticamente analisada com número diplóide dentro deste intervalo é *H.* aff. *heraldoi*. Porém, *H. heraldoi* aparenta ser uma espécie relacionada a *H. albopunctatus* (Zawadzki, Weber & Pavanelli, 2008c), que está inclusa neste clado, indicando que *H.* aff. *heraldoi* provavelmente pertence a este grupo. Como todas as espécies apresentam números diplóides maiores que 2n=68, é possível assumir que as espécies deste clado de *Hypostomus* compartilhem um ancestral com número diplóide de 70 ou 72 cromossomos. Embora os números diplóides das espécies analisadas pertencentes a este clado sejam sempre de 70 cromossomos ou mais, espécies com números diplóides iguais não formam grupos monofiléticos (Montoya-Burgos, 2003; Martinez, 2009). Isto indica que eventos que causaram o aumento do número diplóide em *Hypostomus* poderiam ter ocorrido independentemente em diferentes espécies/subgrupos, ao menos neste clado. Outra característica que corrobora esta hipótese é a frequente variação na formula cariotípica e número diplóide que ocorre entre populações da mesma espécie, mostrando que rearranjos cromossômicos são relativamente comuns neste grupo (Tabela 2; Bueno, Zawadzki & Margarido, 2012).

Regiões Organizadoras de Nucléolos

A presença de AgRONs em um único par de cromossomos é considerada basal para Loricariidae (Alves *et al.*, 2005). Em *Hypostomus*, o número e posição das AgRONs variam consideravelmente (Artoni & Bertollo, 2001), e a maior parte das espécies analisadas apresentaram múltiplos cromossomos portadores de AgRONs (Tabela 2). Contudo, todas as espécies analisadas provenientes das bacias do norte apresentaram AgRONs simples, o que junto com o número baixo de cromossomos indica que estas espécies apresentam características menos derivadas do que espécies de bacias do sul. Em espécies com AgRONs múltiplas existe variação no número e posição dos sítios entre populações de uma mesma espécie (interpopulacional), como em *H. albopunctatus* (veja Tabela 2), ou mesmo entre indivíduos de uma população (intrapopulacional), indicando que eventos que levaram à condição apomórfica de múltiplas AgRONs teriam ocorrido separadamente em espécies ou subgrupos de *Hypostomus*, já que é pouco provável que espécies com AgRONs múltiplas formem um grupo monofilético. Esta variação frequente pode ser causada por trocas genéticas entre cromossomos não homólogos ou pela transposição destas sequências, o que também explicaria a distribuição das AgNORs em posições diferentes em cada cromossomo de um par de homólogos como em *H. albopunctatus*.

Os dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus* podem ser correlacionados a hipóteses filogenéticas e biogeográficas existentes para o gênero, evidenciando que seus principais clados e o padrão de distribuição das espécies podem ser associados a uma amplitude de números diplóides. As AgRONs foram observadas principalmente em região telomérica de cromossomos acrocêntricos, em um único par de cromossomos para espécies das bacias do norte. O número de sítios de AgRONs variou entre as espécies das bacias do sul, contudo é possível que a análise de grupos menores de espécies relacionadas possa auxiliar no esclarecimento da origem da ampla variação observada neste grupo. Os resultados apresentados indicam a necessidade de estudos citogenéticos em *Hypostomus* das bacias do norte e estudos mais amplos em marcadores cromossômicos efetivos para o gênero, além dos benefícios de análises conjuntas que correlacionem os dados cromossômicos com diferentes análises buscando esclarecer a evolução cromossômica do grupo.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (MMA/IBAMA) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências Bibliográficas

Alves AL, Oliveira C, Foresti F. 2005. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica* 124:127-136.

Alves AL, 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* 128:1-9.

Armbruster JW. 2003. The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa* 249:1-60.

Armbruster JW. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 141:1-80.

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

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

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

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

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978 Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1:103-120.

Bitencourt JA, Affonso PRA, Giuliano-Caetano L, Dias AL. 2011. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. *Neotropical Ichthyology* 9:317-324.

Bueno V, Zawadzki CH, Margarido V. 2012. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* DOI 10.1007/s11160-011-9215-9 22:241-250.

Cereali SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, 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 7:583-591.

Ferraris CJ. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418:1-628.

Froese R, Pauly D. 2012. FishBase. World Wide Web electronic publication. http://www.fishbase.org. Acessado em 12 de março de 2012.

Griffiths SP. 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57:1453-1464.

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

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

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94:180-186.

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

Lundberg JG, Marschall LG, Guerrero J, Horton B, Malabarba MCSL, Wesselingh F. 1998. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS, eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* Porto Alegre: Edipucrs, 14-48.

Martinez ERM. 2009. Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e seqüências de DNA. Unpublished D. Thesis, Universidade Estadual Paulista.

Martinez ERM, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C. 2011. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetics and Molecular Biology*: 34:562-568.

Mendes-Neto EO, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O. 2011. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. *Comparative Cytogenetics* 5:133-142.

Michele JL, Takahashi CS, Ferrari I. 1977. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 42:539-546.

Milhomem SSR, Castro RR, Namagashi CY, Souza ACP, Feldberg E, Pieczarka JC. 2010. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comparative Cytogenetics* 4:45-54.

Montoya-Burgos JI. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 12:1855-1857.

Muramoto JI, Ohno S, Atkin NB. 1968. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma* 24:59-66.

Muller S, Weber C. 2002. Les dents des sous-families Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue suisse de Zoologie* 99:747-754.

Oyakawa OT, Akama A, Zanata AM. 2005. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa* 921:1-27.

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

Rubert M, Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC, Giuliano-Caetano L. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal variety. *Comparative Cytogenetics* 5:397-410.

Weber C. 2003. Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr., eds. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*, Porto Alegre: Edipucrs, 351-372.

Zawadzki CH, Renesto E, Reis RE, Moura MO, Mateus RP. 2005. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica* 123:271-283.

Zawadzki CH, Renesto E, Mateus RP. 2008a. Allozyme analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Rio Corumbá, Upper Rio Paraná basin, Brazil. *Biochemical Genetics* 46:755-769.

Zawadzki CH, Birindelli JL, Lima FCT. 2008b. A new pale-spotted species of *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins and rio Xingu basins in central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6:395-402.

Zawadzki CH, Weber C, Pavanelli CS. 2008c. Two new species of *Hypostomus* Lacépède (Teleostei: Loricariidae) from the Upper Rio Paraná basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6:403-412.

Espécie	Machos	Fêmeas	Localidade
Hypostomus albopunctatus	3	3	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR
Hypostomus ancistroides	4	11	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR
Hypostomus cochliodon	4	1	Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR
Hypostomus commersoni	1	1	Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR
Hypostomus faveolus	7	2	Rio Taquaralzinho, Barra do Garças, MT
Hypostomus hermanni	5	4	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus regani	4	2	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus regani	1	4	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR
Hypostomus aff. paulinus	6	7	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus strigaticeps	8	7	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus topavae	9	6	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR

Tabela 1 Número e sexo dos indivíduos de diferentes espécies de *Hypostomus* coletados em cada localidade.

Espécie	2n	т	sm	st	а	AgRONs	Localidade	UF	Ref
Bacias do Norte									
Hypostomus faveolus	64	18	8	22	16	Simples	Rio Araguaia	PR	1
Hypostomus sp. G	64	14	24	2	.6	Simples	Rio Araguaia	MT	2
Hypostomus sp. Xingu 1	64	16	16	3	2	Simples	Rio Xingu	PA	3
Hypostomus sp. Xingu 3	64+B	15	23	2	.6	Simples	Rio Xingu	PA	3
Hypostomus sp. Xingu 2	66	18	14	3	4	Simples	Rio Xingu	PA	3
Hypostomus goyazensis	72	10	16	10	36	Simples	Rio Vermelho	GO	4
Bacias do Sul									
Hypostomus cochliodon	64	12	16	16	20	Simples	Rio Iguaçu	PR	1
Hypostomus affinis	66	14	14	12 26		Múltiplas	Córrego Jacuí	SP	5,6
Hypostomus ancistroides	68	16	18	3	4	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus ancistroides	s 68 18 10 12 28 M		Múltiplas	Rio Araquá	SP	4			
Hypostomus ancistroides	68 10 26 32 M		Múltiplas	Bacia do rio Paranapanema	SP	8			
Hypostomus ancistroides	68	14	14	8	32	Múltiplas	Rio Piquiri	PR	1, 17
Hypostomus commersoni	68	12	14	14	28	Múltiplas	Rio Iguaçu	PR	1
Hypostomus sp.	68	6	6	32 24		Múltiplas	Rio Mogi-Guaçu	SP	9
Hypostomus sp. A	70	18	14	3	8	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus cf. heraldoi	72	6	6	26 34		Simples	Rio Mogi-Guaçu	SP	9
Hypostomus hermanni	72	10	8	32	22	Múltiplas	Rio Piquiri	PR	1
Hypostomus regani	72	10	20	4	-2	-	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus regani	72	12	18	26	16	Múltiplas	Rio Araquá	SP	4
Hypostomus regani	72	6	6	32	28	Múltiplas	Rio Mogi-Guaçu	SP	9
Hypostomus regani	72	8	16	20	28	Simples	Rio Piumhi	MG	10
Hypostomus regani	72	10	18	4	4	Múltiplas	Bacia do rio Paranapanema	SP	8
Hypostomus regani	72	12	8	10	42	Múltiplas	Rio Piquiri	PR	1
Hypostomus strigaticeps	72	10	16	4	-6	Múltiplas	Bacia do rio Paranapanema	SP	8
Hypostomus strigaticeps	72	12	12	18	30	Múltiplas	Rio Piquiri	PR	1
Hypostomus sp. B	72	12	18	4	-2	Simples	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus sp. C	72	10	18	4	4	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus sp. D1	72	10	26	3	6	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus sp. D2	72	14	20	3	8	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus aff. agna	74	8	10	32	24	Múltiplas	Ribeirão Cavalo	SC	9
Hypostomus albopunctatus	74	10	20	4	4	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus albopunctatus	74	8	14	16	36	Simples	Rio Piquiri	PR	1
Hypostomus aff. paulinus	74	10	12	20	32	Simples	Rio Piquiri	PR	1

Tabela 2 Dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus* para cada grupo de bacias, organizados por ordem crescente de número diplóide.

