

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARCIA CRISTINA DE SOUZA LARA-KAMEI

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Hypostoumus LACÉPÈDE, 1803 (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)
DE AFLUENTES DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ – PR, BRASIL:
UMA CONTRIBUIÇÃO NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE
CARIOTÍPICA DO GÊNERO.

Maringá

Fevereiro - 2015

MARCIA CRISTINA DE SOUZA LARA-KAMEI

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *HYPOSTOMUS* LACÉPÈDE, 1803 (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) DE AFLUENTES DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ – PR, BRASIL: UMA CONTRIBUIÇÃO A DIVERSIDADE CARIOTÍPICA DO GÊNERO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, sob a orientação da Profa. Dra. Isabel Cristina Martins Santos e co-orientação da Profa. Dra. Ana Luiza de Brito Portela-Castro

Maringá

Fevereiro - 2015

BIOGRAFIA

Marcia Cristina de Souza Lara-Kamei nasceu em Terra Boa-PR em 11/06/1972. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (1995) e Mestrado em Biologia Celular pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá (1998). Professora do Centro Universitário de Maringá (Unicesumar) desde junho de 1998, ministrando aulas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia para cursos do centro de Ciências da Saúde na referida instituição.

....As minha filhas Isabella, Maria Luisa, Beatriz e Helena (por ordem de chegada a minha vida) e ao meu esposo Newton, por serem compreensivos com minha ausência e contribuírem nesta jornada

***...e ainda que tivesse o dom da profecia, e
conhecesse todos os mistérios e toda a
ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de
maneira que transportasse os montes, e não
tivesse amor, nada seria...***

Coríntios 13:2

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre prover tudo que preciso e bem mais que mereço...

As minhas filhas: Isabella, Maria Luisa, Beatriz e Helena, que sempre serão a razão de tudo em minha vida. Obrigada por toda a ajuda e toda a paciência nestes meses de stress. Isa e Lu, obrigada pela ajuda com os abstracts.

A meu esposo Newton, pelo incentivo para que retornasse ao doutorado e por compreender minha ausência familiar, muito obrigada.

A minha mãe Creuza, sempre um exemplo de força, determinação e dedicação a família.

Aos meus sogros Mikihiko Kamei (*in memorian*) e Kimiko Kamei, sempre grandes incentivadores em minha vida.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Isabel Cristina Martins dos Santos por me aceitar em seu laboratório, pelo incentivo, pelos conhecimentos transmitidos.

À Coorientadora, Profa. Dra. Ana Luisa de Brito Portela Castro, pela excelente coorientação e pela preocupação com minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cláudio Zawadski da Universidade Estadual de Maringá, pelas coletas, identificação dos espécimes e contribuições fundamentais na realização dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vicari, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela hospitalidade, pelo auxílio com a realização de Double Fish.

A Prof. Dra. Patricia Belini Nishiyama da Universidade Federal da Bahia, uma grande amiga, mesmo tão distante. Sua ajuda científica foi valiosa, mas seu incentivo pessoal foi fundamental. Sem você tudo seria mais difícil. Deus conserve em você toda a mansidão e sabedoria.

A Prof. Dra. Fernanda Errero-Porto da Universidade Estadual de Maringá, amiga de doutorado. Obrigada pela ajuda nas coletas, com as técnicas de FISH, pelas sugestões nos trabalhos e por sua amizade.

A Suzana de Paiva, por sua ajuda nas coletas e por suas sugestões na condução dos trabalhos.

Ao amigo Lucas Baumgärtner, o mais competente aluno de pós-graduação que tive o prazer de conviver. Obrigada pela ajuda com o photoshop, com o inglês e pelas constantes discussões sobre citogenética de *Hypostomus*.....você me socorreu tantas vezes....um grande amigo.... Muito obrigada.

A grande amiga Mazé, pessoa iluminada. Sua presença no laboratório acalenta nossos corações nas horas de sufoco. Sempre organizando os materiais necessários. Obrigada pelas palavras de apoio durante esta longa jornada.

Ao técnico Leonardo pela realização das coletas, pela ajuda com os reagentes, pelas risadas e pelas boas músicas ouvidas no laboratório.

.A grande turma do Laboratório: Ana Camila, Andréa, Greicy, Leandro, Ligia, Layon.....foi muito bom conviver com vocês.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Estadual de Maringá por possibilitar a realização desta tese

Ao Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), por disponibilizar condições para que eu pudesse realizar o doutorado.

Ao CNPq pela ajuda financeira para realização da pesquisa.

Sumário

Apresentação.....	2
Resumo geral.....	3
General abstract.....	6
Capítulo I.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Introdução.....	14
Materiais e métodos.....	17
Resultados.....	19
Discussão.....	24
Referências.....	31
CAPÍTULO II.....	38
Resumo.....	39
Abstract.....	41
Introdução.....	43
Materiais e métodos.....	46
Resultados.....	48
Discussão.....	53
Referências.....	59

APRESENTAÇÃO

Essa tese é composta de dois artigos científicos, que foram elaborados através de estudos citogenéticos em espécies de *Hypostomus*, e abordam os resultados obtidos para *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae*, e *Hypostomus* aff. *hermanni* coletados no rio Keller (bacia do Rio Ivaí), com uma análise da diversidade cariotípica no gênero *Hypostomus* e para três populações de *Hypostomus paulinus* em dois afluentes da bacia do rio Ivaí – rio Keller e rio Mourão e um afluente da bacia do rio Pirapó - ribeirão Atlântico, com uma análise comparativa da diversidade cariotípica microestrutural destas populações.

Capítulo I – Caracterização Citogenética de três espécies de *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes - Loricariidae) do rio Keller - bacia do rio Ivaí – Paraná: uma contribuição a variabilidade cariotípica do gênero

Este trabalho será submetido ao periódico ZebraFish e está formatado nas normas deste periódico.

Capítulo II – Citogenética comparativa de populações de *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Siluriformes: Loricariidae): uma contribuição citotaxonômica para a espécie.

Este trabalho será submetido ao periódico Reviews in Fish Biology and Fisheries e está formatado nas normas deste periódico

RESUMO GERAL

O gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803, é composto por peixes de pequeno a grande porte, conhecidos popularmente como cascudos. Devido à grande similaridade morfológica entre as espécies de *Hypostomus*, há uma dificuldade na definição do *status* taxonômico destas e as análises citogenéticas têm contribuído de forma significativa como ferramenta citotaxonômica para o grupo. *Hypostomus* caracteriza-se pela grande variação no número diploide (54 a 84 cromossomos) apresentando diversas fórmulas cariotípicas, indicando uma evolução divergente. Portanto, este estudo teve como objetivo analisar citogeneticamente diferentes espécies de *Hypostomus* coletados em rios afluentes da bacia do alto rio Paraná, PR, para obter informações citogenéticas que contribuam com a taxonomia deste grupo, bem como acrescentar dados para inferências sobre a sua evolução cariotípica. No rio Keller (afluente da bacia do Rio Ivaí, PR) foram analisadas – *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae* e *Hypostomus* aff. *hermanni*. Além dessas, três populações de *Hypostomus paulinus* coletadas nos rios Keller e Mourão (afluentes do rio Ivaí) e ribeirão Atlântico (afluente do rio Pirapó, PR). As espécies foram submetidas às análises por coloração com Giemsa, impregnação por nitrato de prata, bandeamento C e Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNA ribossômico (rDNA) 18S e 5S. *H. ancistroides* apresentou $2n=68$ cromossomos e fórmula $16m+12sm+22st+18a$, $NF=118$ para machos e $16m+13sm+22st+17a$, com $NF=119$ para fêmeas, caracterizando um sistema cromossômico de determinação do sexo do tipo ZZ/ZW. Esta espécie apresentou um sistema de Região Organizadora de Nucléolo (NORs) múltiplas (3 pares cromossômicos) detectado pelo nitrato de prata (Ag-NOR) e sonda de rDNA 18S. A heterocromatina foi evidenciada em região pericentromérica da maioria dos cromossomos e nas regiões de NORs. Foram observados blocos em ambas as terminações no par 14 e bloco terminal no braço longo do par 31. FISH com sonda de DNAr 5S revelou sítios múltiplos (2 pares cromossômicos) localizados nas posições intersticiais e terminais. *Hypostomus* cf. *topavae* mostrou $2n=80$ cromossomos sendo $14m+30sm+18st+18a$ e $NF=142$, em ambos os sexos. Esta espécie apresentou NORs múltiplas (3 pares cromossômicos) detectadas por impregnação por prata e sonda rDNA18S. A heterocromatina foi evidenciada em regiões pericentroméricas de vários cromossomos, nas regiões de NORs e blocos terminais nos braços curtos dos pares 7, e 15 e no braço longo do par 18. FISH com sonda de DNAr 5S revelou sítios múltiplos (2

pares cromossômicos) localizados em posições intersticiais e terminais. Para *Hypostomus* aff. *hermanni* foi observado $2n=72$ com $12m+22sm+18st+20a$ e $NF=124$, em ambos os sexos. Esta espécie apresentou também um sistema de NORs múltiplas (Ag-NORs e FISH 18S) envolvendo 3 pares de cromossomos. A heterocromatina foi evidenciada na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, nos pares Ag-NORs, além de blocos grandes nos braços curtos dos pares 1 e 4 e uma marcação terminal no braço longo do par 23. FISH com sonda de DNAr 5S revelou uma marcação intersticial em apenas um par de cromossomos metacêntricos. Números diploides elevados, NORs múltiplas e extensos blocos de heterocromatina em alguns cromossomos corroboram a hipótese de cariótipos derivados dentro de Loricariidae. Além disso, as fórmulas cariotípicas descritas para *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae* e *Hypostomus* aff. *hermanni*, diferem das outras populações disponíveis em literatura, principalmente pelo fato inédito de um sistema cromossômico sexual ZZ/ZW para *H. ancistroides*. Os indivíduos de *H. paulinus* das três populações analisadas apresentaram $2n=76$ cromossomos e fórmula cariotípica de $10m+14sm+24st+28a$, $NF=124$ em ambos os sexos. Entretanto, os cariótipos das populações diferem quanto ao número de cromossomos nucleolares (Ag-NORs), localizações de sítios rDNA 5S e na distribuição de heterocromatina constitutiva. As populações dos rios Keller e Mourão apresentaram os mesmos pares de cromossomos nucleolares, 9, 20 e 28, enquanto que a população do ribeirão Atlântico apresentou apenas um par de cromossomos (par 9), cujas marcações por impregnação pela prata foram confirmadas pelo FISH18S. A distribuição de heterocromatina constitutiva foi evidenciada nas regiões pericentromérica e terminal na maioria dos cromossomos da população do rio Keller e em menor quantidade nas populações do rio Mourão e ribeirão Atlântico e ainda, coincidente com os pares Ag-NORs nas três populações. Entretanto cada população destacou-se pela distinção de blocos heterocromáticos. Na população do rio Keller destacam-se os pares 1, 12, 16, 23 com marcações em toda extensão do braço curto e do braço longo do par 25 (maior acrocêntrico) e ainda marcação em ambas terminações do par 22 com braço curto heteromarcado; e o par 35 com blocos teloméricos no braço longo. Na população do rio Mourão destaca-se um grande bloco intersticial do braço longo do par 29 e na população do ribeirão Atlântico destacam-se blocos heterocromáticos no braço curto do par 5, um bloco intersticial no braço longo do par 16 e blocos teloméricos nos braços longos dos pares 20 e 22. Com relação ao número e distribuição dos sítios de DNAr 5S houve também variação entre as populações, no

entanto, as três populações apresentaram em comum um par de metacêntricos portadores de sítios 5S intersticial. Enquanto na população do ribeirão Atlântico observou-se apenas o par de metacêntrico portador do sítio rDNA 5S, sítios adicionais foram localizados nos braços curtos de dois pares submetacêntricos e dois pares subtelocêntricos nas populações dos rios Keller e Mourão. Portanto, os dados cromossômicos obtidos para as três populações de *H. paulinus* caracterizam um polimorfismo de heterocromatina e de NORs, permitindo uma diferenciação na microestrutura cariotípica sugerindo eventos de rearranjos não-Robertsonianos determinando os eventos de evolução cariotípica deste gênero. Em resumo, os dados obtidos no presente corroboram a diversidade cariotípica no gênero *Hypostomus*, contribuindo com informações significativas reforçando a hipótese de que a espécie *H. ancistroides* seja um complexo de espécies e que as três populações de *H. paulinus* estão sofrendo um processo de evolução cariotípica, envolvendo dispersão de heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo.

Palavra Chave: *Hypostomus*, evolução cariotípica, diversidade cariotípica

GENERAL ABSTRACT

The genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, is composed of small fishes to large popularly known as catfishes. Due to the high morphological similarities among the species of *Hypostomus*, there is difficulty in the taxonomic status of the definition of these, the cytogenetic analysis have contributed significantly as a cytotaxonomic tool to the group. *Hypostomus* is characterized by a wide variation in the diploid number (54-84 chromosomes) having different karyotype formulas, indicating divergent evolution for this group. Therefore, this study aimed to analyze cytogenetically different species of *Hypostomus* collected in two tributaries of upper Paraná river basin to obtain species-specific possible characters, contributing this way to the taxonomy of this group, as well as adding data to inferences about their karyotype evolution. In Keller river (tributary of Ivaí river basin) were analyzed - *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae*, and *Hypostomus* aff. *hermanni*. In addition to these species, three populations of *Hypostomus paulinus* were collected in Mourão and Keller rivers (tributary of Ivaí river) and Atlantic stream (tributary of Pirapo river). The species were submitted to conventional analysis as Giemsa coloration, impregnation by silver nitrate, C-banding and molecular cytogenetically technique of Double FISH with rDNA 18S and 5S probes. *H. ancistroides* observed $2n = 68$ chromosomes with $16m+12sm+22st+18a$, $FN=118$ for males and $16m+13sm+22st+17a$, with $FN = 119$ for females, featuring a chromosome system of sex determination of the type ZZ / ZW. This species presented a multiple NORs (three chromosome pairs) system detected by silver nitrate (Ag-NORs) and rDNA 18S probe. The heterochromatin was found in pericentromeric region of most chromosomes, in NORs regions and bitelomeric blocks on short arms of pair 14, and telomeric on long arm of pair 31, not marked in sexual pairs. FISH with rDNA 18S probe revealed multiple sites (2 chromosome pairs) located in interstitial and telomeric position. *Hypostomus* cf. *topavae* showed $2n=80$ chromosomes being $14m+30sm+18st+1a$ in both genders. This specie showed multiple NORs (3 chromosome pair) detected by silver nitrate and rDNA 18S. The heterochromatin was found in pericentrometric region of many chromosomes, in NORs regions and in telomeric blocks on short arm of pairs 7 and 15 and telomeric blocks of long arm of pair 18. FISH with rDNA 5S probe showed multiple sites (2 chromosomes pairs) located in interstitial and telomeric positions. For *Hypostomus* aff. *hermanni* was found a diploid number of $2n=72$, with $12m+22sm+18st+20a$ and $FN=124$ without

