

**SUZANA DE PAIVA**

**Estudos citogenéticos e aloenzimáticos do gênero *Hypostomus*  
(Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraná e Paraguai**

**Maringá  
Maio – 2011**

**SUZANA DE PAIVA**

**Estudos citogenéticos e aloenzimáticos do gênero *Hypostomus*  
(Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraná e Paraguai**

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 Doutora em Ciências Biológicas.

**Maringá  
Maio – 2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Paiva, Suzana  
P149e Estudos citogenéticos e aloenzimáticos do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraná e Paraguai / Suzana Paiva. -- Maringá, 2011.  
vii, 81 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Martins dos Santos.  
Coorientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2011.

1. *Hypostomus* - Bacia do Rio Paraná - Análise citogênica. 2. *Hypostomus* - Bacia do Rio Paraguai - Análise citogenética. I. Santos, Isabel Cristina Martins dos, orient. II. Renesto, Erasmo, coorient. III. Zawadzki, Cláudio Henrique, coorient. IV. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). V. Título.

CDD 31.ed. 579.135

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

**ATA DE DEFESA DA TESE DE DOUTORADO  
DA ALUNA SUZANA DE PAIVA**

Aos vinte e sete dias do mês de maio de dois mil e onze, sexta-feira, realizou-se no Auditório do bloco H-90, no campus universitário, a sessão pública de defesa da tese intitulada: “ESTUDOS CITOGENÉTICOS E ALOENZIMÁTICOS DO GÊNERO *Hypostomus* (SILURIFOMES, LORICARIIDAE) DAS BACIAS DOS RIOS PARANÁ E PARAGUAI”, apresentada pela aluna Suzana de Paiva, licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá, que concluiu os créditos exigidos para obtenção do grau de “Doutor em Ciências Biológicas”. Os trabalhos foram instalados às 14 horas, pelo Prof. Dr. Erasmo Renesto, Presidente da Banca Examinadora, constituída pelos seguintes membros: Dr.ª Lucia Giuliano Caetano, Dr.ª Luciana Andreia Borin, Dr.ª Ana Luiza de Brito Portela Castro e Dr.ª Maria de Fátima Pires da Silva Machado. A Banca Examinadora, tendo se decidido a aceitar a tese, passou à arguição pública da candidata. Encerrados os trabalhos de arguição às 18 horas, os examinadores deram parecer final, considerando a tese aprovada. Proclamado o resultado pelo Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Maringá, 27 de maio de 2011.



Prof. Dr. Erasmo Renesto



Prof.ª Dr.ª Lucia Giuliano Caetano



Prof.ª Dr.ª Luciana Andreia Borin



Prof.ª Dr.ª Ana Luiza de Brito Portela Castro



Prof.ª Dr.ª Maria de Fátima Pires da Silva Machado

## **BIOGRAFIA**

Suzana de Paiva nasceu em 10 de outubro de 1977, em Apucarana, Paraná.

Em março de 1999, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, realizando estágio pelo Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupelia) em eletroforese de isoenzimas de peixes e participando entre outras atividades, de projetos de pesquisa e iniciação científica. Ao final do ano letivo de 2003 obteve o título de licenciada em Ciências Biológicas pela referida instituição.

Em abril de 2004, entrou para o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá e obteve a titulação de mestre em dezembro de 2006. No ano seguinte iniciou o doutorado na mesma instituição, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

*Dedico*  
*aos meus pais,*  
*irmãos e sobrinhos,*  
*sem eles eu nada seria...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por mais uma vez me dar esperança, coragem e força para ultrapassar todos os obstáculos de mais esta caminhada.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de pesquisa. O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.

A professora Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Martins dos Santos, por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos, pela compreensão, confiança, muita paciência e amizade, que construímos ao longo desses quatro anos.

Ao professor Dr. Erasmo Renesto pela coorientação, confiança, paciência, amizade e convivência desde a graduação.

Ao Dr. Cláudio H. Zawadzki pela coorientação, coletas, identificações, sugestões, críticas, amizade e convivência também desde os primeiros anos da graduação.

As professoras Dr<sup>a</sup>. Ana Luiza Portela Castro e Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki por sempre tirar dúvidas inesperadas, pelas conversas e amizade.

Aos professores da UEMS (Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul - Campus de Coxim) professora Dr<sup>a</sup>. Margarida M. R. Vieira por ceder seu laboratório para parte dos experimentos e o professor Msc. Giovane Cândido da Silva pela atenção e ajuda nas coletas em Coxim.

As professoras Dr<sup>a</sup>. Claudete Aparecida Mangolin e Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima da Silva Machado pelo uso do laboratório, equipamentos e pela convivência.

Ao secretário da pós-graduação, Nelsino Nogai, pelos bate-papos, ajuda e pela sua amizade.

Aos funcionários da biblioteca setorial do Nupelia, pela atenção e confiança.

Aos motoristas da UEM; Valdenir, pela grande ajuda em nossa estadia em Coxim, Celso e Valmir pela companhia e ajuda nas viagens.

Aos amigos dos laboratórios de Eletroforese Vegetal e Animal - DBC, pela convivência e amizade: Ana Luiza, Aline, Davis, Henrique, Ana Clara e Eliane.

Aos amigos Beto, Witer e Carlos pela ajuda com as coletas e pela amizade.

Aos amigos Paulo, Ana Luiza, Flávio e Cláudio pela companhia nas viagens e eventos científicos.

A amiga Kátia Kern pela ajuda com as questões burocráticas, pelo carinho e amizade.

Aos amigos de laboratório Carla, Lígia, Greicy, Lucas, Marcos, Renan, Layon, Marcia, Luciana, Leonardo, Luciene, Treco, Paula e Bibiana pela ajuda, convivência e amizade; em especial as amigas Patrícia, Maria José e Renata por seus conselhos, carinho, compreensão e a amizade.

Aos estagiários: Paulo (Cabeção) pela ajuda com as coletas, análises, paciência e amizade inabalável; Ana Camila (Cami) pela ajuda nas análises, pela sua humildade e amizade; Flávio (um verdadeiro anjo enviado por Deus) que me ajudou imensamente com as eletroforeses, suportou meus dias de mau humor e rimos muito de tudo isso, e por sua sincera amizade.

À super amiga Fernanda pelas conversas, inúmeros favores, pela paciência, compreensão, apoio, grande companhia nas coletas, pelas inúmeras risadas e sua grande amizade.

À amiga Ana Paula pela compreensão, paciência em me dar conselhos, pela ajuda nos momentos mais difíceis, favores e pela amizade de irmã.

Ao tio Zé, tia Graça, Joselaine e Priscila pela ajuda com as coletas no ribeirão Cambira e pelo carinho.

Aos meus pais, Divino e Terezinha, e meus irmãos, Rosilene e Rosinaldo, que tanto amo, pelo incentivo e ajuda incondicional para minha formação profissional e pelo amor que sempre me deram.

Aos meus amores Bruno e Fernandinho, que alegram e iluminam minha vida.