Tabela 2 cont.

Espécie	2n	т	sm	st	а	AgRONs	Localidade	UF	Ref
Bacias do Sul (continuação)									
Hypostomus aff. auroguttatus	76	8	30	3	8	Simples	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus nigromculatus	76	8	20	4	8	Múltiplas	Rio Mogi-Guaçu	SP	11
Hypostomus nigromculatus	76	6	20	5	0	Múltiplas	Rio Tibagi	PR	11
Hypostomus paulinus	76	6	16	6 54		Simples	es Bacia do rio Paranapanema		8
Hypostomus cf. wuchereri	76	10	18	4	8	Simples	Rio Mutum	BA	12
Hypostomus sp. F	76	10	16	5	0	-	Rio São Francisco	MG	13
Hypostomus cf. wuchereri	77	10	18	4	8	Simples	Rio Una	BA	12
Hypostomus cf. topavae	80	6	8	42	24	Múltiplas	Córrego Carrapato	SP	9
Hypostomus topavae	80	14	10	26 30		Simples	Rio Piquiri	PR	1, 17
Hypostomus sp. E	80	8	16	5	6	Múltiplas	Piracicaba e Mogi Guaçu	SP	7
Hypostomus sp. 3	82+B	6	12	6	4	-	Córrego Salobrinha	MS	14
Hypostomus sp. 2	84	6	16	6	2	Simples	Rio Perdido	MS	14
Localidade não especificada									
Hypostomus plecostomus	54	24		12	18	-	-	-	15
Hypostomus ancistroides	68	10	28	3	0	-	-	-	16
Hypostomus macrops	68	10	14	4	4	-	-	-	16
Hypostomus paulinus	74	10	20	0 44		-	-	-	16
Hypostomus strigaticeps	74	8 4 62		-	-	-	16		
1 - Presente estudo						10 - Mend	es-Neto <i>et al.</i> (2011)		

2 - Artoni et al. (1998)

3 - Milhomen et al. (2010)

4 - Alves et al. (2006)

5 - Kavalco et al. (2004)

6 - Kavalco et al. (2005)

7 - Artoni & Bertollo (1996)

8 - Rubert et al. (2011)

9 - Martinez et al. (2011)

11 - Rubert, Zawadzki & Giuliano-Caetano (2008)

12 - Bitencourt et al. (2011)

13 - Artoni & Bertollo (1999)

14 - Cereali et al. (2008)

15 - Muramoto, Ohno & Atkin (1968)

16 - Michele, Takahashi & Ferrari (1977)

17 - Bueno et al. (2012)

m	## 1	2	8 8 3	* K 4	XX 5	8 4				A	m	22	1 2	16 1 3	# 8 4	% # 5	* * 6	×¥ 7	жж 8	# # 9	В
sm	ŘŘ 7	11 8	8 9	1 0	XX 11	12	1 3	≜ ™ 14			sm	10	首長 11	X X 12	4 8 13						
st	15	16	17	1 8	1 9	20	21	22			st	14	11 15	1 6	## 17	18	1 9	20	21	10 22	23
a	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	а	24 25	0 0 26	8 0 27	28	A d 29	30	X 31	32		
m	8 a 1	2	3	88 4	* * 5	XX 6				С	т	ñ R	2	X € 3	88 4	* * 5					D
sm	81	8	8 9	XX 10	5 M 11	12	1 3				sm	1 6	1) h 7	8	8 h 9						
st	14	15	16	17	64 18	19	20				st	10	11	12	13	14	15	16	17	18	直 兼 19
а	21	22	23	24	25	26	¢ 6 27	28	2 9	3 0		20	21	A A 22	23	24	25				
	8 @ 31	32	8 33	34							а	26	27	28	29	X A 30	31	8 A 32	33	3 4	8 A 35
												36									

Figura 1 Cariótipos corados com Giemsa de (A) *Hypostomus cochliodon*; (B) *Hypostomus faveolus*; (C) *Hypostomus commersoni* e (D) *Hypostomus hermanni*. A barra representa 5 µm.

m	33	8 K 2	X X 3	2 X X 4	5	4 X 6				A	т	28	新期 2	<u>እ</u> እ 3	б ж 4	N K 5	ж ж 6				В
sm	ă ă 7	8	** 9	1 0							sm	¥,K	88	XX 9	<mark>እአ</mark> 10	ö ä 11	1 2				
st	11	12	13 13	14	15						st	13	X 4 14	X X 15	XK 16	K氏 17	1 8	// 1 9	20	21	
a	16	1 7	1 8	1 9	8 Å 20	21	22	23	24	25	а	5 R 22	1 23	2 4	25	26	27	2 8	A B 29	A B 30	3 1
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		3 2	3 3	8 6 34	3 5	36					
ļ	36																				
m	36 8 X 1	기 원 2	X X 3	11 18 4						С	т	គ័ត 1	2	% % 3	¥ % 4	## 5					D
m sm	36 8 X 1 8	3 1 2 6	** 3 7	11 H 4 5 A 8	88	4 8 10	8 6 11			С	m sm		XX 2 1 7	** 3 *# 8	¥ % 4	₩¥ 5 ¥ 4 10	截首 11				D
m sm st	36 8 X 1 5 5 12	2 6 13	** 3 7 8 8 14	11 H 4 8 8 15	9 9 16	4 a 10 17	86 11 18	1 9		C	m sm st	1 6 12	2 7 13	* 3 * 8 * 14	4 9 15	5 10 16	6 8 11 11 17	Å 6 18	A A 19	20	D
m sm st	36 8 X 1 0 f 5 12 20	2 6 13 21	** 3 7 14 14 22	4 8 8 15 23	9 16 24	10 10 17 6 A 25	36 11 46 18 6 26	19 27	A h 28	C 29	m sm st	1 6 12 22	2 7 13 23	3 8 14 24	4 9 15 25	5 10 16 26	11 17 27	18 28	19 29	20 30	D

Figura 2 Cariótipos corados por Giemsa de (A) *Hypostomus regani*; (B) *Hypostomus strigaticeps*; (C) *Hypostomus albopunctatus* e (D) *Hypostomus* aff. *paulinus*. A barra representa 5 µm.

Hypost	omus albop	unctaus	Hypostomus commersoni							
A A 35	3 5	35	17 23 31							
Hypos	tomus ancis	troides	Hyp	postomus re	gani					
19		20	3 2		35					
Hypos	tomus coch	liodon	Hypos	tomus aff. p	oaulinus					
	A			A A 35						
Нурс	ostomus favo	eolus	Hypos	stomus strig	aticeps					
	8 a 31		25		32					
Нуро	stomus herr	nanni	Нур	ostomus top	pavae					
1 27	29	X X 33		3 26						

Figura 3 Pares cromossômicos portadores de AgRONs das espécies

analisadas de Hypostomus. A barra representa 5 $\mu\text{m}.$

7. CAPÍTULO 3

Composição e distribuição da heterocromatina em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), com implicações para a diversificação cromossômica

no gênero

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da publicação científica :

Chromosome Research

Normas para publicação disponíveis no link "Instructions for authors" em: http://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10577

Resumo

Hypostomus é um gênero de peixes diverso, compreendendo 130 espécies nominais com considerável variabilidade na morfologia e padrões de cor. Foi realizado bandamento C e dupla coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI em dez espécies de *Hypostomus* (*H. albopunctatus*, *H. ancistroides*, *H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H. faveolus*, *H. hermanni*, *H.* aff. *paulinus*, *H. regani*, *H. strigaticeps* e *H. topavae*) com o objetivo de identificar possíveis padrões evolutivos no gênero. O grupo de espécies com números diplóides de até 68 cromossomos mostrou predominância de heterocromatina GC rica. Espécies com números diplóides mais elevados apresentaram diferentes padrões de composição e distribuição de heterocromatina: *Hypostomus regani*, *Hypotomus strigaticeps*, *Hypostomus albopunctatus* e *Hypotomus* aff. *paulinus* apresentaram heterocromatina AT-rica, verificada em posição equilocal entre alguns cromossomos de *H. regani* e *H. strigaticeps*, sugerindo a existências de mecanismos de dispersão destas seqüências. Alguns polimorfismos relacionados à variação no tamanho de segmentos GC-ricos foram observados. Tendências na diferenciação cromossômica do gênero baseadas na composição e localização de heterocromatina são discutidas.