chromosome differentiation between the genders. One multiple NOR system (Ag-NORs and FISH 18S) involving three pairs of chromosome was found too. The heterochromatin was observed in pericentromeric region of most chromosomes, in pairs Ag-NORs, in telomeric blocks of short arm of pairs 1 and 4, large blocks telomeric marking the long arm of pair 23. FISH with rDNA 5S showed an interstitial marking in just a pair of metacentric chromosomes. High diploid numbers, multiple NORs and extensive blocks of heterochromatin in some chromosomes reaffirm the hypothesis of derived karyotypes within Locariidae. Furthermore, the karyotype formulas described for *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae* and *Hypostomus* aff. *hemanni*, differ from other populations found in literature, especially the unprecedented fact of a sexual chromosome system ZZ\ZW for *H. ancistroides*. The individuals of *H. paulinus* of three analyzed populations showed diploid number of 76 chromosomes, with the karyotype formula of 10m+14sm+24ST+28a, FN=124 and without chromosome differentiation between the genders. However, the karyotypes of the populations differ in the number of nucleolar chromosomes (Ag-NORs) localizations of rDNA 5S sites and distribution of constitutive heterochromatin. The populations of Keller and Mourão rivers showed the three pairs of nucleolar chromosomes, 9, 20 and 28 while Atlantic stream population showed just one pair of chromosomes (pair 9) whose markings by silver impregnation were confirmed by FISH 18S. The distribution of constitutive heterochromatin was evidenced in pericentromeric and telomeric regions in most of chromosomes of Keller river population and fewer in of Mourão river and Atlantic stream and coincides with the Ag-NORs pairs in the three populations. However each population detached by the presence of large heterochromatic blocks. In the Keller river population stood out pairs 1, 12, 16, 23 with markings all along the short arm, the long arm of pair 25 (biggest acrocentric) and a bitelomeric marking the pair 22 heteromarking short arm; and the pair and 35 with telomeric blocks on long arm. In the population of Mourão river stands out a large interstitial block of long arm of pair 29 and in the Atlantic stream population stands out heterochromatic blocks on short arm of pair 5, an interstitial block in the long arm of pair 16 and telomeric blocks in the long arm of pairs 20 and 22. Regarding the number and distribution of 5S rDNA sites there were also variation between populations, however, the three populations had in common a pair of metacentric carriers of interstitial 5S sites. Whereas the population of the Atlantic stream there was only the pair of metacentric carrier 5S site, additional sites were located on the short arms of two submetacentric pairs and two subtelocentric pairs in

populations of Keller and Mourão rivers. Therefore chromosome data obtained for the three populations of *H. paulinus* featuring a polymorphism of heterochromatin and NORs, allowing differentiation in karyotype microstructure suggesting new evolutionary trends for this species. In summary, the data obtained in the present corroborate the karyotype diversity in the *Hypostomus* genus, contributing significantly with information supporting the hypothesis that *H. ancistroides* is a species complex and that the three populations of *H. paulinus* are suffering a process of karyotype evolution involving dispersion of heterochromatin and nucleolar organizing regions.

Key Word: *Hypostomus*, karyotype evolution, diversity karyotype

Capítulo I – Caracterização Citogenética de três espécies de *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes - Loricariidae) do rio Keller - bacia do rio Ivaí – Paraná: uma contribuição a variabilidade cariotípica do gênero

Este trabalho será submetido ao periódico ZebraFish e está formatado nas normas deste periódico.

Caracterização citogenética de três espécies de *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes - Loricariidae) do rio Keller - bacia do rio Ivaí – Paraná: uma contribuição a análise da variabilidade cariotípica do gênero

Lara-Kamei MCS¹, Baumgärtner L², Paiva S, Zawadzki CH², Portela-Castro ALB², Martins-Santos IC²

1 Centro Universitário de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá PR, Brasil (Telefone: +55-44-3027-6360 – R 1138)

2 Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética, 87020 900 Maringá, PR, Brasil (Telefone: +55-44-30114688)

RESUMO

Hypostomus é um dos gêneros mais especiosos da família Loricariidae, com aproximadamente 130 descritas, sendo amplamente encontrados nos rios neotropicais. Apresentam uma ampla diversidade quanto ao padrão de cores e morfologia, sendo a análise citogenética uma ferramenta importante para fornecer subsídios aos estudos taxonômicos e sistemáticos do gênero. Neste estudo foram analisadas três espécies de *Hypostomus*: *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae* e *Hypostomus* aff. *hermanni*, coletados no rio Keller, afluente do rio Ivaí, da bacia do alto rio Paraná (PR), os quais foram submetidos a análise citogenética através de técnicas de coloração com Giemsa, impregnação por nitrato de prata, bandeamento C e pelo FISH (Hibridização fluorescente *in situ*) com sondas de rDNA 18S e 5S. O número diploide observado foi de 68 cromossomos para *H. ancistroides* com 16m+12sm+22st+18a, NF=118 para machos e 16m+13sm+22st+17a, NF=119 para fêmeas; 80 cromossomos para *Hypostomus* cf. *topavae* com 14m+30sm+18st+18a e NF=142, sem diferenciação cromossômica entre os sexos; e 72 cromossomos para *Hypostomus* aff. *hermanni* com 12m+22sm+18st+20a, NF=124, sem diferenciação cromossômica entre os sexos. Foram observados três pares de cromossomo portadores de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) para as três espécies, porém em pares de cromossomos distintos em cada espécie, sendo a maioria localizada em posição terminal de braços curtos de cromossomos submetacêntricos. Nas três espécies as marcações Ag-NORs foram coincidentes com as hibridizações com sondas de rDNA 18S. A heterocromatina foi observada em posição pericentromérica e na região de NORs nas três espécies, sendo evidenciado em *H. ancistroides* marcação bitelomérica no par 14, telomérica no braço

longo do par 31, em *Hypostomus* cf. *topavae* destacam os pares 7 e 15 com blocos grandes teloméricos nos braços curtos e o par 18 que além da região de NOR apresentou com marcação telomérica no braço longo e em *Hypostomus* aff. *hermanni* blocos grandes teloméricos nos braços curtos dos pares 1 e 4 e uma marcação telomérica no braço longo do par 23. FISH com sonda rDNA 5S evidenciou sítio intersticial em um par de cromossomos metacêntricos recorrente nas três espécies. No entanto, em *H. ancistroides* e *Hypostomus* cf. *topavae*, além deste par, foi detectado marcação telomérica no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos enquanto que *Hypostomus* aff. *hermanni* apresentou sítios de rDNA 5S somente no par de metacêntricos. Estas três espécies apresentaram o mesmo número diploide de outras populações já analisadas citogeneticamente, porém com variações microestruturais em seus cariótipos, e *H. ancistroides* apresentando a diferenciação cromossômica em par sexual ZZ/ZW, diferente de todas as populações já analisadas. Estes dados reforçam a hipótese de que *H. ancistroides* formam um complexo de espécies e evidenciam que diversos rearranjos cromossômicos estão atuando na evolução cariotípica do gênero *Hypostomus*.

Palavras chaves: *Hypostomus*, evolução cariotípica, sítios rDNA 5S e 18S.

ABSTRACT

The *Hypostomus* genus is one of the richest in species in the family Locariidae, comprising over 130 species reported, widely found in Neotropical rivers and have a wide diversity of color patten and morphology. The cytogenetic analysis is an important tool to provide subsidies to taxonomic systematic studies in the genus. This study analyzed three species of *Hypostomus*: *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *topavae* and *Hypostomus* aff. *hermanni*, collected in Keller river, tributary of Ivaí river of upper Paraná river basin, which were submitted to cytogenetic analysis by staining techniques with Giemsa, silver nitrate impregnation, C-banding and FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) with rDNA 18S and 5S probes. There was observed 68 diploid chromosomes number for *H. ancistroides* with karyotype formula of $16m+12sm+22st+18a$ with $NF=118$ for males and $16m+13sm+22st+17a$ with $FN=119$ for females; 80 chromosomes for *Hypostomus* cf. *topavae* with karyotype formula of $14m+30sm+18st+18a$ and $FN=140$ with no differentiation between genders and 72 chromosomes for *Hypostomus* aff. *hermanni* with karyotype formula of $12m+22sm+18st+20a$ and $FN=124$, with no differentiation between genders. Three pairs of chromosomes, which have a Nucleolar Organizer Regions (NORs) for the three species were observed, but in different chromosomes pairs, most of them was located in terminal position of short arms of submetacentric chromosomes. In all species the Ag-NORs markings coincided with those hybridization with rDNA 18S probe. The heterochromatin was observed in centrometric position and at the NORs area in the three species. In addition, it was evidenciaded in *H. ancistroides* bitelomeric marking on the of pair 14 and telomeric on the long arm of pair 31. For *Hypostomus* cf. *topavae* is distinguished the pairs 7 and 15 standed out with large telomeric blocks in the short arm and the pair 18 which beyond the NORs area showed telomeric marking on long arm. For *Hypostomus* aff. *hermanni* was observed large blocks on the short arms of pairs 1 and 4, and telomeric marking on long arm of pair 23. The rDNA 5S FISH evidenciaded an interstitial site on a pair of metacentric chromosomes, recurrent in the three species. However in *H. ancistroides* and *Hypostomus* cf. *topavae* beyond this pair was detected telomeric marking on the short arm of a submetacentric pair of chromosome while *Hypostomus* aff. *hermanni* showed sites of rDNA 5S only in metacentric pairs. These three species showed the same diploid number as the others analyzed populations but with microstructural variations in their karyotypes, and *H.*

ancistroides showing chromosomal differentiation in sexual pair ZZ/ZW different of all analyzed populations. These information reinforce the hypothesis of *H. ancistroides* form a complex of species and evidenciate that many chromosome rearrangements are acting in karyotype evolution of *Hypostomus* genus.

Keys Words: *Hypostomus*, Karyotype evolution, 18S and 5S rDNA sites.

INTRODUÇÃO

A família Loricariidae possui o segundo maior número de espécies entre os teleósteos, com aproximadamente 683 espécies distribuídas na região Neotropical,¹ apresentando uma ampla diversidade fenotípica intraespecífica, e similaridade interespecífica que muitas vezes dificulta a sistemática. Uma de suas subfamílias mais especiosa é Hypostominae, composta por 60 gêneros,² entre eles *Hypostomus*, que apresenta o maior número de espécies, com 132 espécies descritas.³ A sistemática de *Hypostomus* na bacia do rio Paraná é um assunto bastante complexo⁴ e, o gênero necessita de uma criteriosa revisão, antes que se possa identificar as espécies com segurança.⁵

Loricariidae é um grupo muito diversificado do ponto de vista citogenético, com variação no número diplóide de 36 cromossomos para *Rineloricaria latirostris*⁶ a 96 cromossomos para *Upsilonodus* sp.⁷ Esta variação no número diplóide é acompanhada por uma ampla variação na fórmula cariotípicas, sugerindo uma evolução cariotípica divergente.⁸ O número cromossômico basal para a família Loricariidae foi sugerido como $2n=54$ cromossomos, uma vez que este valor foi observado em espécies dos gêneros da subfamília Neoplecostominae,⁸ a qual é considerada basal sob o ponto de vista taxonômico baseada em dados morfológicos.² Entretanto as espécies pertencentes a *Hypostomus*, estudadas citogeneticamente mostram números diplóides superiores a 54 cromossomos, com variação no número diplóide de 54 cromossomos para *H. plecostomus*⁹ a 84 cromossomos para uma espécie citada como *Hypostomus* sp. 2¹⁰ e atualmente nominada *Hypostomus perdido*.³ Esta informação é questionada, pois os indivíduos identificados *H. plecostomus* neste estudo⁹ podem ser um caso de erro de identificação e poderiam pertencer a outro gênero de Loricariidae. Assim, $2n=64$ cromossomos de *H. cochliodon*¹¹ deveria ser considerado o menor valor encontrado em *Hypostomus* e a amplitude cariotípica seria de $2n= 64$ a 84 cromossomos. Neste gênero o número diplóide mais freqüente é $2n= 72$ ¹² e espécies com maior número de cromossomos apresentam maior proporção de cromossomos subtelo/acrocêntricos em relação a cromossomos meta/submetacêntricos que aquelas com número diplóide menor. Esta ocorrência pode ser explicada por rearranjos Robertsonianos (fusão/fissão cêntricas) envolvidos na evolução cariotípica, e desta forma, este gênero, apresenta uma posição derivada dentro de Loricariidae.^{13,8}

Ocorrência de mecanismo cromossômico de determinação do sexo entre os Loricariidae apresenta-se bastante variável, podendo ser encontrados sistemas simples e múltiplos, no entanto não é muito comum em Hypostominae. Em relação à *Hypostomus* foram observados sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY para *H. paulinus*, *H. ancistroides*¹⁴ e *H. cochliodon*¹¹ e ZZ/ZW para *Hypostomus* sp G¹⁵ e para *H. albopunctatus*.¹⁶

A diversidade cromossômica também é observada no padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva, no número e posição da NOR, caracterizando assim, um grupo com evolução cromossômica divergente, tanto ao nível macro como microestrutural.⁸

Com relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, foram propostos dois padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva para subfamília Hypostominae, que normalmente apresenta-se em pouca quantidade. Um grupo apresenta pouca heterocromatina localizada preferencialmente na região centromérica e /ou telomérica de cromossomos do tipo meta/submetacêntricos, enquanto em outro existe a ocorrência de blocos heterocromáticos em cromossomos do tipo subtelo/acrocêntricos, preferencialmente em posição intersticial ou na região telomérica.⁸

Hypostomus apresenta diversidade na distribuição das NORs, apresentando sistema de NORs simples e múltiplas. A presença de AgNORs simples localizada em posição terminal de cromossomos é uma característica basal para Loricariidae, uma vez que este caráter é frequente nos exemplares de Neoplecostominae, a qual é considerada basal no clado Loricariidae.¹⁷ No entanto, a condição mais frequente em *Hypostomus* é a ocorrência de sistema múltiplo de AgNOR.¹⁸

Análise de citogenética molecular, como mapeamento físico de genes ribossomais, foi realizada, até o momento, apenas para um pequeno número de espécies de *Hypostomus*^{19, 20, 21, 22, 23} e localizações múltiplas para estes sítios é a condição mais freqüente.

Apesar de Loricariidae apresentar cerca de 212 espécies já estudadas citogeneticamente,²⁴ este número ainda é pequeno face a grande quantidade de 684 espécies que integram esta família e considerando a dificuldade de identificação e estabelecimento de relações filogenéticas devido a diversidade morfológicas, as análises citogenéticas se tornaram ferramentas úteis nas análise deste grupos de peixes. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo uma análise citogenética de três espécies

de *Hypostomus*, que ocorrem em pequenos rios do estado do Paraná, pertencentes à bacia do alto rio Paraná, a fim de contribuir como uma ferramenta citotaxonômica para a sistemática deste grupo, bem como fornecer dados, através de diferentes bandeamentos cromossômicos, que constituam evidências de possíveis rearranjos cromossômicos, que vêm contribuindo para a evolução cariotípica do grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas três espécies de *Hypostomus* do rio Keller, bacia do rio Ivaí (Fig. 01): *H. ancistroides* – 25 indivíduos (12 fêmeas e 13 machos) (Fig. 02 a) *Hypostomus* cf. *topavae* - 12 indivíduos (5 fêmeas e 7 machos) (Fig. 02 b) e *Hypostomus* aff. *hermanni* - 36 indivíduos (14 machos e 22 fêmeas) (Fig. 02 c)

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de células retiradas do rim e processadas de acordo com a metodologia de suspensão celular.²⁵ As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) foram detectadas pelo método de impregnação por nitrato de prata,²⁶ para a análise do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de bandamento C²⁷ usando coloração com Iodeto de Propídio.²⁸ A hibridização *in situ* fluorescente (Double FISH) foi realizada com sondas de rDNA 18S de *Prochilodus argenteus*²⁹ e de rDNA 5S de *Leporinus elongatus*³⁰ usando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH).^{31,32,33} Os cromossomos foram identificados de acordo com os critérios de relação de braços (RB).³⁴

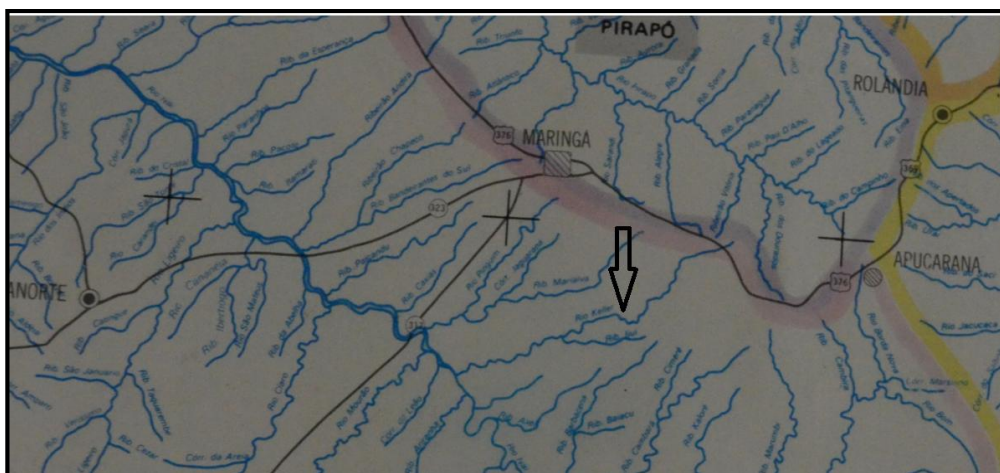


Figura 01 – mapa hidrográfico da bacia do alto rio Paraná evidenciando o local de coleta das três espécies.