A todos os demais amigos, familiares, professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	9
RESUMO GERAL.....	10
GENERAL ABSTRACT.....	12
CAPÍTULO I Análise citogenética e aloenzimática de duas espécies de <i>Hypostomus</i> (Siluriformes: Loricariidae), da Bacia do Alto Paraguai, MS.....	14
RESUMO.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
Citogenética.....	20
Isoenzimas.....	20
RESULTADOS.....	21
Citogenética.....	21
Isoenzimas.....	22
DISCUSSÃO.....	23
Citogenética.....	23
Isoenzimas.....	26
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO II Estudos citogenéticos e aloenzimáticos de três populações de <i>Hypostomus ancistroides</i> (Loricariidae: Hypostominae), da bacia do alto rio Paraná... 46	46
RESUMO.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
Citogenética.....	51
Isoenzimas.....	51
RESULTADOS.....	52
Análise citogenética.....	52
Análise Aloenzimática.....	53
DISCUSSÃO.....	53
Citogenética.....	53
Isoenzimas.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
Anexos.....	68

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta por dois artigos, os quais foram concluídos a partir de estudos citogenéticos e aloenzimáticos de espécies do gênero *Hypostomus*: *H. boulengeri* e *H. cochliodon* (córrego Onça) da Bacia do Alto Paraguai; três populações de *H. ancistroides*, (córrego Jurumirim, bacia do rio Tietê; ribeirão Cambira, bacia do rio Ivaí; córrego Tauá, bacia do rio Pirapó), pertencentes à bacia do alto rio Paraná. Cada artigo está diagramado de acordo com as normas da revista a qual será submetido para publicação.

**Capítulo I - Análise citogenética e aloenzimática de duas espécies de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), da Bacia do Alto Paraguai, MS.** Suzana de Paiva, Erasmo Renesto, Cláudio H. Zawadzki, Flávio J. Codognoto, Fernanda E. Porto, Margarida M. R. Vieira e Isabel C. Martins dos Santos. Este artigo será submetido à apreciação da revista *Genetica*.

**Capítulo II - Estudos citogenéticos e aloenzimáticos de três populações de *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae: Hypostominae) da bacia do alto rio Paraná.** Suzana de Paiva, Erasmo Renesto, Cláudio H. Zawadzki, Flávio J. Codognoto, Paulo E. B. Ferreira, Ana Camila Prizon e Isabel C. Martins dos Santos. Este artigo será submetido à apreciação da revista *Genetics and Molecular Biology*.

## RESUMO

O gênero *Hypostomus* é o mais especioso da família Loricariidae, apresentando mais de 120 espécies descritas. Possui uma sistemática confusa devido à presença de uma ampla variação na sua morfologia e padrão de cores, o que dificulta a identificação de muitas espécies. Problemas de identificação também são verificados para os *Hypostomus* da região do Pantanal. Dentre as poucas espécies deste gênero identificadas para esta região estão *H. boulengeri* e *H. cochliodon*, as quais são amplamente distribuídas ao longo da bacia do rio Paraguai. Por sua vez, *H. ancistroides* é encontrado em toda a bacia do alto rio Paraná, e sua grande variação cariotípica desperta o interesse na investigação de suas populações.

Os estudos citogenéticos no gênero *Hypostomus*, têm evidenciado variações quanto ao número cromossômico, fórmula cariotípica, padrões de NOR e banda C, enquanto a eletroforese de isoenzimas tem contribuído com a identificação de marcadores bioquímicos e na análise da variabilidade genética para este grupo. Desta forma, propomos o estudo de *H. boulengeri* e *H. cochliodon* da região próxima ao Pantanal (bacia do Alto Paraguai) e de três populações de *H. ancistroides* (bacias do rio Tietê, rio Ivaí e rio Pirapó pertencentes à bacia do alto rio Paraná), através de análises citogenéticas e aloenzimáticas com o objetivo de verificar os respectivos padrões citogenéticos e genético bioquímico que possam auxiliar na identificação dos espécimes deste grupo, além de estimar sua variabilidade genética.

Através da análise citogenética foi avaliada a fórmula cariotípica, o número fundamental e o padrão de NOR, pela coloração com nitrato de prata nas cinco populações de *Hypostomus* coletadas, além de evidenciar a distribuição da heterocromatina constitutiva e as regiões organizadoras de nucléolos em *H. boulengeri* e *H. cochliodon* através do FISH (hibridização fluorescente *in situ*) com sonda 18S. Exemplares das cinco populações tiveram nove sistemas enzimáticos analisados (AAT, ACP, ADH, GDH, G3PDH, GPI, IDH, MDH e SOD) pela eletroforese horizontal em gel de amido, e para as populações de *H. ancistroide* também foi avaliada a isoenzima lactato desidrogenase (LDH).

A análise citogenética mostrou número diplóide de 68 cromossomos e fórmula cariotípica de  $14m+14sm+22st+18a$  para *H. boulengeri* e 64 cromossomos distribuídos em  $16m+24sm+16st+8a$  para *H. cochliodon*. *Hypostomus boulengeri* apresentou NOR múltipla (até oito cromossomos marcados) e cinco padrões de banda C. Enquanto *H.*

*cochliodon* revelou NOR simples e a heterocromatina distribuída nas regiões pericentroméricas e braço curto de alguns cromossomos. A eletroforese de isoenzimas revelou dois locos diagnósticos (Idh-A e Gdh-A) entre as duas populações, além de vários locos (Aat-A, Adh-A, Gpi-B, G3pdh-A, G3pdh-B, Idh-A e Idh-B) com alelos exclusivos para *H. boulengeri*. A variabilidade genética indicada pelo valor da heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) foi de 0,2461 para *H. boulengeri* e 0,0309 para *H. cochliodon*. Os dados sugerem uma maior variação citogenética e aloenzimática para *H. boulengeri*.

As populações de *H. ancistroides* revelaram o mesmo número diplóide ( $2n=68$ ). No entanto, as fórmulas cariotípicas variaram de  $16m+20sm+10st+22a$  para a população do córrego Jurumirim,  $14m+14sm+16st+24a$  para a do ribeirão Cambira e  $16m+18sm+10st+24a$  para a do córrego Tauá. A NOR apareceu no braço curto de três pares de cromossomos, porém o padrão foi distinto para as três populações de *H. ancistroides*. Desta forma, os dados citogenéticos corroboraram com os da literatura, que revelam uma ampla variação tanto nas fórmulas cariotípicas, quanto nas marcações de NOR para populações desta espécie. A variabilidade genética para as três populações foi baixa em relação à média calculada para peixes ( $H_e = 0,051$ ). A presença de locos diagnósticos para a população do ribeirão Cambira (Idh-A) e do córrego Tauá (Gpi-B, G3pdh-A), além dos alelos exclusivos, Adh-A-*b* e G3pdh-B-*b* para a população do córrego Tauá, Ldh-A-*b* para a do ribeirão Cambira e Idh-B-*a* para a do córrego Jurumirim, indicaram uma distinção genética entre as populações analisadas, sugerindo a presença de marcadores populacionais.

Os dados citogenéticos e aloenzimáticos evidenciados neste trabalho contribuíram para o conhecimento da variação cromossômica e gênica dos *Hypostomus* das bacias do rio Paraguai e do alto rio Paraná, bem como para auxiliar na diferenciação das espécies deste gênero.

Palavras-chaves: *Hypostomus*, variação cromossômica, aloenzimas, variabilidade genética.