Palavras-chave: Heterocromatina AT-rica, heterocromatina GC-rica, DAPI, CMA₃, dispersão de heterocromatina

Abstract

Hypostomus is a diverse fish genus, comprising 130 nominal species with considerable variability on morphology and color patterns. C-banding and double fluorochrome staining with CMA₃ and DAPI were performed on ten *Hypostomus* species (*H. albopunctatus*, *H. ancistroides*, *H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H. faveolus*, *H. hermanni*, *H. aff. paulinus*, *H. regani*, *H. strigaticeps* and *H. topavae*) with the aim to identify possible evolutive patterns within the genus. The group of species with diploid numbers up to 68 chromosomes showed predominance of GC-rich heterochromatin. Species with higher diploid numbers had different patterns for heterochromatin distribution and composition: *Hypostomus regani*, *Hypostomus strigaticeps*, *Hypostomus albopunctatus* and *Hypostomus* aff. *paulinus* showed interstitial AT-rich heterochromatin, which was on equilocal position among some chromosomes in *H. regani* and *H. strigaticeps*, suggesting the existence of dispersion mechanisms of these sequences. Some polymorphisms related to size variation of GC-rich segments were observed. Trends on chromosome differentiation on the genus based on the composition and localization of heterochromatin are discussed.

Keywords: AT-rich heterochromatin, GC-rich heterochromatin, DAPI, CMA₃, heterochromatin dispersion

Introdução

Hypostomus é um gênero rico em espécies, compreendendo 130 espécies nominais (Froese e Pauly, 2012). Apresentando considerável variabilidade em sua morfologia e padrões de coloração, o gênero contém um elevado número de espécies não descritas e espécies nominais com status incerto (Weber 2003), o que dificulta o estudo das relações filogenéticas entre os táxons e a identificação de espécies.

Estudos citogenéticos em *Hypostomus* iniciaram com as publicações de Muramoto *et al.* (1968), que foi o primeiro a descrever o cariótipo de *Hypostomus plecostomus*, e Michele *et al.* (1977) que descreveu os cariótipo de *Hypostomus paulinus*, *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus strigaticeps* e *Hypostomus macrops*. Pesquisas sobre o gênero continuaram com as publicações de Artoni e Bertollo (1996, 2001), e Artoni e Bertollo (1999), que introduziram as primeiras idéias sobre tendências evolutivas e distribuição de heterocromatina entre *Hypostomus* e forneceram mais descrições cariotípicas. Desde então, mais espécies tiveram seus cariótipos analisados, com números diplóides variando 54 cromossomos em *Hypostomus plecostomus plecostomus* (Muramoto et al. 1968) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (Cerealli et al 2008).

Variações significativas na natureza e distribuição de heterocromatina entre espécies de *Hypostomus* já foram relatas, e mecanismos de dispersão de heterocromatina foram propostos para o gênero (Artoni e Bertollo 1999). Contudo, mesmo que a quantidade de informações sobre os cariótipos das espécies tenha aumentado, ainda existem diversos problemas não resolvidos sobre a evolução cariotípica do gênero. A maior parte dos estudos está restrita à análise do número diplóide, fórmula cromossômica e localização das AgRONs, com poucos estudos apresentando padrões de distribuição de heterocromatina ou mapeando a localização do DNAr 5S e 18S. Considerando esta carência de dados, no presente trabalho são apresentadas a distribuição e composição da heterocromatina de dez espécies de *Hypostomus*, com observações sobre os polimorfismos de heterocromatina encontradas para o gênero e tendências observadas entre as espécies.

Material e Métodos

Dez espécies de *Hypostomus* foram coletadas nas bacias dos rios Piquiri, Iguaçu e Araguaia. Os locais de coleta e número de machos e fêmeas estão resumidos na Tabela 1. Os espécimes foram anestesiados e sacrificados através de overdose por óleo de cravo (Griffiths 2000) e células metafásicas foram obtidas de acordo com a técnica proposta por Bertollo et al. (1978). O bandamento cromossômico foi realizado de acordo com Sumner (1972), com modificações (Lui et al. 2009). A coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI seguiu o protocolo proposto por Schweizer (1980). Cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964). Cariótipos corados com Giemsa e AgRONs para estas espécies estão apresentados nos Capítulos 1 e 2.

Resultados

Hypostomus faveolus (2n=64; 18 m + 8 sm + 22 st + 16 a) apresentou regiões hetorocromáticas principalmente na região centromérica dos cromossomos, além de bandas na região telomérica do braço longo do par 7 e na região das RONs, em posição telomérica do braço curto do par 31 (Fig. 1a).

Hypostomus cochliodon (2n=64; 12 m + 16 sm + 16 st + 20 a) apresentou regiões heterocromáticas na região centromérica de alguns cromossomos e na região das RONs, em posição telomérica do braço longo do par 28 (Fig. 1b).

Hypostomus commersonni (2n=68; 12 m + 14 sm + 14 st + 28 a) apresentou heterocromatina centromérica em alguns pares, além de bandas na região telomérica do braço curto do par 8 e na região das RONs, em posição telomérica do braço curto dos pares 17 e 23, e no braço longo do par 32. Um dos cromossomos portadores de RONs do par 31 apresentou um bloco heterocromático amplificado, maior do que a porção eucromática do braço cromossômico (Fig.1c).

Hypostomus ancistroides (2n=68; 14 m + 14 sm + 8 st + 32 a) apresentou um número menor de cromossomos com heterocromatina centromérica. Bandas heterocromáticas também foram localizadas na região pericentromérica do braço curto dos pares 5 e 9, na região telomérica do braço longo dos pares 3, 28, 29 e 33, e no braço curto dos pares 19 e 20, na região das RONs. Alguns indivíduos apresentaram variação no tamanho da banda heterocromática do par 29, que se encontrava amplificada em um dos cromossomos do par (Fig. 1d).

Hypostomus hermanni (2n=72; 10 m + 8 sm + 32 st + 22 a) apresentou heterocromatina centromérica em alguns cromossomos, bandas heterocromáticas nas regiões intersticial e pericentromérica do braço longo do par 1, na região telomérica do braço longo dos pares 8, 19, 21, 25, 31 e 35, na região telomérica do braço curto dos cromossomos 23, 28, 30 e 32, e na região das RONs em posição telomérica do braço curto do par 4 e braço longo do par 12 (Fig. 2a).

Hypostomus regani (2n=72; 12 m + 8 sm + 10 st + 42 a) apresentou heterocromatina centromérica em alguns cromossomos, bandas heterocromáticas na

região pericentromérica do braço curto dos pares 4 e 12, na região telomérica do braço longo dos pares 28 e 32, na região das RONs, em posição telomérica do braço curto dos pares 32 e 35. Os pares 17, 18, 20, 22, 23, 29 e 31 apresentaram bandas equilocais intersticialmente no braço longo (Fig. 2b).

Hypostomus strigaticeps (2n= 72; 12 m + 12 sm + 18 st + 30 a) apresentou heterocromatina centromérica em muitos pares, bandas heterocromáticas na região intersticial do braço curto do par 1, na região pericentromérica do braço curto dos pares 4 e 7, na região telomérica do braço longo dos pares 21 e 30, na região intersticial do braço longo dos pares 20, 27 e 33, na região das RONs em posição telomérica do braço longo dos pares 25, 32 e 36, e dispersa pela maior parte do braço longo do par 25 (Fig. 2c).

Hypostomus albopunctatus (2n=74; 8 m + 14 sm + 16 st + 36 a) apresentou heterocromatina centromérica em alguns cromossomos, bandas heterocromáticas na região terminal do braço longo dos pares 19, 29, 32, 34 e 37, na região intersticial do braço longo dos pares 22 e 32, e na região das RONs em posição telomérica do braço longo e braço curto do par 35 (Fig. 2d).

Hypostomus aff. *paulinus* (2n=74; 10 m + 12 sm + 20 st + 32 a) apresentou heterocromatina centromérica em poucos cromossomos, bandas heterocromáticas na região pericentromérica do braço curto do par 2, na região telomérica do braço longo do par 21, na região intersticial do braço longo do par 25 e na região das RONs em posição telomérica do braço longo do par 35. A região heterocromática no par 25 apresentou tamanho variável nos cromossomos, ocupando somente a porção intersticial do braço longo ou a porção intersticial e pericentromérica, compreendendo cerca de metade do tamanho total do braço cromossômico (Fig. 2e).

Hypostomus topavae (2n=80; 14 m + 10 sm + 26 st + 30 a) apresentou heterocromatina centromérica em diversos cromossomos, bandas heterocromáticas na região pericentromérica do braço curto do par 2 e braço longo do par 14, e na região das RONs em posição telomérica do braço curto do par 26 (Fig. 2f).