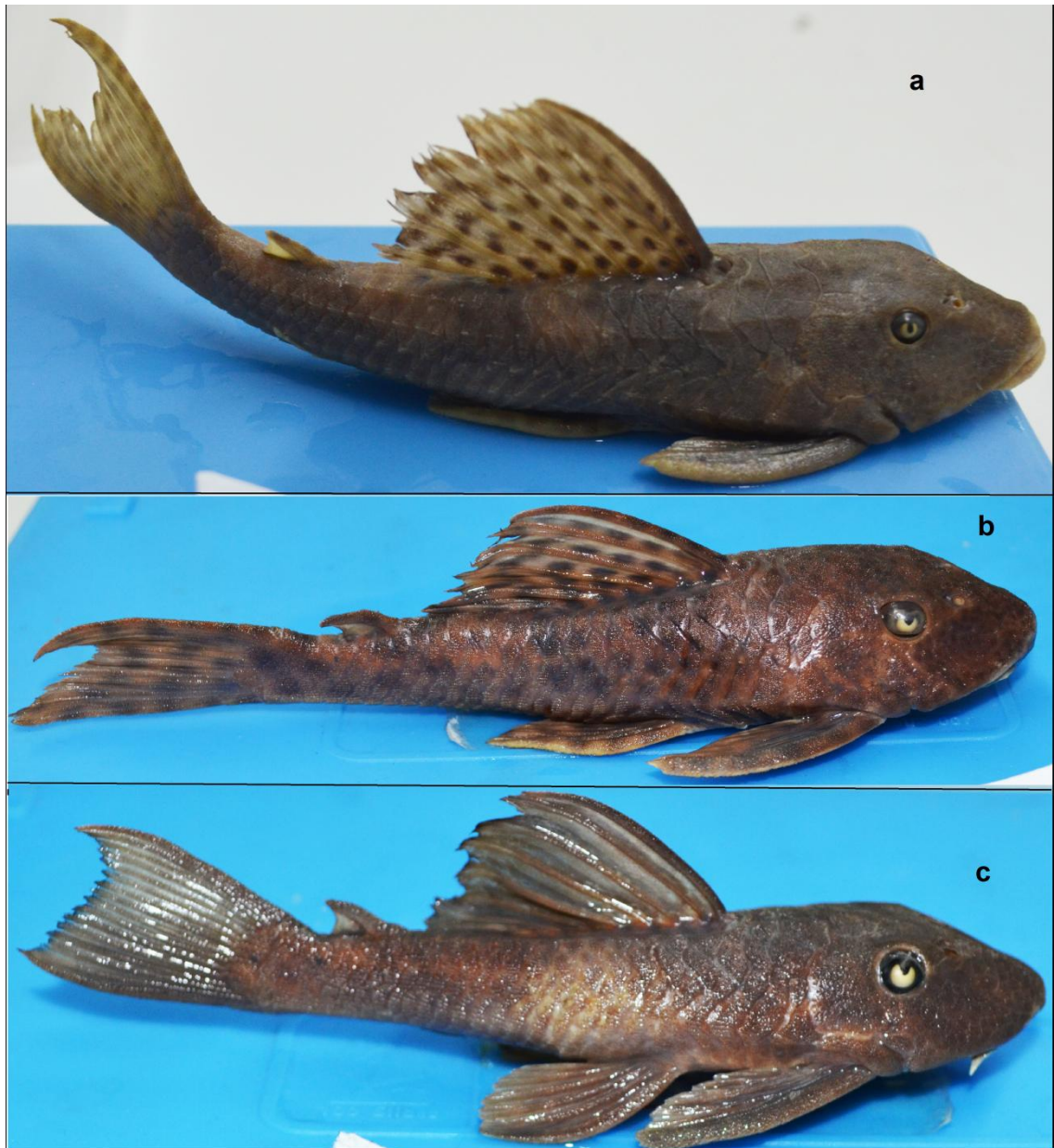


Figura 02 – *Hypostomus ancistroides* (a), *Hypostomus* cf. *topavae* (b) e *Hypostomus* aff. *hermanni* (c).

RESULTADOS

Hypostomus ancistroides (Ihering, 1911)

Esta espécie apresentou número diplóide de 68 cromossomos, com fórmula cariotípica de $16m+13sm+22st+17a$, $NF=119$ para fêmeas (Fig. 03 a) e $16m+12sm+22st+18a$, $NF=118$ para machos (Fig. 03 b). A diferença cromossômica entre os sexos se deve a presença de um par de cromossomos heteromórficos composto pelo maior acrocêntrico e um submetacêntrico nas fêmeas, enquanto que nos machos este par é constituído por dois acrocêntricos, o maior par de acrocêntricos, par 26 (Fig. 03 a e b). Foi detectado um sistema de NORs múltiplas, localizadas nos braços curtos dos pares 7 (metacêntrico), 9 (submetacêntrico) e 15 (subtelocêntrico) (Fig. 03 a). Estas posições dos sítios Ag-NOR foram coincidentes com a marcação de sonda rDNA 18S (Fig. 05 a). Detectou-se a presença de heterocromatina na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, nas regiões marcadas pelo nitrato de prata, blocos biteloméricos no par 14, e telomérico no braço longo do par 31. Não houve marcação de heterocromatina nos pares sexuais pelas técnicas utilizadas (Fig. 04 a e b). A sonda rDNA 5S detectou marcações em posição intersticial de um par de cromossomos metacêntricos e telomérica no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Fig.05 a)

Hypostomus cf. topavae (Godoy, 1969)

Esta espécie apresentou número diplóide de 80 cromossomos, com fórmula cariotípica de $14m+30sm+18st+18a$ e $NF=142$, sem diferenciação cromossômica entre os sexos. (Fig. 03 c). As NORs foram evidenciadas em três pares de cromossomos, em posição telomérica no braço curto dos pares 13 e 18 (submetacêntricos) e em posição telomérica do braço longo do par 35 (acrocêntricos) (Fig. 03 c). Estas regiões foram coincidentes com as marcações de sonda rDNA 18S (Fig. 05 b). A heterocromatina foi localizada em regiões pericentroméricas de vários cromossomos e nas regiões de NOR, destacando-se os pares 7 e 15 com blocos grandes teloméricos nos braços curtos e o par 18 que além da região de NOR apresentou marcação telomérica no braço longo (Fig. 04 c). A sonda rDNA 5S detectou marcações em posição intersticial de um par de cromossomos metacêntricos, telomérica no braço curtos um par de cromossomos submetacêntricos (Fig. 05 b).

Hypostomus aff. hermanni (Ihering, 1905)

Esta espécie apresentou número diplóide de 72 cromossomos, com fórmula cariotípica de 12m+22sm+18st+20a, NF=124, sem diferenciação cromossômica entre os sexos. (Fig. 03 d). Foi observado sistema de NORs múltiplas, encontradas em posição telomérica no braço curto dos pares 16 (submetacêntrico), 22 (subtelocêntrico) e telomérica no braço longo do par 29 (acrocêntrico) (Fig. 03 d). Estas posições dos sítios Ag-NOR foram coincidentes com a marcação de sonda rDNA 18S (Fig. 05 c). Foi evidenciado heterocromatina na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, nas regiões marcadas pelo nitrato de prata, além de blocos grandes nos braços curtos dos pares 1 e 4 e uma marcação telomérica no braço longo do par 23 (Fig.04 d). A sonda rDNA 5S demonstrou uma marcação intersticial em um único par de cromossomos metacêntricos. (Fig. 05 c).

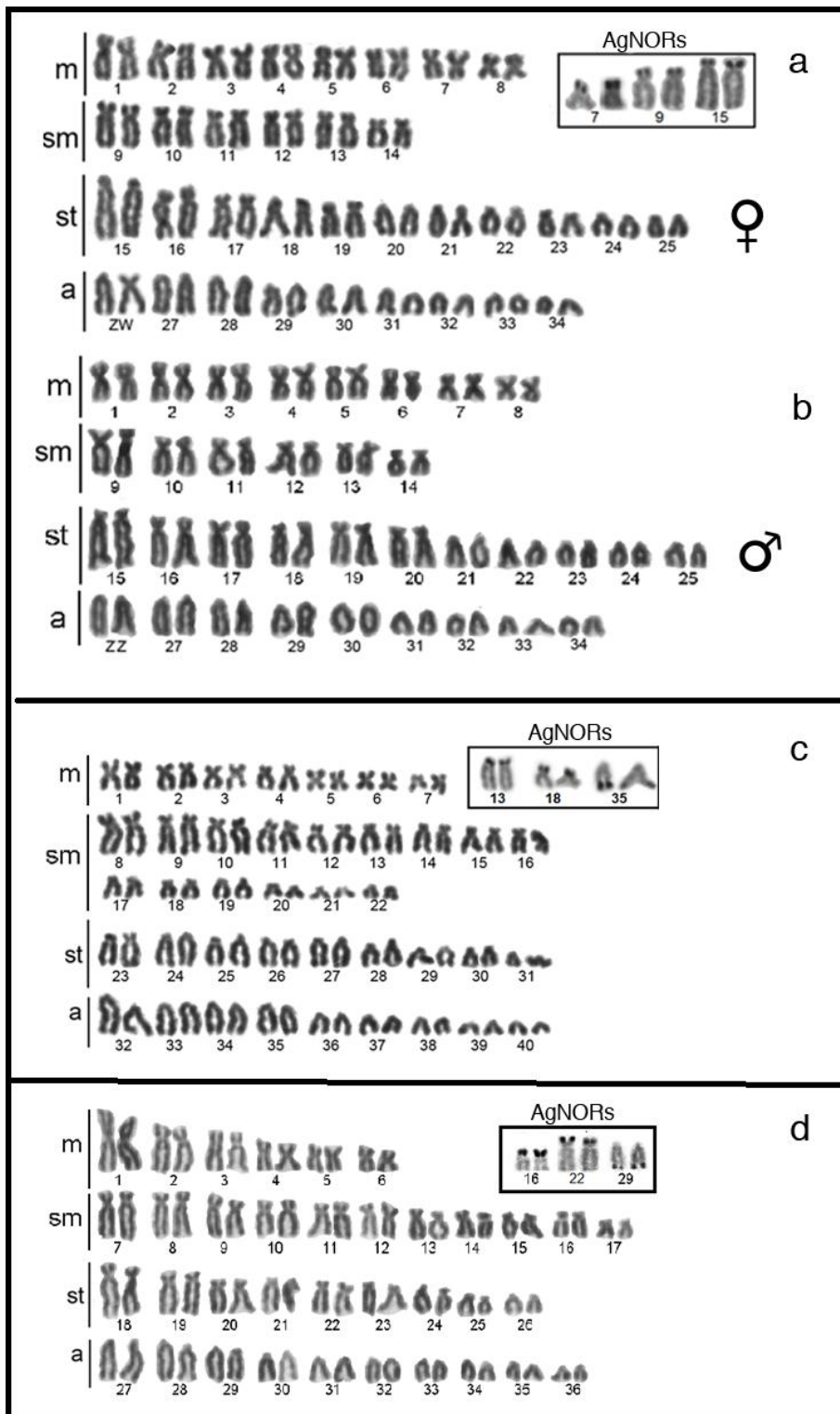


Fig. 03 – Cariótipos corados com Giemsa. *Hypostomus ancistroides* (a) fêmea e (b) macho, *Hypostomus cf topavae* (c) e *Hypostomus aff. hermanni* (d). Em evidência em cada cariótipo os pares portadores de NOR marcados por nitrato de prata.

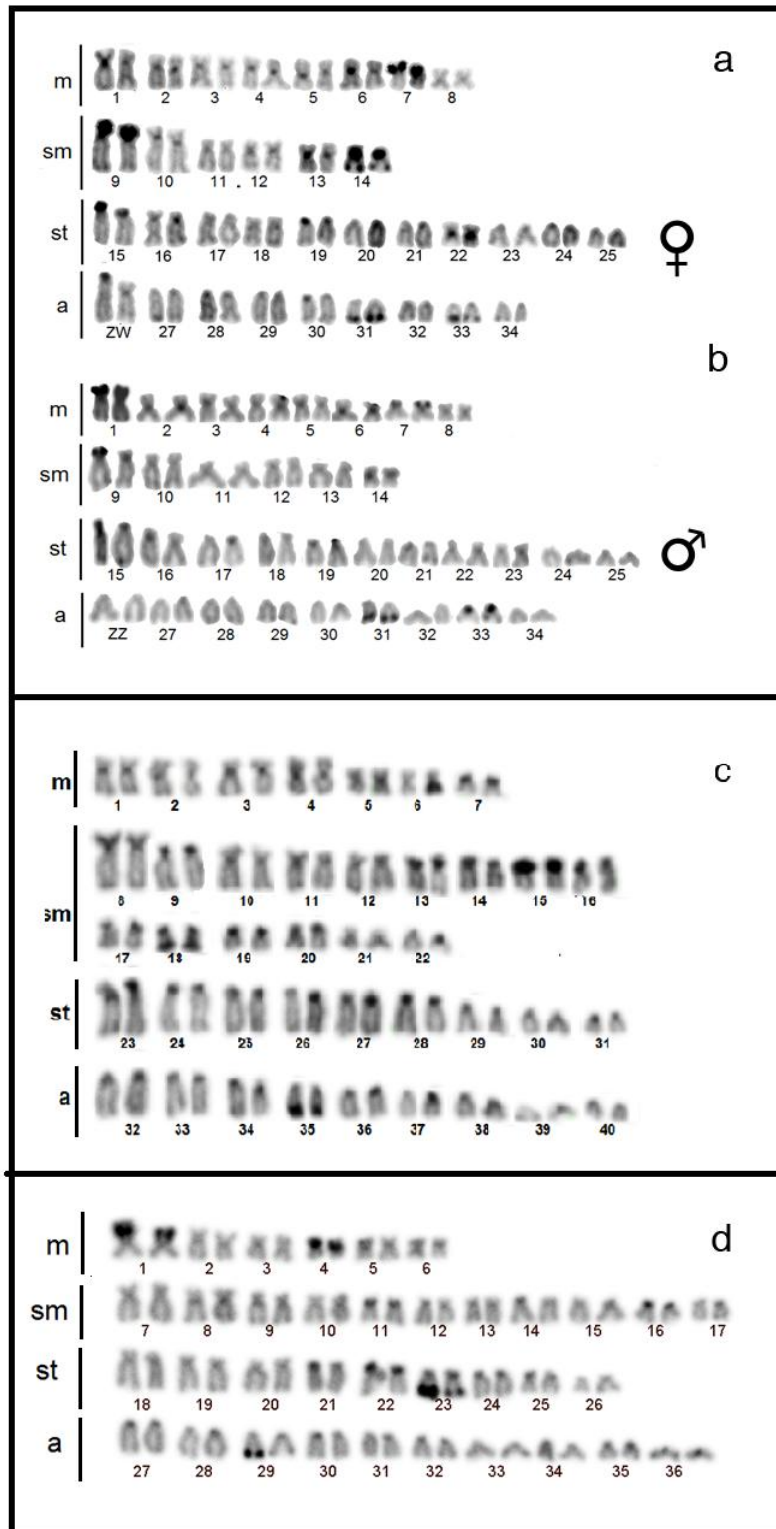


Fig. 04 – Metáfases com técnica de Banda C – (a) *Hypostomus. ancistroides* fêmea, (b) *H. ancistroides* macho, (c) *Hypostomus cf. topavae* e (d) *Hypostomus aff. hermanni*