## ABSTRACT

*Hypostomus* is the most species-rich genus of the Loricariidae family, with more than 120 nominal species. It has a complex taxonomy due to the presence of a wide variation in their morphology and color pattern, which usually hinders species identification. Identification problems are also checked for the *Hypostomus* species of the Pantanal. Among the few species identified to species level for this region there are *H. boulengeri* and *H. cochliodon*, which are widely distributed throughout the Paraguay River basin. Meanwhile, in the upper Paraná River basin, *H. ancistroides*, which is also widely distributed, is easily found, and its wide karyotypic variation addresses the interest in the investigation of further populations.

Cytogenetic studies have shown in the genus *Hypostomus*, variations in the number and patterns of chromosomal NOR and C-band. While isoenzyme analysis have contributed to the identification of biochemical markers and analysis of genetic variability for this group.

Thus, we propose the study of *H. boulengeri* and *H. cochliodon* of the Pantanal (middle Paraguay river basin) and three populations of *H. ancistroides* (Tietê river basin, Ivaí river and Pirapó river) through cytogenetic and allozyme analysis in order to verify their biochemical and cytogenetic patterns in order to help in identification of specimens of this group, and to evaluate their genetic variability.

Cytogenetic analysis evaluated the karyotype structure, the fundamental number and the pattern of NOR stainings with silver nitrate in five populations of *Hypostomus* collected, in addition to showing the distribution of constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions in *H. boulengeri* and *H. cochliodon* by FISH (fluorescent in situ hybridization). Specimens from the five populations had nine enzyme systems (AAT, ACP, ADH, GDH, G3PDH, GPI, IDH, MDH and SOD) analyzed by horizontal electrophoresis in starch gel. For the populations of the upper Paraná river basin was also evaluated isoenzyme Lactate dehydrogenase (LDH).

Cytogenetic analysis revealed 68 diploid number and karyotypic formula of  $14m+14sm+18st+22a$  in *H. boulengeri* and distributed in 64 chromosomes  $16m+26sm+14st+8a$  in *H. cochliodon*. *Hypostomus boulengeri* showed multiple NOR (up to eight stained chromosomes) and five C-band patterns. *Hypostomus cochliodon* presented simple NOR and heterochromatin distributed in pericentromeric regions and in the short arm of some chromosomes. The isoenzyme analysis revealed two loci

diagnoses (Idh-A and GDH-A) between the two populations and loci with multiple alleles (Aat-A, Adh-A, Gpi-B, G3pdh-A, G3pdh-B, Idh-A and Idh-B) for *H. boulengeri*. The genetic variability indicated by the value of the average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.2461 for *H. boulengeri* and 0.0309 for *H. cochliodon*. The data suggest a high cytogenetic and allozyme variation in *H. boulengeri*.

The populations assigned to *H. ancistroides* showed the same diploid number ( $2n = 68$ ). However, the karyotypic formulas ranged from  $16m+20sm+10st+22a$  for population Jurumirim stream,  $14m+14sm+16st+24a$  for the stream Cambira and  $16m+18sm+10st+24a$  for the Tauá. NOR appeared on the short arm of three pairs of chromosomes, but at least one distinct type of chromosome in each population. Thus, the cytogenetic data corroborated with the literature, which show a wide variation in both karyotypic formulas, as the markings of NOR for populations of this species. The genetic variability for the three populations was lower in the average calculated for fish ( $H_e = 0.051$ ). However, the presence of diagnostic loci for the population of Cambira stream (Idh-A) and Tauá (Gpi-B, G3pdh-A) in addition to alleles, Adh-A-*b* and G3pdh-B-*b* for the population of Tauá, Ldh-A-*b* to the Cambira stream and Idh-B-*a* to Jurumirim stream indicated a genetic distinction among analyzed populations, suggesting they are different species.

Cytogenetic and allozyme evidenced in this study contribute to knowledge of genetic and chromosomal variation and for the differentiation of species of the genus *Hypostomus*. In addition, these tests allow us to propose the existence of a probable species complex in *H. ancistroides*.

Keywords: *Hypostomus*, chromosomal variation, allozymes, genetic variability.

## **CAPÍTULO I**

**Análise citogenética e aloenzimática de duas espécies de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), da Bacia do Alto Paraguai, MS**

**Análise citogenética e aloenzimática de duas espécies de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), da Bacia do Alto Paraguai, MS**

Suzana de Paiva<sup>1</sup>, Erasmo Renesto<sup>1,2</sup>, Cláudio H. Zawadzki<sup>2,3</sup>, Flávio J. Codognoto<sup>1</sup>,  
Fernanda E. Porto<sup>1</sup>, Margarida M. R. Vieira<sup>4</sup> e Isabel C. Martins dos Santos<sup>1</sup>

1 Universidade Estadual de Maringá (UEM); Departamento de Biologia Celular e Genética (DBC). Av. Colombo, 5.790. Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900.  
e-mail: suzanapaiva@yahoo.com.br

2 Universidade Estadual de Maringá (UEM); Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia). Av. Colombo, 5.790. Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900.

3 Universidade Estadual de Maringá (UEM); Departamento de Biologia (DBI). Av. Colombo, 5.790. Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900.

4 Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS); Unidade Universitária de Coxim. Rua General Mendes de Moraes, 370; Coxim, Mato Grosso do Sul, Brasil. CEP 79400-000.

## RESUMO

*Hypostomus boulengeri* e *H. cochliodon* estão entre as poucas espécies do gênero *Hypostomus* identificadas para a região do Pantanal. Estudos genéticos para peixes desta região e próximos a ela são escassos. Desta forma, é proposto no presente trabalho uma análise citogenética e aloenzimática, a fim de contribuir para caracterização cromossômica e gênica, bem como analisar a variabilidade genética destas duas espécies de *Hypostomus*. A partir da análise citogenética foi evidenciado o número cromossômico de  $2n = 68$  e fórmula cariotípica de  $14m+14sm+18st+22a$  em *H. boulengeri* e  $2n = 64$  cromossomos distribuídos em  $16m+26sm+14st+8a$  em *H. cochliodon*. *Hypostomus boulengeri* apresentou NOR múltipla com até oito cromossomos marcados e cinco padrões de bandeamento C. Enquanto que em *H. cochliodon* a NOR foi simples e revelou um único padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. A eletroforese de isoenzimas identificou dois locos diagnósticos (Idh-A e Gdh-A) entre as duas espécies, além de vários locos com alelos exclusivos (Aat-A-a, Aat-A-b, Adh-A-b, Adh-A-c, Gpi-B-a, Gpi-B-d, G3pdh-A-b, G3pdh-A-c, G3pdh-B-b e Idh-B-a) para *H. boulengeri*. A variabilidade genética indicada pelo valor da heterozigosidade média ( $H_e$ ) foi de 0,2461 e 0,0309, para *H. boulengeri* e *H. cochliodon*, respectivamente. Os dados sugerem uma maior variação citogenética e aloenzimática para *H. boulengeri*.