A coloração por CMA₃/DAPI indicou composição GC-rica para todas as RONs, bandas pericentroméricas em um par metacêntrico em todas as espécies menos *H. cochliodon* e *H. commersoni*, algumas bandas teloméricas em *H. faveolus*, *H. ancistroides*, *H. commersoni*, *H. albopunctatus* e *H.* aff. *paulinus*, e para a banda intersticial/pericentromérica do par 22 de *H. paulinus*. A maior parte das bandas intersticiais no braço longo dos cromossomos apresentaram composição AT-rica, assim como algumas bandas teloméricas em *H. faveolus*, H. *strigaticeps*, *H. albopunctatus* e *H. regani*. As bandas intersticiais dispersas pelo braço longo do par 21 de *H. strigaticeps* também apresentaram composição AT-rica (Fig. 3, 4 e 5).

Discussão

Hypostomus cochliodon e *H. faveolus* pertencem ao grupo de espécies com os menores números diplóides em *Hypostomus*, característica considerada basal para este grupo. Ambas as espécies apresentam pouca heterocromatina, localizada principalmente na região centromérica dos cromossomos. Em *H. cochliodon*, somente a região das RONs é positiva para CMA₃ e não foi observada heterocromatina DAPI-positiva. *Hypostomus faveolus* apresentou um padrão distinto, com blocos CMA₃-positivos no braço longo do par 7 e pequenos blocos DAPI-positivos na região terminal do braço longo do par 21. Outras espécies com número diplóide de 64 e 65 cromossomos (2n=64 + 1B), *Hypostomus* sp. Xingu 1 e *Hypostomus* sp. Xingu 3, respectivamente,

apresentam diferentes padrões de distribuição de heterocromatina, com blocos DAPIpositivos na região intersticial do braço longo de um cromossomo e blocos terminais no braço curto e braço longo de um par metacêntrico/submetacêntrico de uma das espécies (Milhomem et al. 2010). Hypostomus sp. G da bacia do rio Araguaia, analisado por Artoni et al. (1998) também apresentou principalmente heterocromatina centromérica, com poucas bandas teloméricas e uma banda intersticial em um par, identificado como o cromossomo Z de um sistema sexual ZZ/ZW. Embora este grupo de espécies com números diplóides baixos provavelmente contenha as espécies mais basais para Hypostomus, já é verificado algum nível de diferenciação na distribuição e composição da heterocromatina entre as espécies. Considerando que a existência de poucas quantidades de heterocromatina localizada próximo à região centromérica dos cromossomos possa representar a condição ancestral para os Siluriformes e para os Loricariídeos (Degonzo et al. 2000, Oliveira e Gosztonyi 2000), é provável que uma condição semelhante à observada para H. cochliodon, com heterocromatina localizada somente na região centromérica/pericentromérica dos cromossomos e adjacente às RONs represente a condição ancestral para Hypostomus, com o aumento de blocos heterocromáticos representando um importante papel na diferenciação das espécies.

As espécies com 2n=68 cromossomos analisadas, *H. ancistroides* e *H. commersoni*, apresentaram blocos heterocromáticos teloméricos, além de na região centromérica dos cromossomos. Toda heterocromatina telomérica observada apresentou composição GC-rica, e ambas as espécies apresentaram um bloco GC-rico com variação de tamanho. *Hypostomus affinis*, com 2n=66 cromossomos, apresentou um padrão semelhante de composição e distribuição de heterocromatina, com os principais blocos heterocromáticos apresentando composição GC-rica (Kavalco et al. 2004). Embora a heterocromatina GC-rica normalmente esteja associada a sítios de RONs, a presença de

heterocromatina GC-rica não associada às RONs foi previamente descrita para outras espécies de peixes, como Pterygoplichthys anisitsi (Artoni et al. 1999), Leporinus desmotes (Margarido e Galetti 2000) e Astyanax scabripinnis (Souza et al. 2001). Hypostomus sp. Xingu 2 também apresentou 2n=66 cromossomos, porém com grande similaridade com Hypostomus sp. Xingu 1 e Hypostomus sp. Xingu 3 na composição e distribuição de heterocromatina, indicando que estas três espécies seiam filogeneticamente próximas (Milhomem et al. 2010). Hypostomus affinis, H. ancistroides e H. commersoni são parte de um subgrupo de Hypostomus chamado grupo Hypostomus plecostomus, descrito por Muller e Weber (2002). Estas espécies também são filogeneticamente próximas, de acordo com análises de D-loop e ITS realizadas por Montoya-Burgos (2003), sendo parte de um clado com Hypostomus punctatus. Desde que estas três espécies apresentaram o mesmo padrão geral de distribuição e composição de heterocromatina, assim como números diplóides semelhantes, a análise citogenética corrobora a análise filogenética previamente mencionada.

Espécies com 2n=72 e 2n=74 apresentaram padrões heterocromáticos muito heterogêneos. Enquanto *H. hermanni* apresentou somente heterocromatina GC-rica, adjacente às RONs e em pontos discretos na região telomérica/pericentromérica de alguns cromossomos, *H. albopunctatus*, *H.* aff. *paulinus*, *H. regani* e *H. strigaticeps* apresentaram tanto regiões AT-ricas quanto GC-ricas. Nestas espécies (exceto em *H.* aff. *paulinus*) a heterocromatina intersticial foi AT-rica e estava distribuída equilocalmente entre os pares cromossômicos em *H. strigaticeps* e *H. regani*. Isto indica a existência de um mecanismo de dispersão, tal como o proposto por Schweizer e Loidl (1987), com a transposição de segmentos teloméricos de pequenos cromossomos acrocêntricos para não-homólogos, seguida por homogeneização. Este modelo foi utilizado para explicar a ocorrência de heterocromatina equilocal em diversas espécies de peixe como Astyanax scabripinnis (Souza et al. 2001), Upsilodus sp. (provavelmente Hemipsillichthys gobio, Kavalco et al. 2004) e Hoplosternum littorale (Pazza et al. 2005). Artoni e Bertollo (1999) também consideraram a hipótese de homogeneização válida para explicar a heterocromatina equilocal observada em Hypostomus sp. E e Hypostomus sp. F, e também reportou a existência de pequenos cromossomos acrocêntricos com heterocromatina AT-rica. Nossa análise também revelou heterocromatina AT-rica telomérica em H. albopunctatus, H. regani e H. strigaticeps, reforçando ainda mais esta hipótese. Toda heterocromatina intersticial equilocal observada em Hypostomus até o momento apresentou composição AT-rica, indicando que alguma característica destas seqüências posua estar facilitando sua transposição para cromossomos não homólogos. Outro aspecto relacionado à heterocromatina ATrica observado neste grupo com 2n=72 e 2n=74 foram os segmentos intersticiais ATricos de H. strigaticeps. Nesta espécie, os segmentos AT-ricos no braço longo do par 21 não foram equilocais com outras bandas AT-ricas, sugerindo uma origem diferente, possivelmente por duplicação.

Em *H. paulinus* um par apresentou um discreto segmento AT-rico, e um par apresentou um bloco intersticial GC-rico, que variou em tamanho entre os indivíduos. Um cromossomo acrocêntrico também apresentou um bloco GC-rico que variou em tamanho entre os indivíduos, mas em posição telomérica do braço longo. Estes blocos GC-ricos podem ter origens comuns. Até o momento, os heteromorfismos de tamanho observados em blocos heterocromáticos em *Hypostomus* envolvem principalmente segmentos GC-ricos.

Hypostomus topavae, a única espécie analisada com 2n=80 cromossomos, apresentou heterocromatina centromérica/pericentromérica com um bloco conspícuo no par 2. A maior parte da heterocromatina não foi marcada diferencialmente pela CMA₃ ou DAPI, mas a região das RONs e o bloco pericentromérico no par 2 foram positivos para CMA₃, portanto GC-ricos. Artoni e Bertollo (1999) analisaram outra espécie com 2n=80 cromossomos, *Hypostomus* sp. E, que apresentou um padrão de distribuição de heterocromatina consideravelmente distinto, com diversos blocos intersticiais equilocais AT-ricos. Os autores correlacionaram o número elevado de cromossomos da espécie com a presença destas bandas, já que um número alto de cromossomos faria com que os cromossomos permanecessem mais próximos no núcleo durante a interfase e prófase, facilitando a transposição entre não-homólogos. Contudo, considerando que *H. topavae*, que apresenta o mesmo número diplóide de *Hypostomus* sp. E, não apresenta tais bandas equilocais, e espécies com números diplóides mais baixos (como *H. regani*) também apresentam bandas intersticiais equilocais, é provável que somente o número diplóide elevado não justifique a transposição e homogeneização da heterocromatina.

Os resultados apresentados indicam que embora a composição e distribuição de heterocromatina em *Hypostomus* realmente variem significativamente entre as espécies, algumas tendências podem ser observadas, como a composição AT-rica de bandas intersticiais equilocais e a predominância de heteromorfismos de tamanho em blocos GC-ricos. Além disso, é necessário aumentar o número de espécies de *Hypostomus* analisadas e desenvolver mais estudos sobre a heterocromatina neste gênero para verificar a causa das tendências observadas e se elas são mantidas em outras espécies de *Hypostomus*.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (MMA/IBAMA) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências Bibliográficas

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

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

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

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

Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC, Galleti Jr PM (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). Genet Mol Biol 22: 39-44. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Braz J Genet 1:103-120.