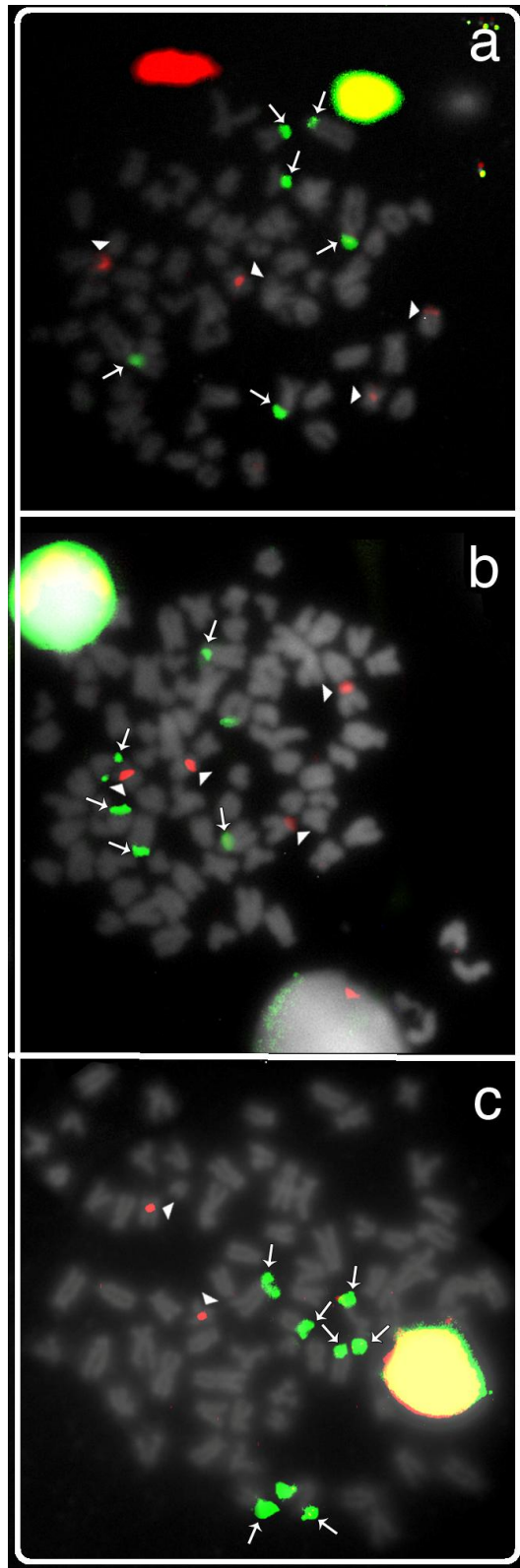


Fig. 05 – Double FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho) de (a) *Hypostomus ancistroides*, (b) *Hypostomus cf. topavae* e (c) *Hypostomus aff. hermanni*.

DISCUSSÃO

A análise cariotípica das três espécies de *Hypostomus* mostrou uma diversidade em número diplóide e fórmula cariotípica consistente com dados prévios sobre a variabilidade cromossômica existente neste gênero e uma ocorrência de par sexual ZZ/ZW inédita para *H. ancistroides*. Todas as espécies apresentaram alta frequência de cromossomos subtelo/acrocêntricos em relação a cromossomos meta/submetacêntricos (58,82% em *H. ancistroides*, 45% para *Hypostomus* cf. *topavae* e 55,55% em *Hypostomus* aff. *hermanni*).

Segundo revisão de dados citogenéticos,¹² o número diplóide em *Hypostomus* varia de 64 cromossomos para *H. cochliodon*¹¹ a 84 cromossomos para *H. perdido*³ (citado como *Hypostomus* sp – rio Perdido¹⁰) com uma alta frequência de cromossomos subtelo/acrocêntrico em relação a cromossomos meta/submetacêntricos, variando de 24,32% em *H. aurogunttatus* (citada como *H. luetkeni*)³⁵ a 83,78% em *H. strigaticeps*.¹⁴ Até o momento, entre as espécies de *Hypostomus* analisadas do ponto de vista citogenético, incluindo as do presente trabalho, apenas *H. aurogunttatus*³⁵ apresentou frequência de subtelo/acrocêntrico em relação a meta/submetacêntrico abaixo de 40%. Estes dados reforçam a hipótese de que, espécies com alto número diplóide apresentam alto número de cromossomos subtelo/acrocêntrico e propõem que rearranjos de fissão cêntricas têm representado parte importante na evolução do gênero.^{13, 8}

Enquanto as variações interespecíficas ocorrem ao nível no número diplóide, as intraespecíficas ou interpopulacionais têm sido detectadas com maior frequência ao nível fórmulas cariotípicas nas espécies analisadas. Número diplóide constante e diversificação na fórmula cariotípica foram observados em outras populações das espécies analisadas neste trabalho, *H. ancistroides*,^{12,13, 20, 22, 36, 37} *H. topavae*,^{12, 38} *H. hermanni*¹⁸ e também para outras espécies não abordadas neste trabalho, *H. albopunctatus*,^{13, 18, 39, 40} *H. nigromaculatus*,⁴¹ *H. regani*^{18, 20, 36, 37, 38} e *H. strigaticeps*.^{18, 20, 37, 42} Estas ocorrências sugerem que o gênero apresenta evolução cariotípica divergente, pois além de rearranjos Robertsonianos promovendo alteração no número cromossômico, rearranjos não-robertsonianos estariam alterando a fórmula cariotípica entre populações de uma mesma espécie. Da mesma maneira que as espécies deste gênero apresentam uma variabilidade morfológica, há uma diversidade cariotípica intraespecífica nas diversas populações, caracterizando grupos de indivíduos com

relações morfológicas e cariotípicas, mas que apresentam divergências, formando complexo de espécies em evolução.

A ocorrência de um sistema de determinação de sexo do tipo ZZ/ZW em *H. ancistroides* é inédita, pois entre as populações desta espécie analisadas até o momento, apenas uma apresentou diferença cromossômica entre o sexo, com um par de cromossomos heteromórficos em machos, indicando um sistema de diferenciação sexual XX/XY¹⁴ e, nas demais populações não foram detectadas diferença cariotípica entre indivíduos machos e fêmeas. A população analisada com presença de sistema de cromossomos sexuais,¹⁴ não tem localidade descrita e não apresenta número de depósito em museu ictiológico, o que dificulta a comparação dos resultados. A diferenciação cromossômica entre os sexos, aliada a fórmula cariotípica distinta desta população, contribui para reforçar a hipótese que propõem a existência de um complexo de espécies para *H. ancistroides*.³⁷

Embora a maioria das espécies peixes não exiba diferenciação de cromossomos sexuais, oito tipos de sistemas de mecanismos de cromossomos sexuais envolvendo macho heterogamético (XY, X0, X1X2Y e XY1Y2) e fêmeas heterogaméticas (ZW, Z0 e ZW1W2 e um WXZ não usual) foram descritos^{42, 43} em Loricariidae. Ocorrência de par sexual no gênero *Hypostomus* é raro, sendo descrito o sistema XX/XY apenas para *H. cochliodon*,¹¹ *H. ancistroides* e *H. macrops*¹⁴ e o sistema ZZ/XW para *Hypostomus* sp. G¹⁵ e *H. albopunctatus*.¹⁶ No entanto na subfamília Hypostominae é comum a ocorrência de diferenciação de cromossomos sexuais no gênero *Ancistrus*, sendo já observado o sistema ZZ/ZW para *Ancistrus* cf. *dubius*,^{44,45} *Ancistrus* sp. *purus* e *Ancistrus* sp. *macoari*⁴⁶ e *Ancistrus* sp. 8⁴⁷ e também há descrição do sistema XX/X0 para *Ancistrus* n sp.1.³⁶

Análises citogenéticas e moleculares têm revelado que o padrão de heterocromatina tem um papel importante na evolução cariotípica de peixes, determinando mecanismos de diferenciação de cariótipos, diferenciação de cromossomos sexuais e de cromossomos supranumerários em diversos grupos.^{48, 49, 50, 51} No entanto, na população de *H. ancistroides* do Rio Keller não foi evidenciado, pela metodologia aplicada, blocos de heterocromatina constitutiva nos pares sexuais, sugerindo que outros mecanismos, independente de heterocromatinização, estão envolvidos no estabelecimento do par sexual, como deleções e translocações não-robertsonianas.

Para as três espécies foi observado sistema de NORs múltiplas, e comparando os dados de localização de NORs das três espécies analisadas neste trabalho com outras populações já analisadas destas espécies podemos verificar que existem similaridades na localização das NORs. Todas as populações de *H. ancistroides* analisadas citogeneticamente até o momento, apresentaram sistemas de NORs múltiplas em braços curtos de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, sendo a maioria constituídas por 3 pares,^{13, 22, 36, 37} uma população apresentou dois pares de cromossomos submetacêntricos³⁷ e outra apresentou 4 pares de cromossomos subtelo/acrocêntricos.²⁰ Apenas duas populações de *Hypostomus cf. topavae* já foram analisadas e uma delas apresentou sistema de NORs simples no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos¹² e a outra, sistema de NORs múltiplas no braço curto de um par de cromossomos subtelocêntricos e no braço longo de um par de acrocêntricos.³⁸ A única população de *Hypostomus hermannii* já analisada citogeneticamente,¹⁸ também apresentou três pares de cromossomos subtelocêntricos e nos braços curtos. Estas similaridades entre os tipos cromossômicos e as posições das NORs em populações distintas, sugerem que estes cromossomos são homeólogos aos pares observados neste estudo e que a distinção no número dos pares em relação ao conjunto de cromossomos foi promovida por mecanismos de deleções e duplicações envolvendo o conjunto cromossômico.

Além das espécies analisadas neste trabalho, sistema de NORs múltiplas tem mostrado ser comum para o gênero *Hypostomus*, sendo descrito para *H. iheringii*,⁵² *H. nigromaculatus*,⁴¹ *H. albopunctatus*,^{13, 18} *H. strigaticeps*,^{18, 20, 37, 23} *H. regani*,^{18, 36, 37, 38} *Hypostomus* sp. C, D1, D2 e E.¹³ Embora sistema de NORs múltiplas sejam as mais comuns no gênero, sistemas de NORs simples também têm sido observada em *H. paulinus*,²⁰ *Hypostomus perdido*³ (citado como *Hypostomus* sp 2¹⁰), *H. cochliodon*⁵³ e *H. cf. wuchereri*.⁵⁴ Considerando que a presença de AgNORs simples e em posição terminal de cromossomos é uma característica basal para Loricariidae e a ocorrência de sítios múltiplos pode ser explicada por rearranjos não-robertsonianos,³⁶ a análise destas três espécies, apresentando estas características derivadas, como número diplóide elevado e sistema de NORs múltiplas vêem contribuir com a hipótese deste gênero ser derivado entre os Loricariidae.

A distribuição de heterocromatina nas espécies analisadas neste trabalho foi diversificada. Em *Hypostomus* existem dois padrões de distribuição de heterocromatina, um apresentando pouca heterocromatina localizada na região centromérica e telomérica

em cromossomos metacêntricos/submetacêntricos, e outro grupos com blocos intersticiais em cromossomos subtelo/acrocêntricos.⁸ Não é comum no gênero *Hypostomus* blocos grandes em cromossomos meta/submetacêntricos, como observados nas três espécies analisadas neste trabalho. Por outro lado, a ausência de blocos de heterocromatina intersticiais parece colocar o padrão de heterocromatina de *H. ancistroides*, *Hypostomus cf. topavae* e *Hypostomus aff. hermanni* dentro do primeiro padrão proposto para o grupo.

A dispersão da heterocromatina constitutiva pode ocorrer a partir da transferência de segmentos de heterocromatina teloméricos para sítios intersticiais equilocalizados entre braços de cromossomos não-homólogos, conforme a proximidade destes em núcleos interfásicos.⁶² Além disso, mecanismos de amplificação da heterocromatina e transposição podem agir na interfase. Este modelo explica a ocorrência destes blocos nestas espécies como condição não frequente e sustentam a hipótese de mecanismos de evolução divergentes atuando neste gênero. Desta forma, nas espécies analisadas, a presença de blocos conspícuos de heterocromatina em regiões terminais podem ter se originado por amplificação e transposição das mesmas.

Com relação à presença de sítios de rDNA 5S as três espécies apresentaram um par de cromossomos metacêntricos pequenos (par 4) portador deste sítio em posição intersticial. Em *Hypostomus aff. hermanni* este foi o único sítio encontrado, enquanto que em *H. ancistroides* e *Hypostomus cf. topavae* outro par submetacêntrico com posição telomérica foi evidenciado. Embora poucas espécies tenham sido analisadas para esta característica, ocorrência de sítios múltiplos destes cistrons foram descritos para uma população de *H. ancistroides*,²² que além do par metacêntrico com marcação intersticial, apresentou dois pares submetacêntricos, sendo um par em posição intersticial e outro em posição terminal, podendo ser considerados cromossomos homeólogos se considerarmos rearranjos não-robertsonianos. Não há relatos de análise destes cistrons para *Hypostomus cf. topavae* e *Hypostomus aff. hermanni*. Outras espécies deste gênero apresentaram tantos múltiplos sítios deste cistron como em *H. regani*,¹⁹ *Hypostomus affinis*,⁵⁵ *H. nigromaculatus*,⁵² como também sítios intersticiais de rDNA 5S em um único par metacêntrico, *H. tapijara*²² e *H. cf. strigaticpes*.²³ A localização de rDNA 5S em posição intersticial em um único par de cromossomo metacêntrico parece ser uma característica primitiva e conservada em peixes e, esta localização pode representar alguma vantagem para o grupo.⁵⁶ Entre os peixes neotropicais, a ocorrência rDNA 5S em dois pares de cromossomos tem sido

predominante.^{56, 57, 58, 59, 60} Assim, é possível que esta condição possa ser a mais basal para o gênero. No entanto, a presença de vários sítios pode ter surgido a partir de uma dispersão desta sequência mediada por elementos transponíveis.⁶¹

De forma geral, entre os Loricariídeos, diversos grupos mostram diferentes tendências de evolução cariotípicas, provavelmente devido as variações no tamanho e estruturas das populações, aliada a mobilidade, que seriam fatores preponderantes neste processo.¹³

Os grupos caracterizados por alta mobilidade e constituídos por um grande número de indivíduos apresentam uma macroestrutura cariotípica mais estável como é o caso dos Curimatídeos^{63, 64, 65} e Anostomídeos.⁶⁶ Por outro lado, os grupos com pequena mobilidade e baixa densidade populacional, mostram uma grande variação cariotípica no nível inter e intraespecífica, como verificado nos gêneros *Hoplias*,⁶⁷ *Astyanax*⁶⁸ e *Corydoras*.⁶⁹ Pelo fato das espécies do gênero *Hypostomus* não apresentarem hábitos migradores e constituírem geralmente populações pequenas,⁷⁰ a fixação de rearranjos cromossômicos pode ser facilitada.