## INTRODUÇÃO

A bacia do rio Paraguai abrange uma área de 1.095.000 km<sup>2</sup> que incluem parte dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, no Brasil, e parte dos territórios da Argentina, da Bolívia e do Paraguai. A região conhecida como Bacia do Alto Paraguai (BAP) apresenta 362.376 km<sup>2</sup> e é formada pela planície Pantaneira, que compreende uma das maiores áreas úmidas da Terra (214.802 km<sup>2</sup>) (Brasil 2004), e por planaltos adjacentes (147.574 km<sup>2</sup>). Nestes planaltos estão localizadas as nascentes dos rios que formam o Pantanal (Galdino e Vieira 2006), dentre os quais se destaca o rio Taquari, o qual apresenta um gigantesco leque aluvial de 55.509 km<sup>2</sup>, um dos maiores do mundo, correspondendo a 36% deste bioma (Brasil, 1982 apud Galdino e Vieira 2006).

A região do Pantanal engloba uma ictiofauna muito diversificada, composta por aproximadamente 270 espécies, sendo 105 da ordem Siluriformes. Dentre aquelas pertencentes à família Loricariidae, são conhecidas dez do gênero *Hypostomus* (Britski et al. 2007), com *Hypostomus boulengeri* e *Hypostomus cochliodon* entre as espécies identificadas para esta região e já descritas na literatura. A distribuição de *H. boulengeri* é restrita a bacia do rio Paraguai, enquanto *H. cochliodon* é encontrado também na bacia do médio (Weber 2003) e alto rio Paraná (Zawadzki et al. 2005). *Hypostomus cochliodon* representa uma das 19 espécies válidas do grupo *Hypostomus cochliodon* (Armbruster 2003; Hollanda-Carvalho e Weber 2004; Armbruster e de Souza 2005; Hollanda-Carvalho et al. 2010), sendo a maioria delas (15) encontradas na bacia Amazônica. Os indivíduos deste grupo são caracterizados pela presença de poucos dentes, em forma de colher e ângulo entre os dentários menor que 80° (Hollanda-Carvalho et al. 2010). *Hypostomus boulengeri*, por sua vez, está incluído no grupo *Hypostomus plecostomus* caracterizado por Müller e Weber (1992) por apresentar poucos dentes (20 a 40) delgados e bífidos. No entanto, o gênero *Hypostomus* apresenta

várias espécies com *status* ainda não definido (Weber 2003), principalmente para aquelas que vivem em rios brasileiros.

Poucas espécies de peixes Siluriformes da BAP foram caracterizadas citogeneticamente: *Pimelodus argenteus*, *P. misteriosus*, *P. maculatus* (Souza et al. 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (Swarca et al. 2005), *Liposarcus anisitsi* (Alves et al. 2006), *Hypostomus* sp 2 - Córrego Salobrinha NUP 4249, *Hypostomus* sp 3 - Rio Perdido NUP 4247 (Cereali et al. 2008), *Farlowella amazona*, *Loricaria* sp., *Pyxiloricaria menezes*, *Sturisoma robustum* (Gindri 2009), *Ancistrus cuiabae* (Mariotto et al. 2009), *A. claro*, *A. cf. dubius*, *Ancistrus* sp. 1, *Ancistrus* sp. 3, *Ancistrus* sp. 4, *Ancistrus* sp. 8, *Ancistrus* sp. 10, *Ancistrus* sp. 11 e *Ancistrus* sp. 12 (Mariotto 2008).

Já as análises aloenzimáticas para a bacia supracitada, são restritas a populações de *H. boulengeri*, *H. cochliodon*, *H. latifrons*, *H. regani*, *H. cf. latirostris*, *Hypostomus* sp. 1, *Hypostomus* sp. 2, *Hypostomus* sp. 3 e *Pterygoplichthys anisitsi* dos rios Manso e Cuiabá e reservatório de Manso (Renesto et al. 2007).

Os trabalhos de citogenética envolvendo o gênero *Hypostomus* demonstram uma ampla diversidade no número diplóide entre as espécies analisadas, variando de 52 (Artoni e Bertollo 2001) a 84 cromossomos (Cereali et al. 2008). Variações cariotípicas, tanto macro quanto microestruturais, também são encontradas. Dentre as macroestruturais estão modificações nas fórmulas cariotípicas que são, na maioria das vezes, distintas entre as populações de uma mesma espécie. Já entre as variações microestruturais, se destaca aquelas relacionadas às Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs ou NORs), as quais abrangem de um a quatro pares de cromossomos (Artoni e Bertollo 2001; Alves et al. 2006; Rubert et al. 2008) e as regiões de heterocromatina, com algumas espécies apresentando blocos conspícuos marcados pela técnica de banda C e outras que revelam principalmente marcações teloméricas.

Estudos a partir da eletroforese de isoenzimas entre espécies de *Hypostomus* foram realizados, principalmente, em exemplares que vivem em rios e riachos da bacia do rio Paraná (Zawadzki et al. 1999; Zawadzki et al. 2002; Zawadzki et al. 2004; Paiva et al. 2005; Paiva 2006; Zawadzki et al. 2008a; Ito et al. 2009), contribuindo para a avaliação da variabilidade genética das populações, identificação de novas espécies, distinção entre as espécies já descritas, bem como, na inferência de relações filogenéticas das espécies que vivem nesta região. Estes dados contribuem de forma expressiva, visto que, a sistemática deste gênero para a bacia do rio Paraná também representa um assunto complexo (Zawadzki et al. 2005) devido, entre outros aspectos, a uma ampla variação de caracteres morfológicos como o número de placas dérmicas, dentes e padrão de coloração (Gosline 1947 apud Zawadzki et al. 2001).

Diante desses dados, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar citogeneticamente *H. boulengeri* e *H. cochliodon* do rio Taquari, um dos rios formadores do Pantanal, a fim de contribuir para a identificação citotaxônomica dos membros deste gênero. Além de estimar a variabilidade genética destas duas populações através da análise de algumas aloenzimas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

As coletas dos espécimes de *H. boulengeri* (Figura 1a) e *H. cochliodon* (Figura 1b) foram realizadas no córrego Onça, afluente do rio Taquari, um dos principais rios formadores do Pantanal, Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso do Sul (18°30'S, 54°40'W e 18°32'S, 51°25'W). Exemplares das duas espécies foram depositados na coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## **Citogenética**

As análises citogenéticas foram realizadas em 10 espécimes de *H. Boulengeri* (3 machos; 5 fêmeas; 2 não identificados) e 16 de *H. Cochliodon* (7 machos; 8 fêmeas; 1 não identificado). As preparações dos cromossomos mitóticos foram obtidas de células do rim, conforme a técnica descrita por Bertollo et al. (1978). O padrão da heterocromatina constitutiva foi caracterizado de acordo com a técnica de banda C de Sumner (1972) e corado com Giemsa ou iodeto de propídio. As regiões organizadoras do nucléolo foram detectadas pelo método de impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) (Howell e Black 1980) e pela técnica de Híbridação *In Situ* Fluorescente (FISH), utilizando sondas de DNA r 18S, seguindo a metodologia descrita por Pinkel et al. (1986), com modificações. Os cromossomos foram identificados de acordo com os critérios de rela o de braços (RB), proposto por Levan et al. (1964) e classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a). Para o cálculo do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados portadores de dois braços, enquanto os acrocêntricos, portadores de um braço.