Bueno V, Zawadzki CH, Margarido V (2012) Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. Rev Fish Biol Fisheries 22:241-250.

Cereali SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, Froehlich O, Giuliano-Caetano L (2008) Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. Genet Mol Res 7:583-591.

Degonzo GM, Fenocchio A, Pastori C (2000) Chromosome characterization of *Trichomycterus spegazzini* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the hydrographic basins of the Northwest of Argentina. Caryologia 53:39-43.

Froese R, Pauly D (2012) FishBase. Internet References. Obtido em http://www.fishbase.org 12/03/2012

Griffiths SP (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. J Fish Biol 57:1453-1464.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004) Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). Hereditas 141:237-242.

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

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco basin (MG, Brasil). Micron 40:552-559.

Margarido VP, Galetti Jr PM (2000) Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). Genet Mol Biol 23: 569-573.

Michele JL, Takahashi CS, Ferrari I (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). Cytologia 42:539-546.

Milhomem SSR, Castro RR, Namagashi CY, Souza ACP, Feldberg E, Pieczarka JC (2010) Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). Comp Cytogen 4:45-54.

Montoya-Burgos JI (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. Mol Ecol 12:1855-1857.

Muramoto JI, Ohno S, Atkin NB (1968) On the diploid state of the fish order Ostariophysi. Chromosoma 24:59-66.

Muller S, Weber C (2002) Les dents des sous-families Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Rev* Suisse Zool 99:747-754.

Oliveira C, Gosztonyi (2000) A cytogenetic study of *Dyplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. Caryologia 53:31-37.

Pazza R, Kavalco KF, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2005) *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil – Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. Caryologia 58: 339-344.

Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. Cytogenet Cell Genet 27:190-193.

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

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

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75:304-306.

Weber C (2003) Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr., eds. Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Porto Alegre: Edipucrs, pp 351-372.

Espécie	Machos	Fêmeas	Localidade
Hypostomus albopunctatus	3	3	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR
Hypostomus ancistroides	4	11	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR
Hypostomus cochliodon	4	1	Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR
Hypostomus commersoni	1	1	Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR
Hypostomus faveolus	7	2	Rio Taquaralzinho, Barra do Garças, MT
Hypostomus hermanni	5	4	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus regani	4	2	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus regani	1	4	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR
Hypostomus aff. paulinus	6	7	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus strigaticeps	8	7	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR
Hypostomus topavae	9	6	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR

Tabela 1 Número e sexo dos indivíduos coletados em cada localidade.

m	38	2	3	8 % 4	5	6	8 K 7	8	9	а	<i>m</i> 1	2	3	1 1 1	5	6				b
sm	10	11 11	12	13							sm 11 7	8	9	¥ ā 10	5 × 11	12	13	14		
st	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	st 15	16	17	18	19	20	21	22		
	24	10	10		10	15	20	21	LL	20	a 23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
а	25	26	27	28	29	30	31	32												
m	X X	8 X 2	X N 3	₹ 4	× × 5	* * 6				c	<i>m</i> 1	2	3	≯ ∦ 4	5	6	× % 7			d
m sm	X 入民	2 8	3 3 9	4 4 10	× × 5	6 12	X X 13			c	m 1 sm 8	2 2 9	3 10	¥ 4	5	6 13	× x 7 3 & 4 14			d
m sm st	X X 1 	2 8 8 15	3 9 16	4 4 10 17	5 5 11 18	6 12 19	13			С	m 1 sm 8 st 15	2 9 16	3 10 17	4 11 11 18	5	6 13	× X 7 38 14			d
m sm st	X X 1 7 X X 14 00 21	2 8 15 22	3 9 16 23	4 10 17 24	5 11 18 25	6 12 19 26	13 20 27	A & 28	b a 29	C	m 1 sm 8 st 15 a 19	2 9 16 20	3 10 17 21	4 11 18 22	5 12 23	6 13 24	7 14 25	26	27	d 28

Figura 1 Cariótipos C-bandados de (a) *Hypostomus faveolus* (b) *Hypostomus cochliodon* (c) *Hypostomus commersoni* (d). *Hypostomus ancistroides*. A barra representa 5 µm.

m	8 h	3 Å 2	8 X 3	∦∦ 4	ж ж 5					a	m	8 B 1	2	% ∦ 3	₹¥ 4	¥≯ 5	6				b
sm	X≬ 6	<u>۲</u>	8 8	<mark>۸</mark> ۵ 9							sm	17	8	9	10						
st	10	11 A A 21	12	13	14 14	15	1 6	8 17	4 ð 18	1 9	st	11	12	1 3	14	∦ ∦ 15					
а	26 36	27	28	29	18 30	23 A A 31	32	3 3	34	4 A 35	а	16 26 36	17 27	18 28	19 29	20 30	21 31	22 32	23 33	24 34	25 35
т	R.H	K X 2	X 8 3	11X 4	88 5	6				С	m	K 8	2	3	% % 4						d
sm	1	8	8 9	1 0	11	12					sm	5) X 6	人族 7	X 8	9	1 0	#8 11			
st) 13	() 14	15	16	17	18	1 9	20	21		st	12	13	14	15	16	17	1 8	19		
а	22 32	23 33	24 34	25 35	26 36	27	28	29	30	31	а	20 30	21 31	22 32	23 33	24	25 35	26 36	27 37	28	29
m	X ∦ 1	2 X	3	X X 4	**					e	m	8 K 1	2	3	4	5	6	8 % 7			f
sm	6	K #	1 0 8	9	₫ 10	<i>А́а</i> 11					sm	8	9	10	8 J 11	12					
st	12) 13	14	15	16	17	18	19	A ð 20	21	st	13	14	15	16	17	18	1 9	20	21	22
а	22	23	24	25	4 26	27	28	A A 29	a a 30	X A 31		23	24	25	8.1	8.4	7.0				
	32	33	34	35	a A 36	37					а	26 36	27	28 38	29 39	30 40	31	32	33	34	35

Figura 2 Cariótipos C-bandados de (a) *Hypostomus hermanni* (b) *Hypostomus regani* (c) *Hypostomus strigaticeps* (d) *Hypostomus albopunctatus* (e) *Hypostomus* aff. *paulinus* (f) *Hypostomus topavae*. A barra representa 5 μm.


Figura 3 Metáfases coradas com fluorocromos (1) DAPI (2) CMA₃ e (3) CMA₃ e DAPI sobrepostos. (a) *Hypostomus faveolus* (b) *Hypostomus cochliodon* (c) *Hypostomus ancistroides* (d) *Hypostomus commersoni*. Setas indicam sítios GC-ricos, cabeças de seta indicam sítios AT-ricos e asteriscos indicam RONs. A barra representa 5 μm.



Figura 4 Metáfases coradas com fluorocromos (1) DAPI (2) CMA₃ e (3) CMA₃ e DAPI sobrepostos. (a) *Hypostomus strigaticeps* (b) *Hypostomus hermanni* (c) *Hypostomus regani* (d) *Hypostomus* aff. *paulinus*. Setas indicam sítios GC-ricos, cabeças de seta indicam sítios AT-ricos e asteriscos indicam RONs. A barra representa 5 μm.



Figura 5 Metáfases coradas com fluorocromos (1) DAPI (2) CMA₃ e (3) CMA₃ e DAPI sobrepostos. (a) *Hypostomus albopunctatus* (b) *Hypostomus topavae*. Setas indicam sítios GC-ricos, cabeças de seta indicam sítios AT-ricos e asteriscos indicam RONs. A barra representa 5 µm.

8. CAPÍTULO 4

Mapeamento físico do DNAr 5S e 18S em dez espécies de Hypostomus Lacépède

1803 (Siluriformes, Loricariidae)

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da publicação científica :

Cytogenetics and Genome Research

Normas para publicação disponíveis em: http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=JournalGuidelines&Produ ktNr=224037

Resumo

Hypostominae é uma subfamília de peixes complexa dentro da família Loricariidae, com filogenia e sistemática não resolvidas. Hypostominae contém cinco tribos: Pterygoplichthini Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, e Ancistrini. Hypostomus, um dos gêneros de Hypostomini, é um grupo diverso com aspectos não esclarecidos sobre sua biologia, inclusive os mecanismos que levaram à diversificação cromossômica no grupo. Hibridização in situ por fluorescência (FISH) com sondas de DNAr 5S e 18S rDNA foi realizada em dez espécies de Hypostomini, uma espécie de Ancistrini e uma espécies de Pterygoplichthyini. Megalancistrus parananus, Pterygoplichthys anisitsi, H. faveolus, H. cochliodon, H. albopunctatus, H. aff. paulinus e H. topavae apresentaram um par cromossômico portador de sítios de DNAr 18S, enquanto H. ancistroides, H. commersoni, H. hermanni, H. regani e H. strigaticeps apresentaram múltiplos sítios portadores de DNAr 18S. Em relação ao DNAr 5S, M. parananus, P. anisiti, H. ancistroides, H. regani, H. albopunctatus, H. aff. paulinus e H. topavae apresentaram sítios de DNAr 5S em somente um par de cromossomos, e H. faveolus, H. cochliodon, H. commersoni, H. hermanni e H. strigaticeps apresentaram sítios múltiplos. A maior parte das espécies apresentou sítios de DNAr na região telomérica dos cromossomos. Todas as espécies menos H. cochliodon apresentaram sítios de DNAr 5S na região centromérica/pericentromérica de um par metacêntrico. Mecanismos de dispersão são discutidos para justificar a variabilidade dos sítios de DNAr em Hypostomus.