Hypostomus apresenta grande variedade morfológica que dificulta a identificação das espécies e o estabelecimento de relações filogenéticas. O estudo citogenético visa contribuir tanto com a identificação quanto para estabelecer relações filogenéticas. A caracterização destas três espécies de *Hypostomus* contribui para consolidar este grupo como um gênero derivado na família Loricariidae, pois apresentam características primitivas, como número diplóide elevado com grande proporção de cromossomos do tipo subtelo/acrocêntricos em relação a cromossomos meta/submetacêntricos, derivados de rearranjos robertsonianos, e múltiplos sítios de NORs, rDNA 18S e 5S, bem com variação em distribuição de heterocromatina constitutiva, possivelmente derivada de rearranjos não-robertsonianos. Como as espécies destas populações mantiveram a constância do número diplóide encontrados em outras populações já analisadas, mas apresentaram variações microestruturais em seus cariótipos, reforçam a hipótese de evolução cariotípica divergente neste gênero e evidenciam que há grupos de indivíduos muito próximos em estrutura cariotípicas que formam complexos de espécies.

REFERÊNCIAS

1. Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Jr CJ. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Ed. PUC RS, Porto Alegre, 2003. 742pp.
2. Armbruster JW. Phylogenetic relationships of the suck-ermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc* 2004; 141:1–80.
3. Zawadzki CH, Tencatt LFC, Froehlich O. A new uniscuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin. *Neot Ichthyol* 2014; 12:97–104.
4. Zawadzki CH, Weber C, Pavaneli CS. A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriforme: Loricariidae) from the upper river Paraná basin, Central Brazil. *Neot Ichthyol* 2010; 8:719–725.
5. Britski HA. Peixes do Pantanal. Manual de identificação por Heraldo A. Britski, Keve Z. de S. de Silimon, Balzac S. Lopes. Brasília: Embrapa-SPI. Corumbá: Embrapa-CPAP., 1999.
6. Giuliano-Caetano L. Polimorfismo Cromossômico Robertsoniano em Populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.
7. Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 2005; 94: 180–186.
8. Artoni RF, Bertollo LAC. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae (fish: Siluriformes). *Hereditas* 2001; 134: 201–210.
9. Muramoto JI, Ohno S, Atkin NB. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma* 1968; 24: 59–66.
10. 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* 2008; 7: 583–591.
11. Cereali SS. Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.
12. Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthys, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosome types. *Rev Fish Biol Fish* 2012; 22: 241–250.
13. Artoni RF, Bertollo LAC. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on Karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 1996; 49: 81–90.
14. Michele JL, Takahashi CS, Ferrari I. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 1977; 42: 539–546.
15. Artoni RF, Venere PC, Bertollo LAC. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 1998; 63: 421–425.
16. Maurutto FAM. Contribuição a Citogenética de Peixes do Gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.
17. Alves LA, Oliveira C, Foresti F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica* 2005; 124: 127–136.

18. Bueno V, Venere PC, Zawadzki CH, Margarido VP. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Rev Fish Biol Fish* 2013; 23: 103–112.
19. Mendes-Neto EO, Vicari MR, Artoni R, 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* 2011; 5: 133–142.
20. Rubert M, Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC, Giuliano-Caetano L. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comp Cytogenet* 2011; 5: 397–410.
21. Ziemniczak K, Barros AC, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida M C, Cestari MM, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR, Barros AV. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Italian Journal of Zoology* 2012; 79:1-10.
22. Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, Artoni RF, Moreira-Filho O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res* 2013; 12 (1): 463-471.
23. Baumgärtner L, Paiz L M, Zawadzki CH, Margarido VP, Portela-Castro ALB. Heterochromatin Polymorphism and Physical Mapping of 5S and 18S Ribosomal DNA in Four Populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: Evolutionary and Environmental Correlation. *Zebra Fish* 2014; 11(5): 479-487.
24. Arai R. *Fish Karyotypes: A Check List Japan*: Springer, 2011.
25. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1978; 1: 103–120.
26. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980; 36: 1014–1015.
27. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 1972; 75:304–306.
28. Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP. Propidium iodide forming heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem* 2009; 87: 433–438.
29. Hatanaka T, Galetti-Jr PM. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 2004; 122: 239–244.
30. Martins C, Galetti-Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 1999; 7:363–367.
31. Pinkel D, Sraume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934–2938.
32. Heslop-Harrison JS, Schawarzacher K, Anamthaw-Jónsson AR, Leitch MS, Leitch IJ. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique J. Methods cellular and molecular Biology* 1991; 3: 109-116.
33. Cuadrado A, Jouve N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-Triticale. *Chromosome Research* 1994; 2: 231-338.
34. Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 1964; 52: 201–220.

35. Eler ES, Alvarenga SM, Santos JAD. Descrição do cariótipo de *Hypostomus luetkeni* da bacia do rio Doce; região sudeste. IX Simpósio de citogenética e genética de peixes Maringá PR 61p. 2002.
36. Alves A L, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 2006; 128: 1-9.
37. Endo KS, Martinez ERM, Zawadzki CH, Paiva LRS, Júnior-Jr HF. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum* 2012; 34 (2): 181-189.
38. Martinez ERM, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genet Mol Biol* 2011; 34: 562–568.
39. Casale VC, Tchaicka L, Pegoraro JL, Margarido VP. Relações filogenéticas em quatro espécies de *Hypostomus* (Pisces, siluriformes, Loricariidae) baseado em análise citogenética, dados de isoenzimas e coloração de corpo. IX Simpósio de citogenética e genética de peixes Maringá Pr. 2002.
40. Penteado PR, Brandão KO, Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF. Diversidade cromossômica e distribuição de heterocromatina constitutiva no gênero *Hypostomus* (Siluriformes Loricariidae). XIII Simpósio de citogenética e genética de peixes. Ponta Grossa PR 105p 2009.
41. Rubert M, Zawadzki CH, Giuliano-Caetano L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: loricariidae). *Neot Ichthyol* 2008; 6: 93–100.
42. Bertollo LCA, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. A Biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and citotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 2000; 8: 603-613.
43. Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002; 208: 191–364.
44. Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 2004; 57: 327-331.
45. Mariotto S, Miyazawa CS. A. *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four population an occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 2006; 59: 299-304.
46. Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS. Genetics of Neotropical Fish: From de chromosomes to population. *Fish Physiol Biochem* 2009; 35: 81-100.
47. Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RA, Moreira-Filho O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus Kner 1854* (Loricariidae, Ancistrinae) from three hydrographic basin of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet* 2011; 5: 289-300.
48. Molina WF, Galetti-Jr PM. Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW). *Genetica* 2007; 130:153–160.
49. Feldberg E, Bertollo LAC, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Moreira-Filho O, Santos AF. Biological aspects of Amazonian fish. IX. Citogenetic studies in two species of the genus *Simaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome* 1987; 29 (1): 1-4.
50. Souza IL, Moreira-Filho O, Galetti-Jr PM. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazil J Genet* 1996; 19(3): 405-410.
51. Margarido PV, Galetti Jr PM. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genet Mol Biol* 2000; 23 (3); 241–250.

52. Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, Artoni RF, Moreira-Filho O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comp Cytogenet* 2012; 6:115–125.
53. Paiva S. Estudos citogenéticos e aloenzimáticos do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraná e Paraguai. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
54. Bitencourt JA, Affonso PRA, Giuliano-Caetano L, Dias AL. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence *Neot Ichth* 9: 317–324.
55. 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* 2004; 106: 107–110.
56. Martins C, Galetti-Jr PM. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* 2001; 111:439–446.
57. Martins C, Galetti-Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae Characiformes). *Chromosome Research* 1999; 7: 363-367.
58. Martins C, Galetti Jr PM. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* 2000; 8:353–355.
59. Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr PM. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 2001 44:893–902.
60. Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ: Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 2002; 97:229–233.
61. Da Silva MC, Cestari MM, Swarça AC, Fenocchio AS. First chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the south coast of Brazil. Conventional, C-NOR and CMA3 bandings and FISH studies. *Caryologia* 2003; 56 (2): 187-191.
62. Schweizer D, Loidl J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosome Today* 1987; 9: 61–74.
63. Venere PC, Galetti-Jr PM. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical characiformes of the family Curimatidae. *Braz J Genetic* 1989; 12: 17-25.
64. Feldberg E, Rebelo-Porto JI, Bertolo LAC. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachneina* and *Curimatella*. *Rev Bras Genet* 1992; 15: 369-383.
65. Venere PC, Souza IL, Silva LKS, Anjos MB, Oliveira RR, Galetti-Jr PM. Recent chromosome diversification in the evolutionary irradiation of the freshwater fish Curimatidae. *J Fish Biol* 2008; 72: 1976-1989.
66. Galetti-Jr. PM, Mestriner CA, Venere PC, Foresti F. Heterochromatin and Karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenet* 1991; 56:116-121.
67. Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti-Jr PM. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* 1986; 28: 153-159.
68. Moreira-Filho O, Bertollo LAC. *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Braz J Genet* 1991; 14: 331-337.
69. Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho SA. Cytogenetic and DNA content studies of armoured catfish of the genus *Corydora* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. *Braz J Genet* 1993; 617-629.

70. Britski HA, Sato Y, Rosa ABS. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. Câmara dos Deputados/CODEVASF 1984; Brasília, 143p.

Capítulo II – Citogenética comparativa de populações de *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Siluriformes: Loricaridae): uma contribuição citotaxonômica para a espécie.

Este trabalho será submetido ao periódico *Reviews in Fish Biology and Fisheries* e está formatado nas normas deste periódico

Citogenética comparativa de populações de *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Siluriformes: Loricariidae): uma contribuição citotaxonômica para a espécie.

Lara-Kamei MCS¹, Baumgärtner L², Paiva S², Zawadzki CH², Portela-Castro ALB², Martins-Santos IC²

1 Centro Universitário de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá PR, Brasil (Telefone: +55-44-3027-6360 – R 1138)

2 Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética, 87020 900 Maringá, PR, Brasil (Telefone: +55-44-30114688)

RESUMO

Hypostomus é o gênero mais especioso na família Loricariidae, compreendendo 132 espécies. Estes peixes apresentam uma grande variedade morfológica e diversidade de cores, o que dificulta a identificação de espécies, principalmente nos gêneros amplamente distribuídos. O objetivo deste estudo foi o de contribuir para a caracterização citogenéticos de *Hypostomus paulinus* de três populações distintas. Foram coletados exemplares em dois afluentes do rio Ivaí – rios Keller e Mourão e em um afluente do rio Pirapó – Ribeirão Atlântico. Os cromossomos foram submetidos à coloração por Giemsa, impregnação por nitrato de prata, bandas C e técnicas de citogenética molecular utilizando o FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*) com sondas de rDNA 18S e 5S. As três populações apresentaram $2n=76$ cromossomos com a mesma fórmula cariotípica de $10m+14sm+24st+28a$ e $NF=124$, sem diferenciação cromossômica entre os sexos. As populações dos rios Keller e Mourão apresentaram semelhanças em posição de NORs e sítios de rDNA 5S, e distinção no padrão de distribuição de heterocromatina. A população do ribeirão Atlântico mostrou-se distinta em todas estas características. Foi observado sistema de NORs múltiplas para as populações dos rios Keller e Mourão, localizadas em posição telomérica do braço curto dos pares 9 (submetacêntrico) e 20 (subtelocêntrico) e no braço longo do par 28 (acrocêntrico) e sistema de NORs simples na população do ribeirão Atlântico localizada em posição telomérica no braço curto do par 9 (submetacêntrico). A heterocromatina constitutiva permitiu distinguir cada uma das populações analisadas. A população do rio Keller apresentou heterocromatina na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, destacando blocos grandes em vários pares: 1, 12, 16, e 23 com

marcação em todo braço curto; o par 25 (maior acrocêntrico) com todo o braço longo marcado; o par 22 com marcação bitelomérica e o par 35 com blocos teloméricos no braço longo. A população do rio Mourão apresentou heterocromatina na região pericentromérica em apenas alguns cromossomos e nas regiões de Ag-NORs, destacando-se um bloco intersticial do braço longo do par 13 e um grande bloco em quase todo braço longo do par 29. A população do ribeirão Atlântico apresentou heterocromatina escassa na região pericentromérica de poucos cromossomos, nos sítio Ag-NORs e destacando bloco fortemente corado em posição telomérica no braço curto do par 5, bloco intersticial no braço longo do par 16 e blocos teloméricos nos braços longos dos pares 20 e 22. Nas três populações os sítios Ag-NORs foram banda C positiva. Os sítios de rDNA 5s foram localizados em um único par metacêntrico em posição intersticial para a população do ribeirão Atlântico e nas populações do rios Keller e Mourão este par também foi evidenciado, além localização terminal nos braços curtos de dois pares submetacêntricos e dois pares subtelocêntricos. Estas análises sugerem que estas populações de *H. paulinus* pertencem a mesma espécie, mas as variações microestruturais em seus cariótipos podem ser responsáveis por processos de evolução cariotípica distinta para cada população.

Palavras chaves: *Hypostomus*, diferenciação cariotípica, heterocromatina.

ABSTRACT

The genus *Hypostomus* is the richest in species in the family Locariidae, compressing about 132 species. These fishes have a great morphology variety and color diversity, which make it difficult to identify the species, especially of widely distributed genus. The aim of this study is cooperating to cytogenetic characterization of *Hypostomus paulinus* of three different populations. Samples were collected in two tributaries of Ivaí river- Keller and Mourão rivers and in a tributary of Pirapó river- Atlantic Stream. The chromosomes were submitted through Giemsa coloration, impregnation by silver nitrate, C-banding and techniques of molecular analysis using FISH (fluorescent in situ Hybridization) with 18S and 5S probes. All three populations showed $2n=76$ chromosomes with the same karyotype formula of $10m+14sm+24st+28a$ and $FN=124$, with no chromosomal differentiation between genders. The populations of Keller and Mourão rivers showed similarities in NORs position and rDNA 5S sites, and distinction in heterochromatin distribution pattern. The population of Atlantic stream showed distinct in all characteristics. Was observed multiple system NORs for populations of Mourão and Keller rivers, localized in telomeric position on short arm of pairs 9 (submetacentric) and 20 (subtelocentric) and on long arm of pair 28 (acrocentric) and simple NORs system in population of Atlantic stream which showed telomeric cistrons in short arm of pair 9 (submetacentric). The constitutive heterochromatin allowed distinct each one of analyzed populations. The Keller river population had heterochromatin in pericentromeric regions on the majority chromosomes, highlighting big blocks on pairs, 1, 12, 16 and 23, with blocks on the whole short arm marked, the pair 25 (biggest acrocentric) with all short arm marked, pair 22 with bitelomeric marking and 35 with telomeric blocks on long arm. All Ag-NORs sites were C-banding positive. The population of Mourão river showed heterochromatin in pericentromeric region in just a few chromosomes and regions of Ag-NORs, especially an interstitial block of long arm of pair 13 and one big block in almost all long arm of pair 29. The population of Atlantic stream showed little heterochromatin in pericentromeric region of few chromosomes in Ag-NORs sites and detaching block strongly stained in the short arm of pair 5 in the terminal position, interstitial block on the long arm of pair 16 and telomeric blocks in the long arms of the pairs 20 and 22. The sites 5S rDNA sites were localized on only one metacentric pair on interstitial position for population from Atlantic stream and populations from Keller and Mourão

river this pair was also evidenced, beyond the terminal localization on short arms of two submetacentrics pairs and two subtelocentrics pairs. These analyses suggest that these populations belong to a complex of species well related, but with microstructural variations in their karyotypes, that can be responsible for speciations process.