## **Isoenzimas**

Amostras de músculo, fígado e cora o foram coletadas e conservadas a baixa temperatura (-20 C). Os géis de amido (15%) foram preparados utilizando três sistemas tampão distintos: Tris-Borato-EDTA (TBE), pH 8,6 (Boyer et al. 1963), Tris-Citrato (TC), pH 7,0 (Shaw e Prasad 1970) e Tris-EDTA-Maleato (TEM), pH 7,4 (Murphy et al. 1996), cada um específico para os diferentes sistemas enzimáticos e tecidos trabalhados (Tabela 1). As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5 e centrifugadas à 25.000 rpm por 30 minutos,   baixa temperatura. O sobrenadante (extrato proteico) foi aplicado no gel, e em seguida,

submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração. Após a eletroforese, os géis foram fatiados e incubados em soluções histoquímicas específicas (Murphy et al. 1996). Os sistemas enzimáticos analisados estão descritos na Tabela 1. A interpretação genética dos zimogramas foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). Os dados foram analisados no programa Popgene 1.31 (Yeh et al. 1999).

## RESULTADOS

### Citogenética

A população de *H. Boulengeri* apresentou número diplóide de 68 cromossomos, fórmula cariotípica com 14m+14sm+18st+22a e número fundamental (NF) igual a 118 (Figura 2a); enquanto a de *H. cochliodon* evidenciou o valor de  $2n = 64$  cromossomos distribuídos em 16m+26sm+14st+8a e NF = 120 (Figura 2b).

A análise da Região Organizadora do Nucléolo (NOR), tanto por nitrato de prata como por sonda de DNAr 18S em *H. Boulengeri*, revelou um sistema de NOR múltipla, com até oito cromossomos marcados (Tabela 2), próximo à região telomérica. Em três pares cromossômicos a NOR esteve presente no braço curto: dois pares de cromossomos submetacêntricos (pares 9 e 11) e um par de cromossomo subtelocêntrico (par 16). Além de um par de cromossomos acrocêntrico (par 24), que apresentou marcações nos braços longos e heteromorfismo de tamanho (Figuras 3a e 3b).

Nos exemplares de *H. cochliodon* amostrados e analisados também pelas técnicas citadas acima, a NOR foi evidenciada no braço longo de apenas um par de cromossomos subtelocêntrico (par 28) (Figuras 2c e 2d; Tabela 2), com parte das metáfases destes peixes apresentando heteromorfismo no tamanho da NOR. Em um dos indivíduos desta população foi detectada uma marcação adicional no braço curto de um

dos cromossomos do par da NOR, caracterizando uma marcação bitelomérica (Figuras 3e e 3f).

Em relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, a população de *H. Boulengeri* apresentou marcações nas regiões pericentroméricas dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, nos braços curtos de cromossomos submetacêntricos e subtelo-cêntricos. Bem como, extensos blocos abrangendo o braço longo dos acrocêntricos de maior tamanho, com variação intraespecífica na quantidade de cromossomos (dois a seis) que apresentaram esses blocos conspícuos, caracterizando um polimorfismo no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (Figuras 4a, 4b, 4c, 4d e 4e). Os cromossomos portadores da NOR foram banda C-positivos.

Nos exemplares de *H. Cochliodon* a heterocromatina foi evidenciada nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, bem como em marcações conspícuas abrangendo o braço curto de certos cromossomos submetacêntricos e subtelo-cêntricos (Figura 4f). Entre estes últimos está o cromossomo com a NOR bitelomérica, que juntamente com seu homólogo apresentaram NOR/banda C positiva.

### **Isoenzimas**

O estudo das populações de *H. Boulengeri* e *H. Cochliodon*, através de nove sistemas enzimáticos permitiu a análise de 15 locos (Tabela 2), os quais apresentaram um total de 30 alelos. Dentre os locos analisados dois deles (Idh-A e Gcdh-A) foram diagnósticos. Em *H. Boulengeri* foram verificados vários alelos exclusivos com frequências variáveis nos locos Aat-A-a e c, Adh-A-b e c, Gpi-B-a e d, G3pdh-A-b e c, G3pdh-B-b e Idh-B-a. Em relação à variabilidade genética das duas populações foram encontrados os valores de 0,2461 e 0,0309 de heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) (Tabela 3), para *H. Boulengeri* e *H. Cochliodon*, respectivamente.

## DISCUSSÃO

### Citogenética

Os números cromossômicos de *H. boulengeri*,  $2n = 68$ , e *H. cochliodon*,  $2n = 64$ ; embora descritos aqui pela primeira vez para estas espécies, já foram relatados para outros espécimes do gênero (Tabela 2) e estão inclusos na ampla diversidade de número diplóide deste grupo, que vai de 52 cromossomos, encontrado em *H. emarginatus* (Artoni e Bertollo 2001), a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 Rio Perdido NUP 4249 (Cereali et al., 2008). *Hypostomus boulengeri* e *H. cochliodon* apresentaram números cromossômicos muito próximos, porém, suas fórmulas cariotípicas tiveram uma relação inversa entre os grupos de cromossomos meta-submetacêntricos e subteloacrocêntricos:  $28m/sm+40st/a$  e  $42m/sm+22st/a$ , respectivamente. Artoni e Bertollo (2001) observaram através de regressão linear que as espécies de *Hypostomus* que têm alto número diplóide apresentam grande proporção de cromossomos do tipo subteloacrocêntricos quando comparados com aqueles de menor número cromossômico e propuseram que as fusões cêntricas representam um importante papel na evolução cariotípica do gênero. Desta forma, *H. boulengeri* representaria uma espécie com alto número diplóide, enquanto *H. cochliodon* corresponderia ao grupo oposto, com baixo número diploide.

As duas espécies analisadas evidenciaram padrões de NOR distintos: *H. cochliodon* apresentou NOR simples e *H. boulengeri* teve um sistema de NOR múltipla. Este último padrão é o mais frequente no gênero *Hypostomus*. Sendo que, até o momento, dentre o total de 35 populações do gênero analisadas para a detecção da NOR, 21 delas apresentaram sistema de NOR múltipla (Tabela 2).

A presença de até oito cromossomos portadores da NOR em alguns espécimes de *H. boulengeri*, foi encontrado anteriormente, somente para populações de *H.*

*strigaticeps* da bacia do rio Ivaí (Endo et al. no prelo) e *H. ancistroides* da bacia do rio Paranapanema (Rubert et al. no prelo), as quais apresentaram marcações somente nos braços curtos dos cromossomos (Tabela 2). Já na população de *H. boulengeri*, além de marcações nos braços curtos dos pares de cromossomos 9, 11 e 16, foram encontradas também marcações nos braços longos de um par de cromossomos acrocêntricos (par 24). Em espécimes de *H. ancistroides* estudados por Paiva et al. (em preparação), embora tenha apresentado quatro pares de cromossomos portadores da NOR, o par de cromossomos acrocêntricos (par 23) evidenciou a marcação no braço curto de apenas um cromossomo do complemento, totalizando o máximo de sete cromossomos marcados (Tabela 2).

Entre os *H. cochliodon* analisados, além de heteromorfismo de tamanho da NOR no par de cromossomos submetacêntrico 28, um dos exemplares apresentou um dos homólogos com marcação bitelomérica. Similarmente, Artoni e Bertollo (2001) encontraram em uma população de *H. emarginatus* marcação da NOR no braço longo de um par de cromossomos metacêntrico e exemplares com marcação em um destes cromossomos também no braço curto. Estes autores relatam que os cromossomos com marcação bitelomérica podem ter sido originados por eventos de fissão nas NORs, gerando variações intrapopulacionais.