Palavras-chave: FISH DNAr, evolução cromossômica, Hypostomini, Ancistrini, Pterygoplichthyini

Abstract

Hypostominae is a complex fish subfamily within the family Loricariidae, with unresolved phylogeny and systematics. It comprises five tribes: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini and Ancistrini. Hypostomus, one of the genus from Hypostomini, is a diverse group with unclear aspects regarding its biology, including the mechanisms that led to chromosome diversification within the group. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with 5S and 18S rDNA probes was performed on ten Hypostomini, one Ancistrini and one Pterygoplichthyini species. Megalancistrus parananus, Pterygoplichthys anisitsi, Hypostomus faveolus, Hypostomus cochliodon, Hypostomus albopunctatus, Hypostomus aff. paulinus and Hypostomus topavae had only one chromosome pair with 18S rDNA sites, while Hypostomus ancistroides, Hypostomus commersoni, Hypostomus hermanni, Hypostomus regani and Hypostomus strigaticeps had multiple 18S rDNA sites. As for the 5S rDNA, M. parananus, P. anisiti, H. ancistroides, H. regani, H. albopunctatus, H. aff. paulinus e H. topavae had 5S rDNA sites only on one chromosome pair, and H. faveolus, H. cochliodon, H. commersoni, H. hermanni and H. strigaticeps had multiple 5S rDNA sites. Most species had 18S rDNA sites on the telomeric region of the chromosomes. All species but H. cochlidon had 5S rDNA on the centromeric/pericentromeric region of one metacentric pair. Mechanisms of dispersion are discussed to justify the variability of the rDNA sites in *Hypostomus*.

Keywords: rDNA-FISH, chromosome evolution, Hypostomini, Ancistrini, Pterygoplichthyini

Introdução

Loricariidae é uma família especiosa e diversa, distribuída pela América Central e do Sul (Armbruster, 2004; Ferraris, 2007). É composta por sete subfamílias: Hypoptomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Delturinae. Loricariinae, Neoplecostominae e Otothyrinae (Weber, 2003; Armbruster, 2004; Reis et al., 2006; Chiachio et al., 2008). Os Hypostominae contêm um grande número de espécies nominais com status incerto, e a sistemática da subfamília não é bem resolvida (Weber, 2003). Armbruster (2004) propôs a divisão da subfamília em cinco tribos, Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. O único gênero reconhecido para Hypostomini seria Hypostomus, com Aphanotorulus, Cochliodon, Isorineloricaria, Squaliforma e Watwata como sinônimos. Porém, estudos moleculares baseados em sequências do gene do RNAr mitocondrial, D-loop e ITS indicaram a existência de diferenças relevantes entre Squaliforma, Isorineloricaria, Aphanotorulus e Hypostomus, não concordando com a sinonimização destes gêneros com Hypostomus (Montoya-Burgos et al., 1998; Montoya-Burgos, 2003). Análises posteriores não foram realizadas em Hypostomini para verificar quais gêneros devem ser reconhecidos, e parece não haver consenso sobre qual filogenia deve ser adotada para Hypostomus, com um número de estudos posteriores sobre outros aspectos do gênero considerando cada hipótese como válida.

Estudos cariotípicos em *Hypostomus* iniciaram com a análise de *Hypostomus plecostomus* (Muramoto et al., 1968). O número diplóide observado, 2n=54 cromossomos, continua sendo o número diplóide mais baixo observado para o gênero. Estudos posteriores apresentaram números diplóides variando de 2n=54 a 2n=84 cromossomos (Muramoto et al., 1968; Cereali et al., 2008). Embora o número de espécies citogeneticamente analisadas tenha aumentado, ainda não representa uma porção significativa do gênero (Bueno et al., 2011), e poucos estudos discutem marcadores como a distribuição de heterocromatina e mapeamento de DNAr.

Somente duas espécies de *Hypostomus* tiveram seus sítios de DNAr mapeados. Kavalco et al. (2004; 2005) localizou os sítios de DNAr 5S e 18S em múltiplos cromossomos em *H. affinis*, e Mendes-Neto et al. (2011) observou um único par com sítios de DNAr 18S e múltiplos cromossomos com sítios de DNAr 5S em *H. regani*. A falta de informação sobre o número e localização dos sítios de DNAr em *Hypostomus* dificulta uma análise comparativa ampla para o gênero. Como o relacionamento entre as espécies de *Hypostomus* ainda não estão bem esclarecidos, o presente estudo tem por objetivo mapear o DNAr 5S e 18S de dez espécies de *Hypostomus* e duas espécies de outras tribos de Hypostominae para verificar a existência de possíveis tendências evolutivas no gênero.

Material e Métodos

Dez espécies de Hypostomini, uma espécie de Pterygoplichthini e uma espécie de Ancistrini tiveram a localização dos sítios de DNAr 5S e 18S mapeadas. Os espécimes foram coletados nas bacias dos rios Piquiri, Iguaçu e Araguaia. Os locais de coleta e número de machos e fêmeas são mostrados na Tabela 1. Os espécimes foram anestesiados e sacrificados através da overdose por óleo de cravo (Griffiths, 2000). Células metafásicas foram obtidas do rim através da técnica proposta por Bertollo et al., (1978). A hibridização *in situ* por fluorescência foi realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986), com modificações sugeridas por Margarido e Moreira-Filho (2008). As sondas de DNAr 18S foram obtidas de acordo com Hatanaka e Galetti (2004) e as sondas de DNAr 5S foram obtidas de acordo com Martins e Galetti (1999). As sondas foram marcadas através de *nick translation*, com biotina-16-dUTP (DNAr 18S) e digoxigenina-11-dUTP (DNAr 5S) (Roche). A detecção e amplificação dos sinais de hibridação foram realizadas com avidina-FITC e anti-avidina biotina (Sigma) para as sondas de DNAr 18S, e anti-digoxigenina rodamina (Roche) para as sondas de DNAr 5S. As laminas foram contra-coradas com DAPI e analisadas no microscópio de epifluorescência Olympus BX 61. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964).

Resultados

Na maior parte de espécies de Hypostomini analisadas, o DNAr 18S estava localizado na região telomérica dos cromossomos. A localização do DNAr 5S e número de sítios tanto do DNAr 5S quanto 18S variou consideravelmente entre as espécies. *Hypostomus faveolus, H. cochliodon, H. albopunctatus, H.* aff. *paulinus* e *H. topavae* apresentaram somente um par portador de sítios de DNAr 18S, enquanto *H. ancistroides, H. commersoni, H. hermanni, H. regani* e *H. strigaticeps* apresentaram múltiplos sítios. Em relação ao DNAr 5S, *H. ancistroides, H. regani, H. albopunctatus, H.* aff. *paulinus* e *H. topavae* apresentaram sítios de DNAr 5S em somente um par de cromossomos, e *H. faveolus, H. cochliodon, H. commersoni, H. hermanni* e *H. strigaticeps* apresentaram múltiplos sítios.

Hypostomus faveolus (2n=64; 18 m + 8 sm + 22 st + 16 a) apresentou sítios de DNAr 18S localizados na região telomérica do braço curto do par 31 e DNAr 5S na região pericentromérica do braço curto do par 1 e 15, e na região telomérica do braço curto dos pares 22, 24 e 26 (fig. 1a).

Hypostomus cochliodon (2n=64; 12 m + 16 sm + 16 st + 20 a) apresentou sítios de DNAr 18S localizados na região telomérica do braço longo do par 28, e múltiplos sítios de DNAr 5S, localizados na região telomérica do braço curto dos 13, 21 e 29 (fig. 1b).

O número e posição dos sítios de DNAr 5S e 18S variaram entre as populações de *H. commersoni* (2n=68; 12 m + 14 sm + 14 st + 28 a). A população do rio Piquiri apresentou sítios de DNAr 18S na região telomérica do braço curto de um cromossomo do par 21, um cromossomo do par 23 e um cromossomo do par 31, e na região telomérica do braço longo de um cromossomo do par 31 (fig. 1c). A população do rio Iguaçu apresentou sítios de DNAr 18S na região terminal do braço curto do braço curto do par 23, do braço longo do par 31 e no braço curto do par 17, localizado na região telomérica de um cromossomo e intersticial do outro (fig. 1d). Os sítios de DNAr 5S estavam localizados na região pericentromérica do braço curto do par 23 e um cromossomo dos pares 21 e 19 na população do rio Piquiri. A população do rio Iguaçu apresentou DNAr 5S na região pericentromérica do braço curto do braço curto do par 23 (fig. 1c). Os sítios de DNAr 5S e 18S foram sintênicos nos pares 21 e 23 da população do Piquiri, e nos pares 17 e 23 na população do rio Iguaçu (fig. 1d).

Hypostomus ancistroides (2n=68; 14 m + 14 sm + 8 st + 32 a) apresentou sítios de DNAr 18S na região telomérica do braço curto dos pares 19 e 20 e DNAr 5S na região pericentromérica do braço curto do par 5. Um indivíduo apresentou sítios somente em um cromossomo do par 19 e um sítio adicional em um cromossomo do par 24 (fig. 2a).