Key words: *Hypostomus*, karyotype variation, nucleolar organizing regions

INTRODUÇÃO

Hypostomus compreende 132 espécies que podem ser encontradas desde a Amazônia até o Paraná (Ferraris 2007; Froese e Pauly 2014; Zawadzki et al. 2014), das quais 23 espécies são relatadas para a bacia do alto rio Paraná. (Weber 2003; Jerep et al. 2007; Zawadzki et al. 2008). Este gênero é considerado um dos grupos mais diversificados de peixes neotropicais, apresentando uma variedade de formas, o que dificulta a identificação das espécies e o estabelecimento de relações filogenéticas, tornando a sistemática de *Hypostomus* um assunto muito complexo (Zawadzki et al. 2010). É observado também uma grande variação intraespecífica em relação a morfologia e padrão de cores (Reis et al. 2006)

Apesar de muitos estudos, como análise de DNA, isoenzimas e comparação morfológica, tentarem esclarecer a sistemática e relações filogenéticas entre os táxons, há muitos grupos não resolvidos dentro *Hypostomus* e as propostas filogenéticas disponíveis incluem um número limitado de espécies nominadas. (Montoya-Burgos 2003; Armbruster 2003; Zawadzki et al. 2005, 2008; Martinez 2009). Com isso, a análise citogenética de peixes torna-se uma importante ferramenta para a caracterização das espécies em estudos citotaxonômicos e verificação da biodiversidade (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Vicari et al. 2008)

Este gênero é um dos mais amplamente estudados em análises citogenéticas da subfamília Hypostominae, (Arai 2011) apresentando diversidade cariotípica de $2n=54$ para *H. plecostomus* (Muramoto et al. 1968) a $2n=84$ para *Hypostomus* sp.2 (Cereali et al. 2008), e atualmente nominada *Hypostomus perdido* (Zawadzki et al. 2014). Segundo Traldi et al. (2013) existe a possibilidade de que no estudo de *H. plecostomus* de Muramoto et al. (1968) ter ocorrido erro na identificação dos espécimes e os indivíduos analisados pertencerem a outro gênero. Desta forma o menor número cromossômico no gênero será de *H. cochliodon* com $2n=64$ cromossomos, analisado por Cereali (2006)

Segundo Artoni e Bertollo (2001), o número diplóide de 54 cromossomos é proposto como número cromossômico primitivo para loricarídeos, por ser o número diplóide encontrado nos gêneros da subfamília Neoplecostominae que é considerada basal pela classificação taxonômica (Armbruster 2004). Este número cromossômico não é freqüente para os *Hypostomus* que geralmente apresentam um número diplóide elevado, com freqüência de $2n=72$ cromossomos (Bueno et al. 2012) e com grande proporção de cromossomos do tipo subtelo/acrocêntricos em relação a cromossomos

meta/submetacêntricos, indicando que arranjos de fusão e fissão cêntricas (rearranjos Robertsonianos) contribuíram para a evolução cariotípica deste grupo. (Artoni e Bertollo 2001)

Variações cariotípicas intrapopulacionais são freqüentes em *Hypostomus*, existindo populações que apresentam o mesmo número cromossômico e variações na fórmula cariotípica como *H. ancistroides* (Michele et al. 1977; Artoni e Bertollo 1996; Alves et al. 2006; Rubert et al. 2011; Endo et al. 2012; Bueno et al. 2012), *H. albopunctatus* (Artoni e Bertollo 1996), *H. regani* (Artoni e Bertollo 1996; Alves et al. 2006; Mendes- Neto et al. 2011; Rubert et al. 2011; Bueno et al. 2012), *Hypostomus* aff. *unae* (Bittencourt et al. 2011), *H. nigromaculatus* (Rubert et al. 2008), *H. iheringii* (Traldi et al. 2012), *H. strigaticeps* (Baumgärtner et al. 2014). Estas ocorrências demonstram que rearranjos não robertsonianos também estão atuando na evolução cariotípica deste grupo.

Esta mesma diversidade é verificada no número e posições da NORs que são consideravelmente variáveis (Artoni e Bertollo 2001), sendo encontrada em sistema de NOR simples e múltiplas, frequentemente localizado em posição telomérica, associadas ou não a heterocromatina. O sistema de NORs múltiplas tem sido o mais freqüente em espécies de *Hypostomus* das bacias do sul da América do Sul. (Bueno et al. 2013). A presença de AgNORs em um único par de cromossomo é considerada basal para Loricariidae (Alves et al. 2005), portanto, considerando este caráter, o gênero *Hypostomus* pode ser considerado derivado dentro da família.

Espécies de *Hypostomus* apresentam ampla variabilidade na natureza e no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, o que reforça a hipótese de que este grupo possui uma evolução cromossômica divergente, tanto ao nível macro como microestrutural (Artoni e Bertollo 1999). Polimorfismos de heterocromatina constitutiva têm sido observados em algumas espécies de *Hypostomus* como observado em diferentes populações de *Hypostomus* aff. *unae* e de *Hypostomus* cf. *wuchereri* (Bittencourt et al. 2011), *H. strigaticeps* (Baumgärtner et al. 2014) e variações intrapopulacionais em *H. iheringii* (Traldi et al. 2012).

Em *Hypostomus*, dados sobre a localização física dos sítios rDNA 5S ainda são escassos, porém variações destas marcações tem sido relatada. Em *H. iheringii* foi identificado apenas um par de cromossomos marcado (Traldi et al. 2012), enquanto que em *H. regani* (Mendes-Neto et al. 2011) e *H. affinis* (Kavalco et al. 2005) foram identificados nove e oito sítios marcados, respectivamente. O par de cromossomos

metacêntricos portador do sítio intersticial de rDNA 5S é considerado mais freqüente em diversos grupos de peixes (Martins e Galetti Jr. 2001)

Podemos perceber que a diversidade morfológica é acompanhada por uma diversidade cariotípica, indicando que o gênero é um grupo derivado entre os Loricariidae, provavelmente oriundos de processos de evolução divergentes. Devido a dificuldade em identificar as espécies, as análises citogenéticas poderão contribuir para identificação de espécies e estabelecimento de relações filogenéticas. Desta forma este trabalho comparou através de dados citogenéticos, três populações de *Hypostomus paulinus* com pequenas variações morfológicas, a fim de confirmar se pertencem a mesma espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas três populações de *Hypostomus paulinus* (Ihering 1905) (Fig. 02 a, b e c): 27 indivíduos (16 fêmeas e 11 machos) do Rio Keller, 41 indivíduos (15 fêmeas e 26 machos) do Rio Mourão e 17 indivíduos (8 fêmeas e 9 machos) do Ribeirão Atlântico (Fig. 01)

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de células retiradas do rim e processadas de acordo com a metodologia de suspensão celular (Bertollo et al. 1978). As regiões organizadoras do nucléolo foram detectadas pelo método de impregnação por nitrato de prata (Howell e Black 1980) e para a análise do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de bandamento C (Sumner 1972), empregando a coloração com Iodeto de Propídio (Lui et al. 2009). A hibridização *in situ* fluorescente (Double FISH) foi realizada com sondas de rDNA 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti-Jr 2004) e de rDNA 5S de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti-Jr 1999). A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986), modificada por Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado e Jouvre (1994). Os cromossomos foram identificados de acordo com os critérios de relação de braços (RB), proposto por Levan et al. (1964)

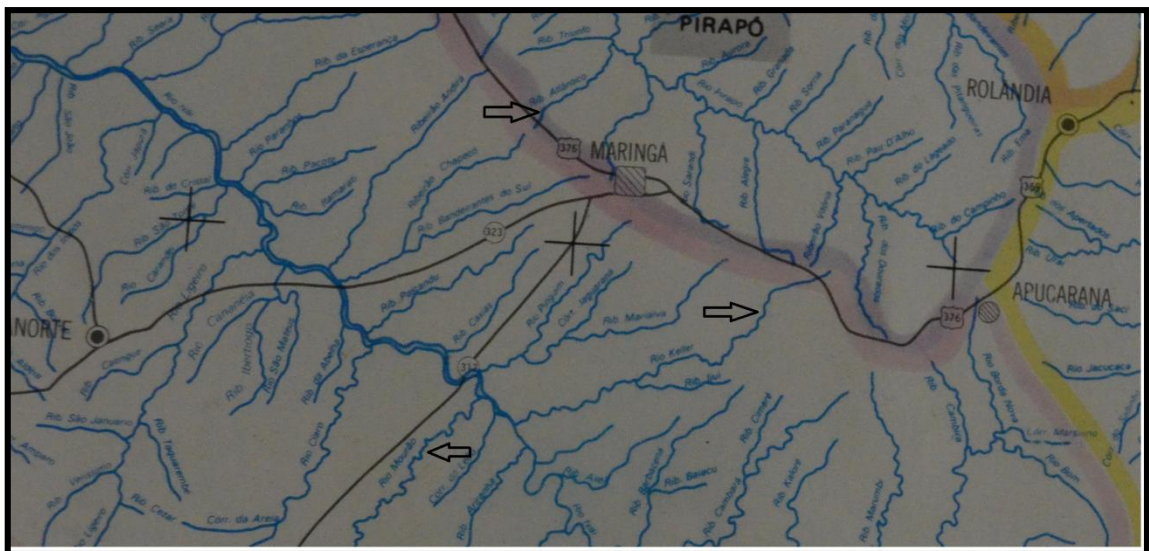


Figura 01 – mapa hidrográfico da bacia do alto rio Paraná evidenciando o local de coleta das três populações.

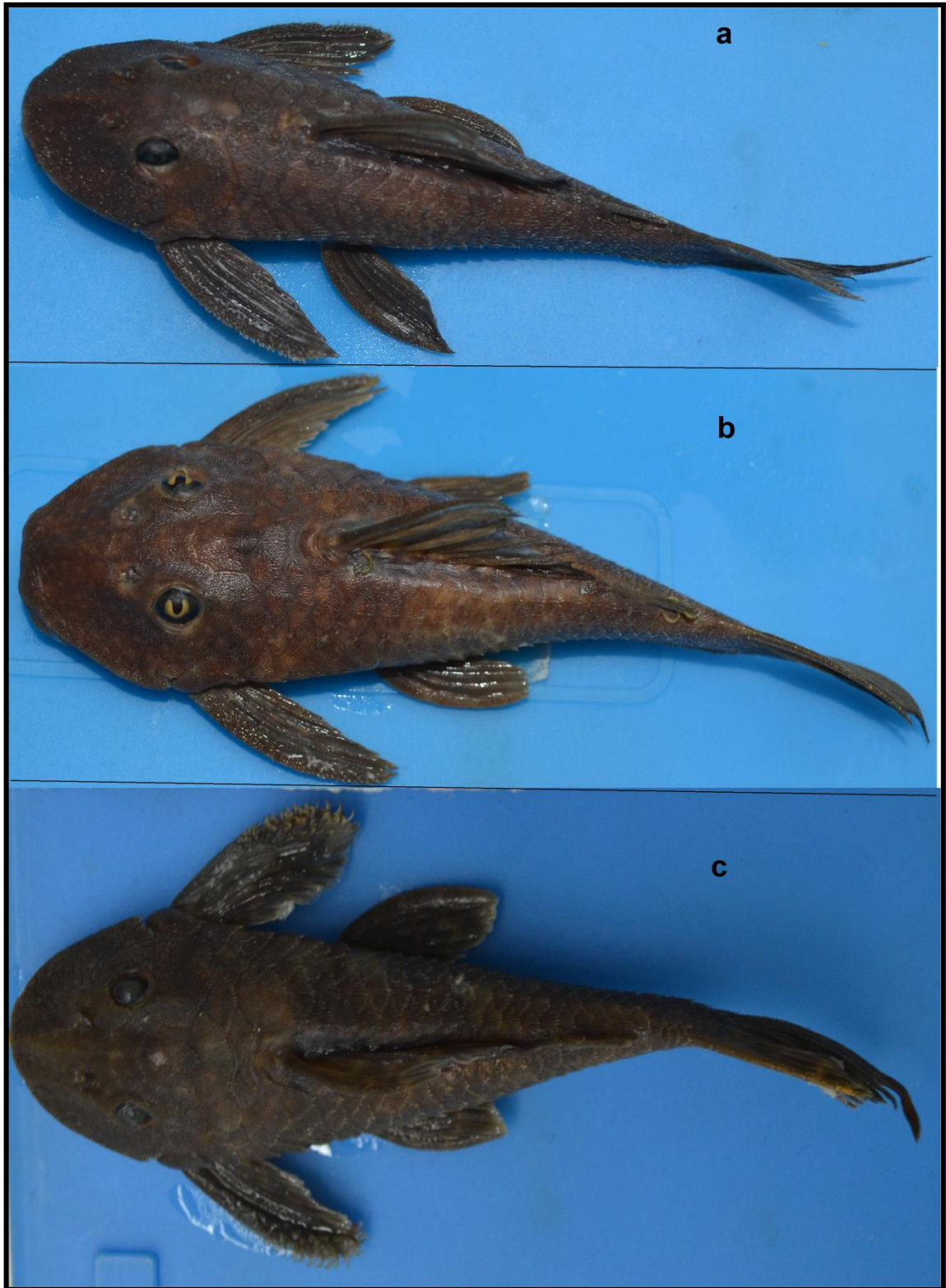


Figura 02 – imagens dos espécimes de *Hypostomus paulinus* população do rio Keller (a), população do rio Mourão (b) e população do ribeirão Atlântico (c).

RESULTADOS

Os indivíduos analisados nas três populações apresentaram número diplóide de 76 cromossomos, com fórmula cariotípica de $10m+14sm+24st+28a$ e $NF=124$, sem diferenciação cromossômica entre os sexos (Fig. 03 a, b e c). Estas populações apresentaram diferenças quanto ao número de cromossomos portadores de NORs, número de sítios de rDNA 5S e no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, que serão descritas a seguir.

População de *Hypostomus paulinus* do rio Keller.

Os indivíduos desta população apresentaram três pares de cromossomos portadores de sítios Ag-NOR, localizados em posição telomérica do braço curto dos pares 9 (submetacêntrico) e 20 (subtelocêntrico) e no braço longo do par 28 (acrocêntrico) (Fig. 03 a). Estas posições de NOR foram confirmadas por sonda rDNA 18S (Fig. 05 a). A heterocromatina foi observada em região pericentromérica da maioria dos cromossomos, destacando-se os pares 1, 12, 16 e 23, com marcações em todo o braço curto, o par 22 com marcação bitelomérica, o par 25 (maior acrocêntrico) com todo o braço longo heterocromático e o par 35 com bloco telomérico no braço longo. Todos os sítios Ag-NOR apresentaram-se banda C positivas (Fig 04 a). A sonda rDNA 5S evidenciou cinco pares cromossômicos portadores destes cístrons, sendo um par de metacêntricos em posição intersticial no braço curto, dois pares de submetacêntricos em posição terminal no braço curto e dois pares de subtelocêntricos em posição terminal no braço curto (Fig. 05 a).