A NOR simples e heteromórfica de *H. cochliodon* apontou semelhança com *Hypostomus* sp. B (Artoni e Bertollo 1996 e 1999), *H. paulinus* e *Hypostomus* sp. 2 Rio Perdido NUP 4249 (Cereali et al., 2008), os quais tiveram NOR simples e heteromórfica com diferença no tamanho dos cromossomos, enquanto na última população citada, ocorreu também diferença no tamanho da NOR, assim como *H. cochliodon* do presente trabalho. Nestas quatro populações e na maioria dos *Hypostomus* com NOR simples

(Tabela 2), as marcações são diagnosticadas predominantemente nos braços longos dos cromossomos.

O estudo da heterocromatina constitutiva em *H. Boulengeri*, mostrou a presença de cromossomos metacêntricos com marcações pericentroméricas; cromossomos submetacentrô e subtelocêntricos com blocos heterocromáticos nos braços curtos. Além destes, foram observados blocos conspícuos nos braços longos de cromossomos acrocêntricos, os quais evidenciaram um polimorfismo da banda C, com cinco padrões distintos entre os espécimes analisados: I) blocos de heterocromatina no primeiro par de cromossomos acrocêntricos; II) blocos de heterocromatina no primeiro par e mais um cromossomo do segundo par de cromossomos acrocêntricos; III) blocos de heterocromatina nos dois primeiros pares de cromossomos acrocêntricos; IV) blocos de heterocromatina nos dois primeiros pares e mais um cromossomo do terceiro par de cromossomos acrocêntricos; V) blocos de heterocromatina nos três primeiros pares de cromossomos acrocêntricos (Figura 4).

Diferenças intrapopulacionais no padrão de banda C são descritos em outras espécies de peixes, tais como *Astyanax scabripinnis* (Fernandes e Martins-Santos, 2005) e *Serrapinnus notomela* (Santi-Rampazzo et al. 2008). Diversidade intrapopulacional no padrão de heterocromatina constitutiva é geralmente atribuída à transferência destes blocos para sítios equilocais de um cromossomo a outro, possivelmente devido ao arranjo de cromossomos não homólogos no núcleo interfásico (Schweizer e Loidl 1987). Contudo, não deve ser descartada a possibilidade de amplificação na duplicação e/ou crossing-over desigual. A presença destes blocos heterocromáticos terminais em cromossomos acrocêntricos é comum em várias espécies de *Hypostomus* e parece ser uma característica na família Loricariidae (Kavalco et al. 2004).

Nos exemplares de *H. cochliodon* as regiões de heterocromatina foram mais evidentes no braço curto de cromossomos submetá e subtelocêntricos. Também estiveram presentes no par 28, pequenos blocos heterocromáticos intercalados com as NORs nos braços longos e no braço curto do exemplar com a marcação de NOR bitelomérica.

Padrões de marcações da NOR associados aos de heterocromatina constitutiva podem vir a ser marcadores citogenéticos significantes entre os espécimes de *Hypostomus* (Rubert et al., no prelo) auxiliando na identificação daquelas espécies ainda não descritas ou com características morfológicas muito similares.

### **Isoenzimas**

A presença dos dois locos diagnósticos e os alelos exclusivos para *H. boulengeri* evidenciaram uma distinção entre as duas espécies analisadas. Os estudos aloenzimáticos entre populações de espécies deste grupo têm contribuído para verificar diferenças genéticas, auxiliando na diferenciação das espécies de *Hypostomus*. Renesto et al. (2007) analisando populações de *H. boulengerie* de *H. cochliodon* da bacia do alto rio Paraguai, verificou locos diagnósticos entre as duas espécies (sAat-2, Idh-2 e Mdhp-B), que diferiram daqueles encontrados no presente trabalho (Idh-A e Gdh-A). Além disto, o loco sAat-2 separou *H. boulengeri* e *H. cochliodon* de outras sete espécies de *Hypostomus* (*H. latifrons*, *H. regani*, *Hypostomus* sp. 1, *Hypostomus* sp. 2, *Hypostomus* sp. 3, *H. cf. latirostris* e *Pterygoplichthys anisitsi*) do rio Manso (Reservatório de Manso) e rio Cuiabá. O loco Idh-2 relatado por Renesto et al. (2007) equivale ao loco Idh-B do presente estudo, enquanto a enzima Mdhp (enzima málica) não foi analisada.

A heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) de *H. boulengeri* ( $H_e = 0,2461$ ) foi a mais alta já verificada entre as espécies deste gênero estudadas por eletroforese de isoenzimas. O valor mais alto de  $H_e$  encontrado anteriormente foi de 0,199 para *H.*

*hermanni* do rio Ivaí (PR) (Paiva 2006). Para *H. boulengeri* do presente trabalho o valor de  $H_e$  representa mais de quatro vezes o valor da heterozigosidade média esperada para peixes ( $H_e = 0,051$ ), obtida por Ward et al. (1992). No entanto, Renesto et al. (2007) verificaram em *H. boulengeri* da bacia do alto rio Paraguai,  $H_e$  igual a 0,078, da mesma forma que, valores distintos foram encontrados entre populações de *H. margaritifer* do reservatório de Itaipu, no Paraná ( $H_e = 0,104$ ) e do reservatório de Corumbá, em Goiás ( $H_e = 0,061$ ) (Zawadzki et al. 2002). *Hypostomus cochliodon* revelou um valor de  $H_e$  de 0,0309, similar ao encontrado para a população desta mesma espécie no reservatório de Itaipu (0,039) (Zawadzki et al. 2005), porém menor que o  $H_e$  (0,070) descrito para *H. cochliodon* do alto rio Paraguai (Renesto et al. 2007).

Um estudo de três populações de *H. regani*, dos reservatórios de Corumbá, Itaipu e Manso, mostrou que elas diferiram em relação aos valores de heterozigosidade, 0,0527, 0,0712 e 0,0317, respectivamente (Zawadzki et al. 2008b). Desta forma, é possível verificar que o  $H_e$ , uma medida da variabilidade genética, pode ser similar ou variável entre populações de uma mesma espécie de *Hypostomus*, indicando que, possivelmente, vários fatores bióticos e abióticos podem estar envolvidos no processo de diferenciação genética deste grupo. Alguns aspectos são propostos na literatura, como por exemplo, endogamia (Zawadzki et al. 1999; Zawadzki et al. 2002; Zawadzki et al. 2005; Paiva 2006; Zawadzki et al. 2008b; Ito et al. 2009), barreiras naturais que impedem o fluxo gênico, diferenças de temperatura, velocidade da água, recursos alimentares e estratégias reprodutivas (Zawadzki et al. 2008b).

A falta de estudos da biologia de peixes, para os rios e riachos neotropicais, especialmente daqueles da bacia do rio Paraguai, dificulta a análise de correlação multivariada de fatores para tentar associar quais variáveis estariam relacionadas com a maior ou a menor heterozigosidade nestes peixes. Além disso, embora não sendo

possível confirmar as causas desta alta variabilidade genética, sabe-se que ela é de extrema importância, pois, como expresso por Vida (1994), “o futuro da manutenção da diversidade de espécies está na diversidade genética das espécies. Em geral, quanto maior diversidade genética for mantida, maior adaptabilidade e, conseqüentemente, a probabilidade de sobrevivência de uma espécie num ambiente inconstante”.