Hypostomus hermanni (2n=72; 10 m + 8 sm + 32 st + 22 a) apresentou múltiplos cromossomos portadores de sítios de DNAr 18S, localizados no braço curto dos pares

27, 29 e 33. Os sítios de DNAr 5S foram localizados na região pericentromérica do braço curto dos pares 3 e 16, na região telomérica do braço curto dos pares 23, 35, 36 e em um cromossomo dos pares 26 e 32 (fig. 2b).

Hypostomus regani (2n=72; 12 m + 8 sm + 10 st + 42 a) apresentou sítios de DNAr 18S localizados na região telomérica do braço curto dos pares 32, 35 e um cromossomo do par 20 Sítios de DNAr 5S foram localizados na região pericentromérica do braço curto do par 4 (fig. 2c).

Hypostomus strigaticeps (2n=72; 12 m + 12 sm + 18 st + 30 a) apresentou sítios de DNAr 18S na região telomérica do braço longo dos pares 25, 32 e 36, e DNAr 5S na região pericentromérica do braço curto do par 21 e um cromossomo do par 26 (fig. 2d).

Hypostomus albopunctatus (2n=74; 8 m + 14 sm + 16 st + 36 a) apresentou DNAr 18S localizado no par 35. A posição dos sítios variou entre a região telomérica do braço curto, a posição telomérica do braço longo ou bitelomérica. O DNAr 5S foi localizado na região pericentromérica do braço curto do par 1 (fig. 3a).

Hypostomus aff. *paulinus* (2n=74; 10 m + 12 sm + 20 st + 32 a) apresentou DNAr 18S localizado na região telomérica do braço longo do par 35 e DNAr 5S localizado na região pericentromérica do braço curto do par 2 (fig. 3b).

Hypostomus topavae (2n=80; 14 m + 10 sm + 26 st + 30 a) apresentou DNAr 18S localizado na região telomérica do braço curto do par 26 e DNAr 5S localizado na região pericentromérica do braço curto do par 2 (fig. 3c).

Pteygoplichthys anisitsi e *Megalancistrus parananus* apresentaram somente um par portador de sítios de DNAr 5S e 18S. *Pterygoplichthys anisitsi* apresentou sítios de DNAr intersticialmente no braço longo de um cromossomo submetacêntrico, com o DNAr 5S localizado intersticialmente no braço curto do mesmo par. *Megalancistrus parananus* apresentou um grande sítio intersticial no braço curto de um cromossomo subtelocêntrico, e DNAr 5S na região pericentromérica do braço curto de um par submetacêntrico (fig. 4).

Discussão

Um único par portador de sítios de DNAr 5S e 18S tem sido considerado plesiomórfico para Loricariidae, característica observada no grupo irmão Trichomycteridae e em alguns gêneros (Neoplecostomus, Kronichthys, Isbueckerichthys e Parotocinclus) considerados filogeneticamente basais através de análise morfológica (Armbruster, 2004; Ziemniczak et al., 2011). A análise de P. anisitsi e M. parananus também revelou um único par portador de sítios de DNAr 5S e 18S. Artoni e Bertollo (1996) também consideram RONs simples como o fenótipo ancestral para Loricariidae. Estas características observadas no grupo-irmão e gêneros basais para Loricariidae, e também em outras tribos de Hypostominae (P. anisitsi pertence a Pterygoplichthini e M. parananus pertence a Ancistrini) reforça a suposição de que a presença de sítios de DNAr 5S e 18S em um par de cromossomos seja basal para Hypostomus.

Hypostomus faveolus e *H. cochliodon* são as espécies com os menores números diplóides de *Hypostomus* que tiveram seus sítios de DNAr 5S e 18S mapeados. Ambas as espécies apresentaram um único par portador de DNAr 18S, embora em posições diferentes do cromossomo, e múltiplos pares portando DNAr 5S. Considerando o número diplóide de 54 cromossomos basal para a família Loricariidae, números diplóides mais baixos seriam basais para *Hypostomus* (Artoni e Bertollo, 2001). Uma análise filogenética realizada por Martinez (2009) com sequências do gene mitocondrial citocromo b e sequências parciais dos genes nucleares de RNAr 16S e F-Reticulon 4 considerou *H. faveolus* como irmão de todas as outras espécies de *Hypostomus*. O status

de *H. faveolus* como espécie basal de *Hypostomus* é compatível com os resultados obtidos para o número de sítios de DNAr 18S, já que esta espécie apresentou somente um par portador de DNAr 18S, corroborando a hipótese de que a presença de um par portador de DNAr 18S seja basal para *Hypostomus*. Não é possível determinar se múltiplos pares portadores de DNAr 5S representam uma condição ancestral para o gênero ou uma apomorfia para as espécies analisadas.

Todas as espécies com 2n=68 e 2n=72 cromossomos (H. ancistroides, H. commersoni, H. hermanni, H. regani e H. strigaticeps) apresentaram múltiplos pares portando sítios de DNAr 18S. A maior parte das espécies também apresentou múltiplos pares portando DNAr 5S, com somente H. ancistroides e H. regani apresentando DNAr 5S em somente um par de cromossomos. Houve variação na localização de alguns sítios entre as populações de *H. commersoni* analisadas. Existe também a descrição de uma população de H. regani do rio Piumhi com múltiplos pares portadores de DNAr 5S e um único par com sítios de DNAr 18S (Mendes-Neto et al., 2011), diferente do observado nas populações do rio Piquiri que apresentaram múltiplos pares portadores de DNAr 18S e um único par portador de DNAr 5S. Embora este grupo inclua espécies com números diplóides e números de sítios de DNAr semelhantes, em análises filogenéticas estas espécies são separadas em diferentes clados (Montoya-Burgos, 2003; Armbruster, 2004; Martinez, 2009). A variação no número de sítios de DNAr, mesmo entre populações da mesma espécie, e a existência de filogenias que separam espécies com números e localização de sítios de DNAr semelhantes indicam que esta característica pode não ser útil para estabelecer relações dentro de Hypostomus, porém pode ter potencial como marcador populacional.

As espécies com 2n=74 e 2n=80 cromossomos (*H. albopunctatus*, *H.* aff. *paulinus* e *H. topavae*) apresentaram um par de cromossomos portando sítios de DNAr

5S e 18S. Contudo, existem relatos de algumas espécies com estes números diplóides portando RONs múltiplas, portanto múltiplos sítios de DNAr 18S, como *H*. aff. *agna* (2n=74, Martinez et al., 2011), *H. nigromaculatus* (2n=76, Rubert et al., 2008) e *Hypostomus* sp. E (2n=80, Artoni e Bertollo, 1999), provando a existência de variação no número e localização do DNAr também neste grupo de espécies. Sendo assim, todo o grupo de espécies com 2n=68 a 2n=84 seria muito heterogêneo em relação ao número e localização do DNAr, um indício de que este caráter sofreu modificações recorrentes durante a diversificação cromossômica do gênero.

Uma característica interessante do DNAr 5S observada na maior parte das espécies analisadas no presente trabalho, além de *H. affinis* (Kavalco et al., 2004; 2005) e *H. regani* coletado no rio Piumhi (Mendes-Neto et al., 2011), é a presença de um sítio centromérico/pericentromérico de DNAr 5S no braço curto de um par metacêntrico/submetacêntrico. Todas as espécies de *Hypostomus* analisadas até o momento, menos *H. cochliodon*, apresentam sítios de DNAr 5S nesta localização particular. Possivelmente, a localização deste sítio favoreceu sua permanência do cariótipo da maior parte das espécies, enquanto os sítios teloméricos parecem variar mais facilmente.

A variação observada nos sítios de DNAr sugere a existência de mecanismos de dispersão destas sequências. É conhecido que alguns retrotransposons são específicos para sequências de DNAr, e que estes sítios são favoráveis à invasão por elementos móveis (Xiong et al., 1988; Kojima e Fujiwara 2003; Kojima e Fujiwara, 2004). Muitos tipo de elementos transponíveis foram descritos para peixes (Volff, 2005). Silva *et al.* (2011) verificaram um número elevado de sítios de DNAr 5S em *Gymnotus paraguensis*, associando a multiplicação dos *clusters* com a similaridade entre os NTS e um elemento móvel chamado transposon Tc1-like nesta espécie. O sequenciamento

destas regiões revelou uma alta similaridade entre os espaçadores não transcritos (NTS) e um elemento móvel chamado transposon *Tc1-like*. O aumento no número de sítios de DNAr 5S poderia estar associado à dispersão destas sequências adjacentes, sendo que algumas cópias podem consistir em pseudogenes de DNAr. Mecanismos similares podem ser responsáveis pela variação no número e posição dos sítios de DNAr 18S observado em *Hypostomus*. A presença de heterocromatina adjacente a estes sítios também pode facilitar trocas entre não homólogos, causando a dispersão destas sequências no genoma.