População de *Hypostomus paulinus* do rio Mourão

Os indivíduos desta população apresentaram o mesmo padrão localização de NORs observados para os indivíduos do Ribeirão Keller, ou seja, três pares de cromossomos portadores de sítios AgNOR, localizados em posição telomérica do braço curto dos pares 9 (submetacêntrico) e 20 (subtelocêntrico) e no braço longo do par 28 (acrocêntrico) (Fig. 03 b). Esta regiões foram confirmadas por sonda rDNA 18 S (Fig. 5 b). Foi evidenciado heterocromatina em posição centromérica apenas em alguns cromossomos e nas regiões de NORs, destacando-se bloco intersticial do braço longo do

par 13 e um grande bloco em quase todo braço longo do par 29 (Fig. 4 b). A sonda rDNA 5S evidenciou cinco pares cromossômicos portadores destes cístrons, sendo um par de metacêntricos em posição intersticial no braço curto, dois pares de submetacêntricos em posição terminal no braço curto e dois pares de subtelocêntricos em posição terminal no braço curto (Fig. 05 a).

População de *Hypostomus paulinus* do ribeirão Atlântico Os

indivíduos desta população apresentaram apenas um par de cromossomos portadores de sítios Ag-NORs, localizadas no braço curto do par 9 (submetacêntrico) (Fig. 03 c). Esta localização foi confirmada por rDNA 18S (Fig. 5c). A heterocromatina constitutiva se apresentou escassa nas regiões pericentroméricas de poucos cromossomos. Destaca-se nesta população heterocromatina no braço curto em posição telomérica do braço curto do par 5, em posição intersticial no braço longo do par 16 e em posição telomérica nos braços longos dos pares 20 e 22, além do sítio Ag-NOR ser positivo (Fig. 04c). A sonda rDNA 5S evidenciou uma única marcação na região intersticial de um par metacêntrico pequeno (Fig. 05 c).

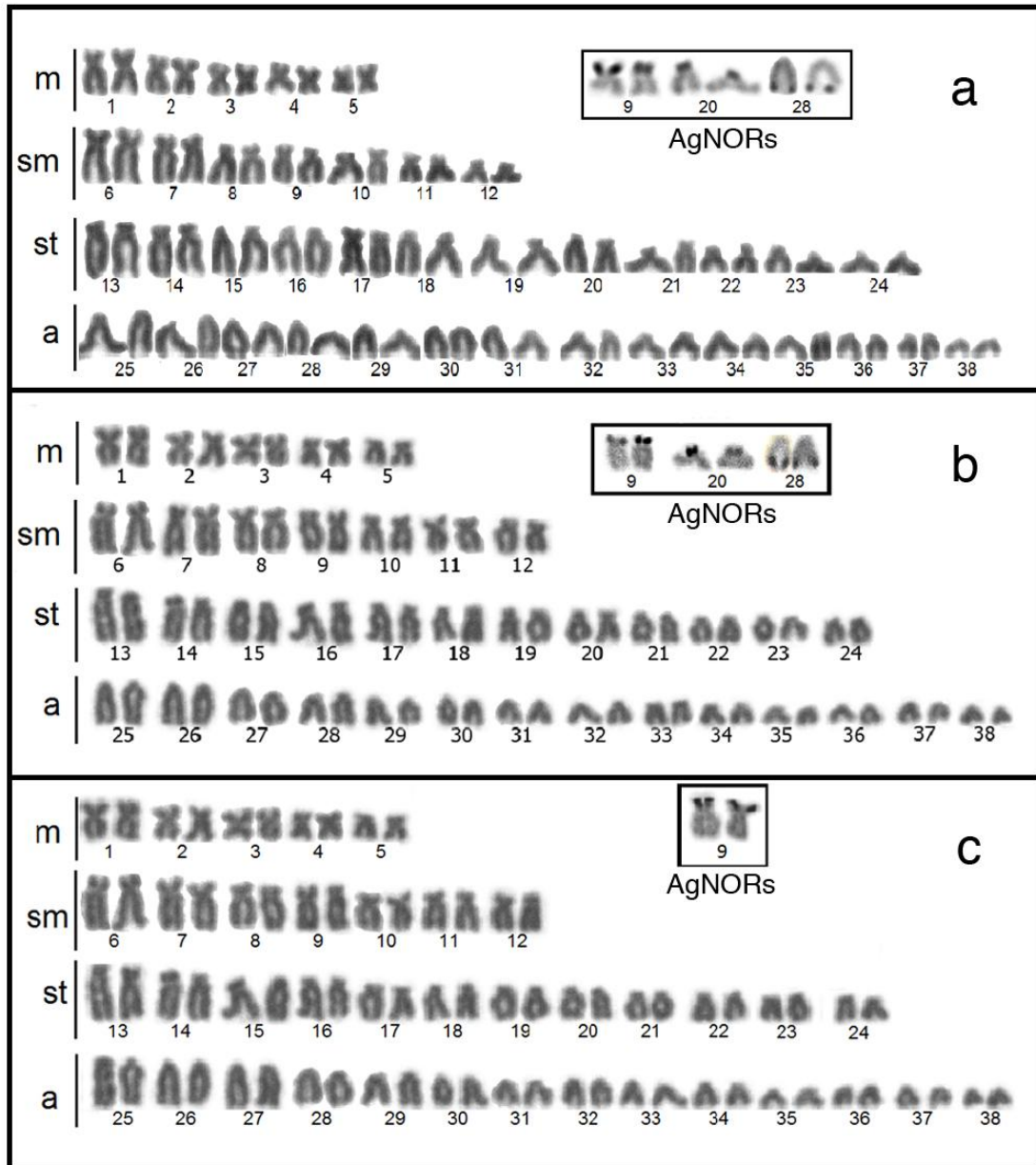


Figura 03. Cariótipos corados por Giemsa das populações de *Hypostomus paulinus* rio Keller (a) rio Mourão (b) ribeirão Atlântico(c). Em evidência em cada metáfase os pares portadores de NORs evidenciados por marcação com nitrato de prata.

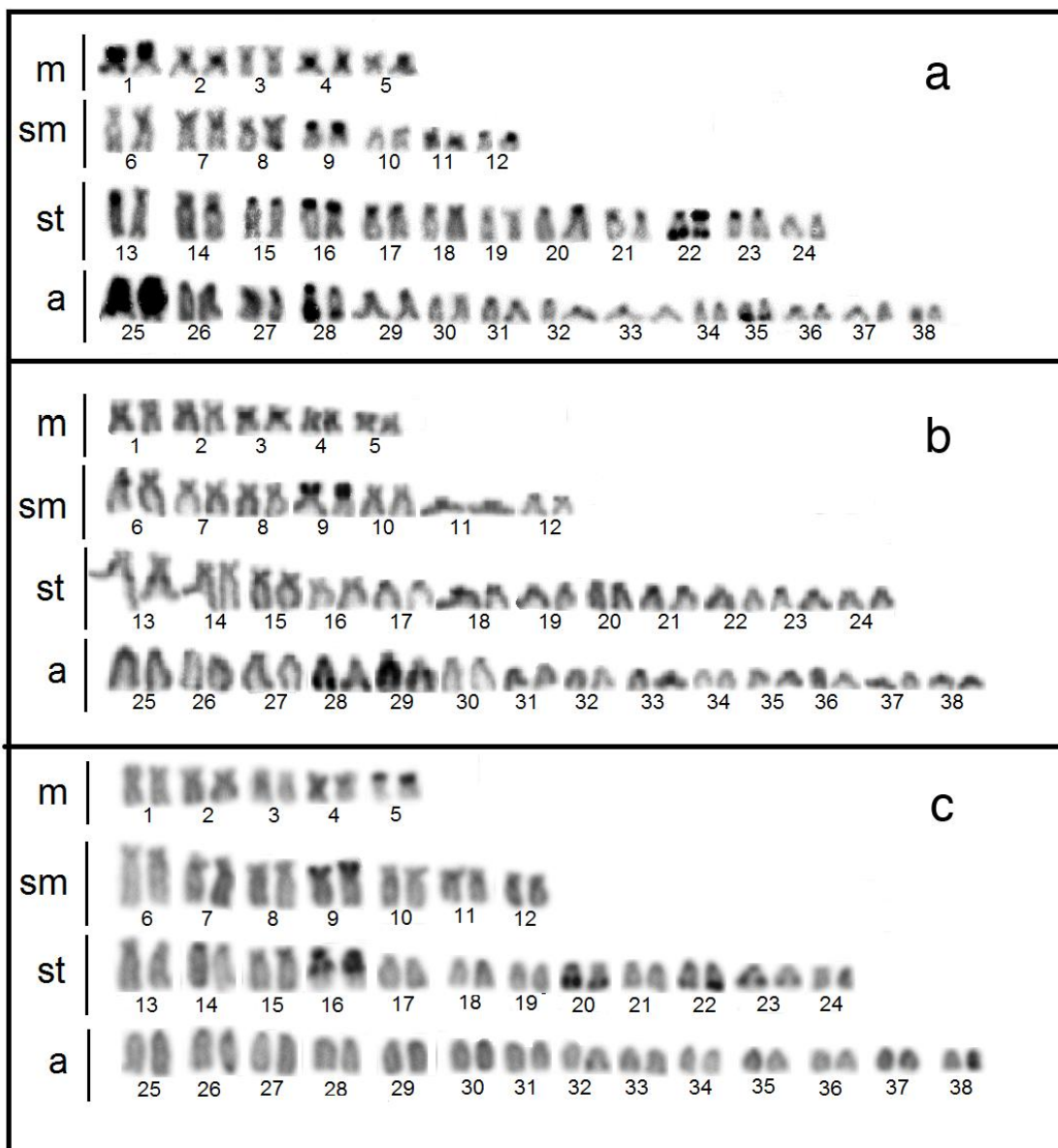


Figura 04 Metáfases de populações de *H. paulinus* submetidas ao bandeamento c. rio Keller (a) rio Mourão (b) e ribeirão Atlântico (c).

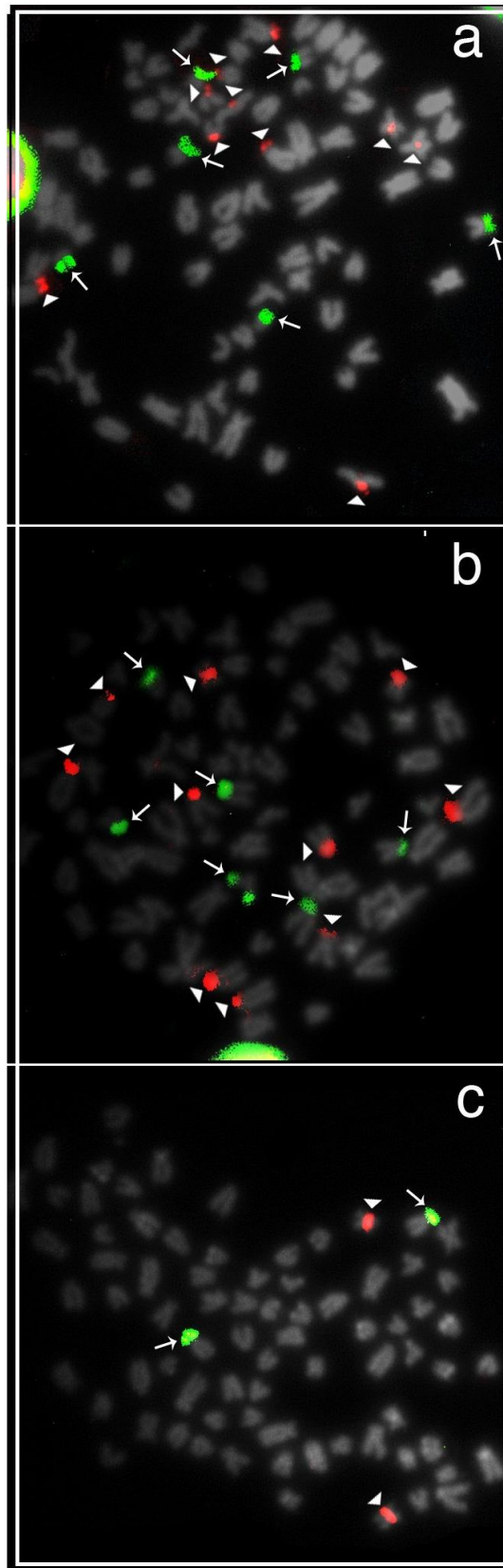


Figura 05 - Double FISH com sonda rDNA 5S (seta) e 18S (cabeça de seta) de *H. paulinus* (a) rio Keller (b) rio Mourão (c) ribeirão Atlântico.

DISCUSSÃO

As três populações analisadas apresentaram o mesmo número diplóide e fórmula cariotípica, contudo, cada uma destas populações apresentou variação em relação ao número e posição das NORs, nos sítios de rDNA 5S e na distribuição da heterocromatina, que permitem caracterizá-las e diferenciá-las.

O número diplóide observado para estas três populações de *H. paulinus* analisados neste trabalho é o mesmo encontrado por Rubert et al., (2011) em população do rio Paranapanema (SP), localidade tipo de *Hypostomus paulinus*, e por Correia (2010) em uma população do rio Tijuco (no estado de Minas Gerais), divergindo na fórmula cariotípica. Por outro lado, o número diplóide obtido para esta espécie por Michele et al. (1977) foi de 74 cromossomos, diferentemente dos demais dados apresentados até o momento. No entanto, a falta de informação sobre localização de NORs, heterocromatina, localidade de coleta e número de depósito em museu ictiológico dificulta a comparação destes dados.

O número diplóide elevado e grande proporção de cromossomos subtelo/acrocêntrico em relação a cromossomos meta/submetacêntricos observados neste trabalho, está de acordo com a maioria das espécies de *Hypostomus* já analisadas citogeneticamente (Bueno et al. 2012). Estes dados reforçam as hipóteses de que número diplóide elevado no gênero é acompanhado de uma maior proporção de cromossomos subtelo/acrocêntricos. (Artoni e Bertollo 2001; Bueno et al. 2012) e a condição de grupo derivado para o *Hypostomus* dentro da família Loricariidae, provavelmente promovida por rearranjos Robertsonianos, uma vez que o número diplóide primitivo sugerido para Loricariidae é de 54 cromossomos (Artoni e Bertollo 2001), encontrado em espécies da subfamília basal Neoplecostominae (Armbruster 2004).

A manutenção no número diplóide e variações cariotípicas microestruturais já foram observadas em várias espécies de *Hypostomus*, como em *H. nigromaculatus* (Rubert et al. 2008; Traldi et al. 2013), *H. topavae* (Bueno et al. 2012; Martinez et al. 2011), *H. regani* (Artoni e Bertollo 1996; Alves et al. 2006), *H. albopunctatus* (Casale et al. 2002; Rubert et al. 2011; Penteado et al. 2009), *H. strigaticeps* (Rubert et al. 2011; Martinez 2009; Baumgärtner et al. 2014), *H. ancistroides* (Artoni e Bertollo 1996; Alves et al. 2006; Michelle et al. 1977; Martinez et al. 2011, Traldi et al. 2013; Endo et al. 2012). Estas variações de fórmulas cariotípicas intraespecíficas em

Hypostomus têm sugerido que existam complexos de espécies, como é o caso de *H. ancistroides* (Endo et al. 2012) e *H. nigromaculatus* (Rubert et al. 2008), derivados por arranjos cromossômicos não-Robertsonianos.