Assim, os dados citogenéticos e aloenzimáticos do presente trabalho evidenciaram uma ampla variação genética na população de *H. boulengeri*. Variação tanto em relação à estruturação cromossômica (fórmula cariotípica, número fundamental, quantidade e localização das regiões organizadoras de nucléolo, tamanho e localização da heterocromatina constitutiva), quanto aos dados genotípicos, gerados a partir da expressão fenotípica de seus genes (número de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos, frequência de locos polimórficos, heterozigosidade média obtida e esperada). Desta forma, mesmo regiões dos cromossomos que, teoricamente, não possuem atividade gênica, mostraram-se distintas dentro de uma mesma população, no caso, de *H. boulengeri*, apresentando cinco padrões distintos de distribuição de grandes blocos de heterocromatina constitutiva, enquanto regiões do DNA que estão realizando efetivamente a tradução do seu material genético revelaram vários alelos em parte de seus respectivos locos aqui estudados, evidenciando um alto valor de variação gênica (estimado por  $H_e$ ). *Hypostomus cochliodon* por sua vez, apresentou tanto a variação cromossômica como a genotípica, menos expressiva que aquela relatada para *H. boulengeri*.

Embora a utilização da citogenética e eletroforese de isoenzimas tenham permitido uma análise mais refinada neste estudo, os fatores que atuam e/ou atuaram na diferenciação da variabilidade genética entre *H. boulengeri* e *H. cochliodon*, não é possível de avaliar com precisão. No entanto, sabe-se que diferenças genéticas são

fixadas em uma população de acordo com a sua necessidade de adaptação ao meio ambiente em que vive. Todavia, sugere-se que os exemplares de *H. boulengeri* (grupo *Hypostomus plecostomus*) podem ser distinguidos citogeneticamente e aloenzimaticamente de *H. cochliodon* (grupo *Hypostomus cochliodon*).

## REFERÊNCIAS

Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F (2006) Karyotypic relationship among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical. *Genetica* 128:1-9

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

Armbruster JW, de Souza L (2005) *Hypostomus macushi*, a new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from Guyana. *Zootaxa* 920:1-12

Artoni RF, Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49:81-9

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

Artoni RF, Bertollo LA (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 166:209-14

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

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hopliaslaccidae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Braz Genet* 2:103-120

Boyer SH, Fainer DC, Naughton MA (1963) Myoglobin inherited structural variation in man. *Science* 140:1228-1231

Brasil (2004) Agência Nacional de Águas. Implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o Pantanal e bacia do alto Paraguai:

Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS (2007) Peixes do Pantanal. Manual de identificação. EMBRAPA Pantanal, Brasília

Bueno V, Zawadzki, CH, Margarido VP (no prelo) Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosome types. *Rev. Fish Biol Fisheries*

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(3):583-591

Endo KS, Martinez ERM, Zawadzki CH, Paiva LSP, Júlio-Júnior HF (no prelo) Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. Acta Scient

Fernandes CA, Martins-Santos ICM (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. Genetica 124:301-6

Galdino S, Vieira LM (2006) A Bacia do Rio Taquari e seus problemas ambientais e socioeconômicos. Galdino S, Vieira LM, Pellegrin LA (editores técnicos). Impactos ambientais e socioeconômicos na Bacia do Rio Taquari - Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal. 356p.

Gindri BS (2009) Contribuição ao estudo citogenético em Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da região do alto Taquari. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá

Hollanda-Carvalho P, Lima FCT, Zawadzki CH (2010) Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. Neotr Ichthyol 8:39-48

Hollanda-Carvalho P, Weber C (2004) Five new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the middle and lower Amazon System. Rev Suisse Zool 111(4):953-978

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experimentia 8:1014-1015

Ito KF, Renesto E, Zawadzki CH (2009) Biochemical comparison of two *Hypostomus* populations (Siluriformes, Loricariidae) from the Atlântico stream of the upper Paraná river basin, Brazil. Genet Mol Biol 32:51-57

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). Hereditas 94:180-186

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

Mariotto S (2008) Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo Ancistrini (Siluriformes, Loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras. Tese. Universidade Federal de São Carlos

Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2009) Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotr Ichthyol* 7:595-600

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

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

Müller S, Weber C (1992). Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Rev Suisse Zool* 99:447-454

Murphy RW, Sites JW, Buth, DG, Haufler CH (1996) Proteins: Isozyme Electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BM (eds). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts, pp 51-120

Paiva S (2006) Variabilidade genética em populações de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) do rio Ivaí, bacia do alto rio Paraná, Brasil. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá

Paiva S, Renesto E, Zawadzki CH (2005) Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genet Mol Biol* 28:370-375

Paiva S, Renesto E, Zawadzki CH, Codognoto FJ, Ferreira PEB, Prizon AP, Martins-Santos IC (em preparação) Estudos citogenéticos e aloenzimáticos de três populações de *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae: Hypostominae), da bacia do alto rio Paraná. *Acta Scient*

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

Renesto E, Zawadzki CH, Paiva S (2007) Allozyme differentiation and relationships within *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the upper Paraguay river basin, Brazil. *Bioch Syst Ecol* 35:869-876

Rubert M, Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC, Giuliano-Caetano L (no prelo) Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comp Cytogen*

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

Santi-Rampazzo AP, Nishiyama PB, Ferreira PEB, Martins-Santos IC (2008) Intrapopulational polymorphism of nucleolus organizer regions in *Serrapinus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. J Fish Biol 72: 1236-1243

Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochem Genet 4:297-320

Souza L, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2003) Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai river basin. Cytologia 68:345-350

Swarca AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2005) Karyotype divergence among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. Ichthyol Explor Freshw 16:325-330

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromation. Exptl Cell Research 75:304-306

Vida G (1994) Global issues of genetic diversity. In: Loeshcke V, Tomiuk J, Jain SK (eds.). Conservation genetics. Basel: Birkhauser Verlag, pp 9-19

Ward RD, Skibinski DOF, Woodwark M (1992) Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. Evol Biol 26:73-159

Weber C (2003) Family Loricariidae: subfamily Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ (ed) Check list of the freshwater fish of South America. Edipucrs, Porto Alegre, pp 351-372

Yeh FC, Yang R, Boyle, T (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window – Based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Albertand Center for International Forestry Research

Zawadzki CH, Renesto E, Bini LM (1999) Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). Rev suisse de Zool 106:91-105

Zawadzki CH, Machado MFPS, Renesto E (2001) Differential expression for tissue-specific isozymes in the three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). Bioch Syst Ecol 29:911-922

Zawadzki CH, Weber C, Pavanelli CS, Renesto E (2002) Morphological and biochemical comparison of two allopatric populations of *Hypostomus margaritifer* (Regan, 1907) (Osteichthyes, Loricariidae) from the upper Paraná River basin, Brazil. Acta Scient 24:499-505

Zawadzki CH, Renesto E, Paiva S, Lara-Kamei MCS (2004) Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. Genetica 121:251-257

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

Zawadzki CH, Renesto E, Mateus RP (2008a) Allozyme analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Corumbá, upper rio Paraná basin, Brazil. *Biochem Genet* 46:755-769

Zawadzki CH, Renesto E, Peres MD, Paiva S (2008b) Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genet Mol Biol* 31:767-771

**Tabela 1.** Nome, número de Comissão de Enzima (nº E.C.), tecidos (F - fígado; M - músculo; C - coração) e tampões (TBE - Tris-borato-EDTA; TC - Tris-citrato; TEM - Tris-EDTA-maleato) das enzimas analisadas.