A análise aqui apresentada ainda inclui um número relativamente baixo de espécies considerando a diversidade do gênero. Contudo, foi observada significativa variabilidade nos sítios de DNAr, reforçando a hipótese proposta por Artoni e Bertollo (1999) de que *Hypostomus* possui evolução cromossômica divergente. Estudos posteriores incluindo um número maior de espécies e análises do DNAr e seqüências adjacentes contribuiriam com o esclarecimento dos mecanismos de dispersão destes sítios em *Hypostomus*.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (MMA/IBAMA) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências bibliográficas

Armbruster JW: Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. Zool J Linn Soc 141:1-80 (2004).

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

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

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

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

Bueno V, Zawadzki CH, Margarido V: Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. Rev Fish Biol Fisheries 22:242-250 (2012).

110

Cereali SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, Froehlich O, Giuliano-Caetano L: Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. Genet Mol Res 7:583-591 (2008).

Chiachio MC, Oliveira C, Montoya-Burgos JI: Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). Mol Phylogenet Evol 49:606-617 (2008).

Ferraris CJ: Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418:1-628 (2007).

Griffiths SP: The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. J Fish Biol 57:1453-1464 (2000).

Hatanaka T, Galetti Jr. PM: Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 122: 239-244 (2004)

Kavalco KF, Pazza R. Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. Cytogenet Genome Res 106:107-110 (2004).

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Heredity 94:180-186 (2005).

Kojima KK, Fujiwara H: Evolution of target specificity in R1 clade non-LTR retrotransposons. Mol Biol Evol 20:351-361 (2003).

Kojuma KK, Fujiwara H: Cross-genome screening of novel sequence-specific non-LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets. Mol Biol Ecol 21:207-217 (2004).

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

Margarido VP, Moreira-Filho O: Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostaariophysi, Heptapteridae). Genet Mol Biol 31:235-238 (2008).

Martinez ERM, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C:. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). Genet Mol Biol 34:562-568 (2011).

Martinez ERM: Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em carcteres cromossômicos e seqüências de DNA. D. thesis, Universidade Estadual Paulista (2009).

Martins C, Galetti Jr. PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Res 7:363-367 (1999).

Mendes-Neto EO, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O: Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. Comp Cytogenet 5:133-142 (2011).

Montoya-Burgos JI, Muller S, Weber C, Pawlowski J: Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, eds. Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 363-374 (1998).

Montoya-Burgos JI: Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. Mol Ecol 12:1855-1857 (2003).

Muramoto JI, Ohno S, Atkin NB: On the diploid state of the fish order Ostariophysi. Chromosoma 24:59-66 (1968).

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci 83:2934-2938 (1986).

Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW: Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. Zool J Linn Soc 147:277-299 (2006).

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

Silva M, Matoso DA, Vicari MR, Almeida MC, Margarido VP, Artoni RF: Physical Mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). Cytogenet Genome Res 134:303-307 (2011).

Volff JN: Genome evolution and biodiversity in teleost fish. Heredity 94:280-294 (2005).

Weber C: Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr., eds. Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Porto Alegre: Edipucrs, 351-372 (2003).

Xiong Y, Burke WD, Jakubczak JL, Eickbush TH: Ribossomal DNA insertion elements R1Bm and R2Bm can transpose in a sequence specific manner to locations outside the 28S genes. Nucl Acids Res 16:10561-10573 (1988).

Ziemniczak K: Estudo citogenético em espécies de Loricariidae (Pisces, Siluriformes) das nascentes dos rios Ribeira e Tibagi, Ponta Prossa – PR. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná (2011).

Espécie	Machos	Fêmeas	Localidade						
Hypostomini									
Hypostomus albopunctatus	3	3	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR						
Hypostomus ancistroides	4	11	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR						
Hypostomus cochliodon	4	1	Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR						
Hypostomus commersoni	0	1	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						
Hypostomus commersoni	1	1	Rio Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR						
Hypostomus faveolus	7	2	Rio Taquaralzinho, Barra do Garças, MT						
Hypostomus hermanni	5	4	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						
Hypostomus regani	4	2	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						
Hypostomus regani	1	4	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR						
Hypostomus aff. paulinus	6	7	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						
Hypostomus strigaticeps	8	7	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						
Hypostomus topavae	9	6	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						
Pterygoplichthini									
Pterygoplichtys anisitsi	0	1	Rio Paraná, Guaíra, PR						
Ancistrini									
Megalancistrus parananus	2	0	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR						

Tabela 1 Número e sexo dos indivíduos de diferentes espécies de Hypostominae e locais de coleta.

	**		-							a			-	_						b
m	1	2	3	4	5	6	7	8	9		<i>m</i> 1	2	3	4	5	6				
sm	10	6 1	12	13							sm 7	8	9	10	11	12	13	14		
st	14	/ 1 5	16	17	18	1 9	20	21	22	23	<i>st</i> 15	16	17	18	19	20	21	22		
а	24	A.8	2.6	0~	0.0	A 0	2				a 23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
	25	26	27	28	29	30	31	32												4
										C										d
m	1	2	3	4	5	6					<i>m</i> 1	2	3	4	5	6				
sm) č 7	8	8 9	10	8 k 11	12	13				sm	8	9	10	11	12	13			
st	14	15	16	1 7	18	19	20				st 14	15	16	17	18	19	20			
8	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	a 21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	31	32	33	34							31	32	33	34						

Figura 1 Cariótipos hibridizados com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) de (a) *Hypostomus faveolus*; (b) *Hypostomus cochliodon*; (c) *Hypostomus commersoni* do rio Piquiri e (d) *Hypostomus commersoni* do rio Iguaçu. A barra representa 5µm.



Figura 2 Cariótipos hibridizados com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) de (a) *Hypostomus ancistroides*; (b) *Hypostomus hermanni*; (c) *Hypostomus regani*; (d) *Hypostomus strigaticeps*. A barra representa 5µm.



Figura 3 Cariótipos hibridizados com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) de (a) *Hypostomus albopunctatus*, com a variação na posição dos sítios de DNAr 18S em destaque; (b) *Hypostomus* aff. *paulinus* e (c) *Hypostomus topavae*. A barra representa 5µm.



Figura 4 Metáfases hibridizadas com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) de (a) *Megalancistrus parananus* e (b) *Pterygoplichthys anisitsi*. A barra representa 5µm.

•

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

♦ O número diplóide das espécies analisadas variou de 2n=64 a 2n=80 cromossomos, mantendo-se no intervalo já observado para o gênero.

Foi verificado que o aumento do número diplóide não implica em uma proporção maior de cromossomos dos tipos subtelocêntricos e acrocêntricos na maior parte das espécies, sendo que esta proporção foi variável entre espécies com o mesmo número diplóide.

• Espécies com número diplóide de 80 cromossomos ou mais representam o único grupo que manteve uma proporção de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos mais elevada (70% ou mais) para todas as espécies com estes números diplóides, porém algumas espécies com números diplóides menores também apresentaram proporções semelhantes.

• A variação nos números diplóides em *Hypostomus* pôde ser correlacionada com hipóteses filogenéticas e biogeográficas, fortalecendo a importância dos eventos geológicos que afetaram a estrutura das bacias hidrográficas como fonte de diversificação de espécies.

♦ As espécies com números diplóides mais baixos (2n=64 cromossomos) estão correlacionadas com bacias do norte, representando o provável grupo mais ancestral de *Hypostomus* além do grupo *H. cochliodon*.

As espécies das bacias do sul dividem-se em dois clados principais, um dos quais contém espécies de 2n=66 e 2n=68 cromossomos, como *H. affinis*, *H. ancistroides* e *H. commersoni*.

O outro grupo de espécies das bacias do sul contém espécies com 2n=70 a
2n=84 cromossomos.

♦ As AgRONs variaram consideravelmente em número e posição (braço curto/braço longo) entre as espécies, porém foram observadas principalmente na região terminal dos cromossomos, não apresentando tendências claras nas espécies com 2n=68 ou mais cromossomos. Espécies com 2n=64 cromossomos apresentaram RONs simples.

◆ Espécies com número diplóide de até 68 cromossomos apresentaram principalmente heterocromatina GC-rica. Espécies com números diplóides foram heterogêneas em distribuição e composição de heterocromatina.

 Polimorfismos de tamanho de blocos heterocromáticos foram relacionados à heterocromatina GC-rica, e bandas intersticiais equilocais a heterocromatina AT-rica.

• A presença de DNAr 5S e 18S em um par de cromossomos foi observada nas espécies analisadas das tribos Pterygoplichthini e Ancistrini, e provavelmente representa a característica ancestral para Hypostominae.

♦ Espécies com 2n=64 cromossomos apresentaram DNAr 5S em múltiplos pares e DNAr 18S em apenas um par de cromossomos. Não é possível determinar se múltiplos sítios de DNAr 5S representam uma característica presente em um ancestral comum de *Hypostomus*, ou uma apomorfia das espécies estudadas.

• Espécies com números diplóides maiores foram heterogêneas em relação ao número de sítios de DNAr, que variavam mesmo entre populações da mesma espécie, indicando a existência de mecanismos de dispersão destas seqüências, como elementos móveis associados.

• Os resultados obtidos mostraram a existência de marcadores que permitem a caracterização de subgrupos dentro de *Hypostomus*, que podem ainda ser correlacionados com propostas filogenéticas e biogeográficas, auxiliando na compreensão do gênero.