A ocorrência de NOR simples em espécimes do ribeirão Atlântico e NORs múltiplas nos indivíduos dos rios Keller e Mourão constitui outra diferenciação da primeira população em relação as duas últimas citadas. Entretanto, o par 9 (Ag-NOR) revelou-se conservado para as três populações. Em *Hypostomus*, o número e posição de NORs é diversificado, sendo a presença de sistemas de NORs múltiplas mais freqüente, observado em *H. ihering* (Traldi et al. 2012), *Hypostomus cf. topavae* (Martinez et al. 2011), *H. nigromaculatus* (Rubert et al. 2008), *H. albopunctatus* (Artoni e Bertollo 1996) *H. strigaticeps* (Rubert et al. 2011; Endo et al. 2012; Bueno et al. 2012, Baumgärtner et al. 2014) *H. regani* (Bueno et al. 2012; Endo et al. 2012; Rubert et al. 2011; Martinez et al. 2011; Alves et al. 2006) *H. hermani* (Bueno et al. 2012); *H. ancistroides* (Artoni e Bertollo 1996; Alves et al. 2006; Endo et al. 2012; Rubert et al. 2011; Bueno et al. 2012), *Hypostomus* sp c, D1, D2 e E (Artoni e Bertollo 1996). No entanto existem descrições de sistema de NORs simples para o gênero, como observado em *Hypostomus perdido* (Zawa(citado *Hypostomus* sp 2 por Cereali et al. 2008), *Hypostomus cf topavae* (Bueno et al. 2012), *Hypostomus cf wuchereri* (Bitencourt et al. 2011), *H. paulinus* (Rubert et al. 2011) e *H. cochliodon* (Paiva 2011).

A presença de AgNORs em um único par de cromossomo é considerado basal para Loricariidae (Alves et al. 2005), portanto, a ocorrência de NORs múltiplas sugere que possam ter sido originadas a partir de mecanismos de dispersão por rearranjos de translocações não robertsonianas e/ou de elementos transponíveis.

Sítios de NORs localizadas no braço curto do par 9 presente nas três populações sugere uma simplesiomorfia para esta espécie. NORs localizada em um cromossomo submetacêntrico, com marcação no similar a do ao par 9, já foram descritas em várias espécies de *Hypostomus*: *H. ancistroides* (Artoni e Bertollo 1996; Alves et al. 2006; Traldi et al. 2012); *Hypostomus* sp. A e *Hypostomus* sp. F (Artoni e Bertollo 1996) *H. boulengeri* (Paiva 2011). Por análise filogenética de Montoya-Burgos (2003), *H. ancistroides* e *H. boulengeri* são grupos próximos. A população de *H. paulinus* analisada por Rubert et al. (2011) (população da localidade tipo da espécie) também apresentou um único par de cromossomos portadores de NORs, mas do tipo subtelo/acrocêntrico. Embora não seja o mesmo tipo de cromossomo, a condição de sistema de NORs simples é compartilhado por estas duas populações, desta forma, a

população do ribeirão Atlântico analisada neste trabalho apresenta maior semelhança com a localidade tipo, em relação a NORs, que com as populações do Rio Keller e Rio Mourão. Estas análises sugerem que um par submetacêntrico (similar ao par 9) seria o par primitivo portador da NORs nestas populações de *H. paulinus* e eventos de translocações teriam promovido a dispersão destes genes para outros pares. Apesar de Montoya-Burgos (2003) não ter incluído em suas análises filogenéticas *H. paulinus*, esta semelhança em relação ao sistema de NOR simples pode sugerir que *H. paulinus* pertença ao mesmo grupo de *H. ancistroides* e *H. boulengeri*.

Cada uma das três populações analisadas apresentou um padrão distinto de distribuição de heterocromatina, e mesmo as populações do rio Keller e do rio Mourão que apresentaram similaridades nos cromossomos portadores de NORs e sítios rDNA 5S, puderam ser diferenciadas pelo padrão de banda C. A população de *H. paulinus* analisada por Rubert et al (2011) apresentou heterocromatina distribuída na região pericentromérica do primeiro par de cromossomos metacêntricos, na região terminal dos braços longos oito pares de cromossomos subteloacêntricos/acrocêntricos, um dos quais era o par portador da NOR com heterocromatina localizada na porção proximal deste sítio e blocos de heterocromatina ocupando quase todo o braço longo. Já a população de Correia (2010) apresentou heterocromatina em região intersticial e telomérica da maioria dos cromossomos subtelo/acrocêntricos.

Se considerarmos a similaridade do tipo de marcação no par de acrocêntrico com todo o braço longo marcado (25 na população do rio Keller e 29 na população do rio Mourão) com o par subtelo/acrocêntrico apresentado por Rubert et al. (2011), a marcação do primeiro par de cromossomos metacêntricos da população do rio Keller com o primeiro par metacêntrico da população de Rubert et al. (2011), as marcações intersticial de Correia (2010) com os pares encontrados com marcações intersticiais deste estudo (13 na população do rio Mourão e 16 na população do ribeirão Atlântico), podemos considerar que nestas diferentes populações de *H. paulinus* estão ocorrendo eventos de heterocromatinização, amplificação, deleção e mobilidade de blocos heterocromáticos como processos de evolução cariotípica.

A amplificação e mobilidade dos blocos heterocromáticos de cromossomos é um fato bem documentado em alguns organismos (Hamilton et al. 1990; Modi, 1993). Os resultados obtidos neste trabalho nos mostram uma variação microestrutural no cariótipo das três populações e podemos sugerir que estes

eventos podem estar trabalhando no sentido de promover formação de novas espécies, pois já foi verificado que, polimorfismo cromossômico, principalmente envolvendo heterocromatina tem um papel relevante na história evolutiva do gênero *Hypostomus*.

Nas três populações analisadas um par metacêntrico pequeno é portador de sítio intersticial de DNAr 5S. Na população do ribeirão Atlântico esta foi a única marcação. As populações do ribeirão Keller e do rio Mourão apresentaram, além deste par, mais quatro pares portadores destes cístrons ribossômicos. A localização intersticial desses genes é considerada a mais frequente em diversos grupos de peixes (Martins e Galetti Jr 2001). Apesar de haver pouca informação sobre esta característica em *Hypostomus*, o sítio intersticial de DNAr 5S em um par metacêntrico também é constante em espécies de *Hypostomus*, encontrado em *H. regani* (Mendes-Neto et al. 2011), *H. iheringii* (Traldi et al. 2012), *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus*, e *H. tapijara* (Traldi et al. 2013), *H. strigaticeps* (Baumgärtner et al. 2014), mas alguns resultados apontam espécies com vários sítios ribossômicos em algumas espécies: *H. affinis* (Kavalco et al. 2004); *H. strigaticeps* (Baumgärtner et al. 2014), *H. regani* (Mendes-Neto et al. 2011) *H. ancistroides* e *H. tapijara* (Traldi et al. 2013).

Uma explicação para ocorrência de dispersão de regiões heterocromáticas e genes ribossômicos no conjunto de cromossomos parece estar associado com elemento transponíveis. Segundo Dimitri et al. (2009), estas regiões seriam caracterizadas pela presença de sequências de DNA repetitivo e remanescentes de elementos transponíveis. De acordo com Koga et al. (2006), os elementos transponíveis contribuem com a evolução do genoma porque sua atividade de transposição causa mutações e sua natureza repetitiva aumenta a taxa de rearranjos cromossômicos. Sítios ribossômicos podem estar associados com elementos transponíveis os quais, podem promover mudanças de posição destas regiões e assim explicar a alta variação em número e posição de sítios de DNAr 5S em algumas espécies de *Hypostomus* (Pansonato-Alves et al. 2013). Portanto, técnica de hibridização *in situ* com sondas para esses elementos transponíveis, principalmente da família Rex (Rex1, Rex3, Rex6), devem auxiliar no entendimento das variações observadas nas populações analisadas, em relação as regiões heterocromáticas, posições de NORs e sítios de rDNA 5S.

A similaridade da NOR no par 9 para, do par submetacêntrico portador do sítio rDNA 5S e as similaridades de pares com blocos heterocromáticos nestas populações, sugere uma proximidade entre os peixes destas localidades, por terem mantido a mesma localização destes sítios, no entanto pode-se sugerir que eventos evolutivos diversificados estão promovendo rearranjos estruturais no cariótipo e promovendo mudanças que permitem diferenciar cada uma destas populações.

A similaridade cariotípica entre as populações dos rios Keller e Mourão, a despeito da variação no padrão de heterocromatina, se deve provavelmente pelo fato de que estas populações ocorrem em afluentes da mesma bacia, a do rio Ivaí. Enquanto que a população do ribeirão Atlântico (bacia do rio Paranapanema) e população do rio Piracicaba analisada por Rubert et al. (2011) (bacia do rio Tietê) pertencem a dois tributários do lado esquerdo do alto rio Paraná, mais ao norte do que o rio Ivaí. Adicionalmente, os rios Tietê e Paranapanema deságuam no alto rio Paraná sem a presença de uma queda em sua foz, e o rio Ivaí apresenta quedas em seus trechos inferiores separando algumas espécies de peixes que deságuam sem a presença de uma queda. Desta forma os eventos cariotípicos que estão promovendo estas variações microestruturais são distintos para cada bacia.

Podemos considerar que *Hypostomus paulinus* pertence a um grupo derivado dentro da família Hypostominae, por apresentar um número diplóide elevado de 76 cromossomos, com grande proporção de cromossomos subtelo/acrocêntricos em relação a cromossomos meta/ submetacêntricos (68,42%), o que pode ser explicado por rearranjos Robertsonianos, porém a variação microcariotípica intrapopulacional de localização da NOR, nos sítios de rDNA 5S e na distribuição de heterocromatina não pode ser explicado por estes arranjos, mas por rearranjos não-Robertsonianas. Portanto vários eventos evolutivos estão contribuindo para a evolução divergente deste grupo de *Hypostomus*.

A diferenciação na microestrutru evidenciada no padrão de banda C e na localização da NOR pode sugerir que *H. paulinus* nas diferentes populações analisadas neste trabalho, estejam passando por mecanismos de evolução cromossômica, sendo a constituição cariotípica da população do ribeirão Atlântico sugerida como primitiva, por apresentar características ancestrais dentro de Loricariidade e as populações do rio Keller e rio Mourão, seriam derivadas por mecanismos divergentes de evolução cariotípica.

REFERÊNCIAS

- 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
- Arai R (2011) *Fish Karyotypes: A Check List Japan*: Springer
- 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. *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 fish, 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
- Baumgärtner L, Paiz LM, Zawadzki CH, Margarido VP, Portela-Castro ALB (2014) Heterochromatin Polymorphism and Physical Mapping of 5S and 18S Ribosomal DNA in Four Populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: Evolutionary and Environmental Correlation. *Zebra Fish* 11(5): 479-487
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1:103–120
- Bitencourt JA, Affonso PRAM, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) Heterochromatin heterogeneity in *Hypostomus prope unae* (Steindachner, 1978) (Siluriformes, Loricariidae) from Northeastern Brazil. *Comp Cytogenet* 5:329–344
- Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP (2012) Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthys, Loricariidae): a new perspective

about the correlation between diploid number and chromosome types. Rev Fish Biol Fish 22: 241–250

Bueno V, Venere PC, Zawadzki CH, Margarido VP (2013) Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. Rev Fish Biol Fish 23: 103–112

Casale VC, Tchaicka L, Pegoraro JL, Margarido VP (2002) Relações filogenéticas em quatro espécies de *Hypostomus* (Pisces, siluriformes, Loricariidae) baseado em análise citogenética, dados de isoenzimas e coloração de corpo. IX Simpósio de citogenética e genética de peixes Maringá Pr.

Cereali SS (2006) Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina

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

Correia VCS (2010) Estudos citogenéticos de seis espécies da família Loricariidae (Siluriformes) pertencentes a bacias do rio Paranaíba e Tocantins. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia

Cuadrado A, Jouve N (1994) Mapping and organization of highly repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-Triticale. Chromosome Research 2: 231-338

Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G, Biamonti G (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. Chromosoma 118:419–435

Endo KS, Martinez ERM, Zawadzki CH, Paiva LRS, Júlio-Jr HF (2012) Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. Acta Scientiarum 34:181–189

Ferraris CJ (2007) Check list of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. Zoo taxa 1418:1–628

Froese R, Pauly D (2014) Fish Base. World Wide Web electronic publication 2014. www.fishbase.org/Summary/FamilySummary.php?ID=157 (Accessed 18 december 2014)

Hamilton MJ, Honeycutt RL, Baker RJ (1990) Intragenomic movement sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from *in situ* hybridization. *Chromosoma* 99: 321-329.

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

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher K, Anamthaw-Jónsson AR, Leitch MS, Leitch IJ (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique J. Methods cellular and molecular Biology* 3: 109-116
Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: AI-step method. *Experientia* 36:1014–1015

Jerep FC, Shibatta OA, Zawadzki CHA (2007) new species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes:Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 5 (4): 435-442

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

Koga A, Lida A, Hori H, Shimada A, Shima A (2006) Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: the medaka fish Tol2 element contributes to genetic variation without recognizable traces. *Mol Biol Evol* 23:1414-1419

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

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2009) Propidium iodide forming heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem* 87: 433–438

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

Martins C, Galetti Jr PM (2000) Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* 8:353–355

Martins C, Galetti-Jr PM (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* 111:439–446

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

Martinez ERM, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C (2011) Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). Genet Mol Biol 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*. Comp Cytogenet 5:133–142

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

Modi WS (1993) Comparative analysis of heterochromatin in *Microtus*: sequence heterogeneity and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. Cytogenetics and cell genetics 62: 142-148.

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

Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Brazilian Journal of Genetics 14:331-357

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

Paiva S (2011) Estudos citogenéticos e aloenzimáticos do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraná e Paraguai. Tese, Universidade Estadual de Maringá

Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F (2013) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. Rev Fish Biol Fisheries 23:477–489

Penteado PR, Brandão KO, Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF (2009) Diversidade cromossômica e distribuição de heterocromatina constitutiva no gênero *Hypostomus* (Siluriformes Loricariidae). XIII Simpósio de citogenética e genética de peixes. Ponta Grossa PR 105p

- Pinkel D, Sraume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938
- Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JH (2006) Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zool J Linn Soc* 147(2): 277-299
- Rubert M, Zawadzki CH, Giuliano-Caetano L (2008) Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neot Ichth* 6:93–100
- Rubert M, Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC, Giuliano-Caetano L (2011) Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comp Cytogenet* 5:397–410
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*; 75:304–306
- Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, Artoni RF, Moreira-Filho O (2012) First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comp Cytogenet* 6:115–125
- Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, Artoni RF, Moreira-Filho O (2013) Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res* 12 (1): 463-471
- Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* 31: 173-179
- Weber C. (2003) Subfamily Hypostominae In: Reis RE, Kullander SO, JR CJF Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre: Edipucrs, p. 351-372
- Zawadzki CH, Renesto E, Reis RE, Moura MO, Mateus RP (2005) Allozyme relationships in Hypostominae (Teleostei:Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica* 123:271–283
- Zawadzki CH, Renesto E, Peres MD, Paiva S (2008) Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905)

(Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31 (3): 767-771

Zawadzki CH, Weber C, Pavaneli CS (2010) A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriforme: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. *Neot Ichthyol* 8:719-725

Zawadzki CH, Tencatt LFC, Froehlich O (2014) A new uniscuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes:Loricariidae) from the rio Paraguai basin. *Neot Ichthyol* 12:97–104