<b>Enzima (abreviação)</b>	<b>nº E.C.</b>	<b>Tecidos</b>	<b>Tampões</b>
Álcool desidrogenase (ADH)	1.1.1.1	F	TBE
Aspartato aminotransferase (AAT)	2.6.1.1	F	TEM
Fosfatase ácida (ACP)	3.1.3.2	F	TC
Glicose-3-fosfato desidrogenase (G3PDH)	1.1.1.8	F	TC
Glicose-6-fosfato isomerase (GPI)	5.3.1.9	M, C	TC
Glicose desidrogenase (GCDH)	1.1.1.118	F	TEM
Isocitrato desidrogenase (IDH)	1.1.1.42	F, M, C	TC
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	F, M, C	TC
Superóxido dismutase (SOD)	1.15.1.1	F	TBE

**Tabela 2** – Espécies de *Hypostomus* analisadas citogeneticamente com seus respectivos números diplóides (2n), fórmulas cariotípicas, tipos cromossômicos (m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; st: subtlocêntrico; a: acrocêntrico), cromossomos portadores da NOR. (q.c.: quantidade de cromossomos portadores da NOR; b: tipo de braço cromossômico marcado (bl – braço longo, bc – braço curto); ?: par de cromossomos não informado; \*: heteromorfismo no par de cromossomo; •: heteromorfismo em par de cromossomo não identificado ; 1: somente um cromossomo marcado; linhas verdes: populações com NOR simples; linhas cinzas: populações com NOR múltiplas).

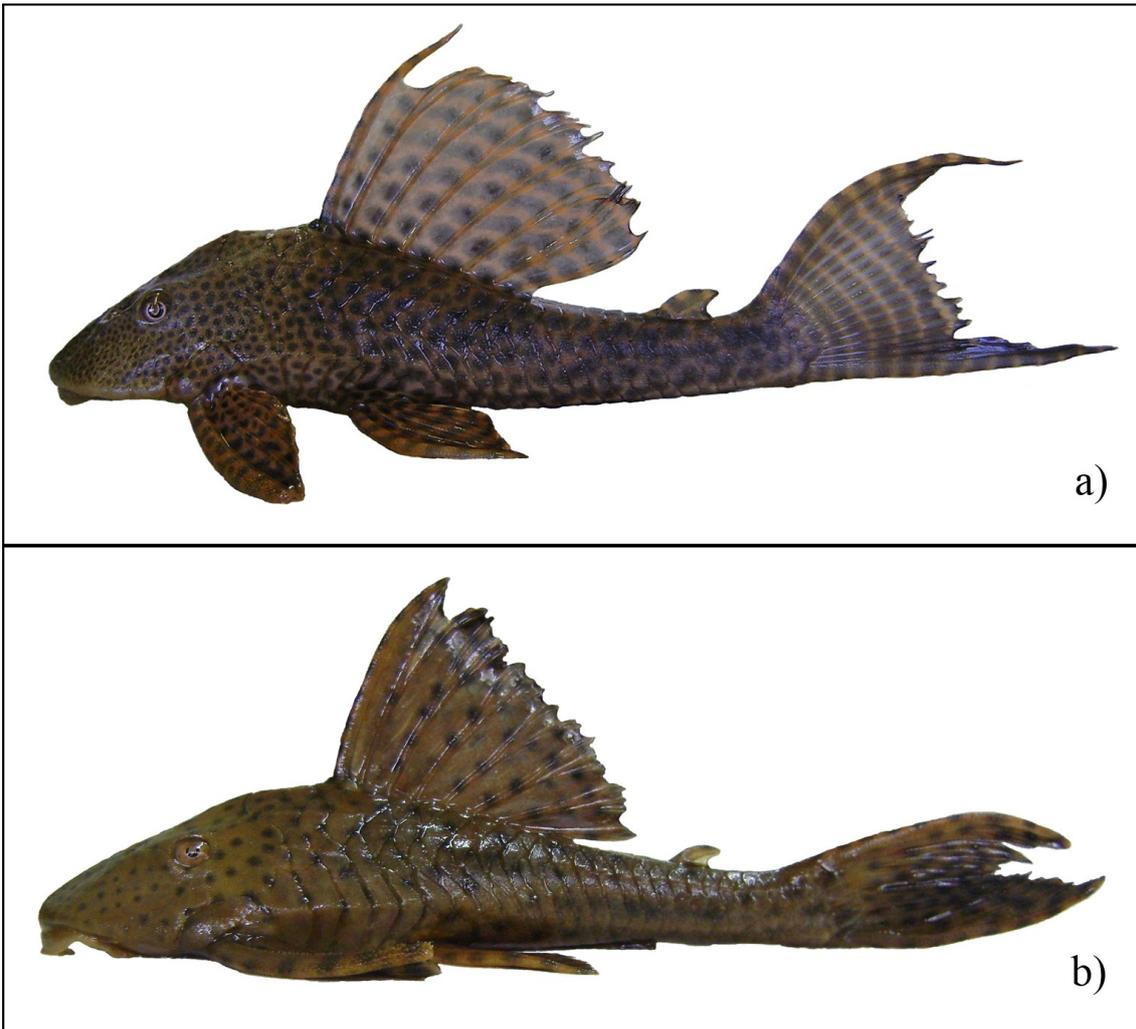
Espécie	2n	Fórmula cariotípica				NOR						Localidade	Ref.	
		m	sm	st	a	q.c.	b	m	sm	st	a			
<i>H. emarginatus</i>	52	16	30	6		2	bl	?					Rio Araguaia, MT	5
<i>H. cochliodon</i>	64	16	26	14	8	2	bl			28*			Córrego Onça, bacia do rio Paraguai, MS	16
<i>Hypostomus</i> sp.	64	15	24	25		2	bc			30			Ribeirão Fundo, bacia do rio Araguaia, MT	3
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-1	64	16	16	32		2	bc			25			Rio Xingu, Altamira, PA	11
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-3	65	15	23	26 + 1B		2	bl			30			Rio Xingu, Altamira, PA	11
<i>H. affinis</i>	66	14	14	12	26	5	bl	6			21 <sup>1</sup> , 28		Rib. Jacuí, bacia do rio Paraíba do Sul, SP	6 e 7
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-2	66	18	14	34		2	bc			29			Rio Xingu, Altamira, PA	11
<i>H. ancistroides</i>	68	8	10	18	32	3	bc	3 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup> , 9 <sup>1</sup>				Córrego Ximbaúva, Ourizona, PR	13
<i>H. ancistroides</i>	68	10	26	32		8	bc			19*, 20, 21, 22			Bacia do Rio Paranapanema, PR	14
<i>H. ancistroides</i>	68♂	10	27	31		–	–	–	–	–	–	–	–	1
	68♀	10	28	30		–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>H. ancistroides</i>	68	14	12	18	24	3	bc		9, 10 <sup>1</sup>				Ribeirão Dourados, Mandaguari, PR	13
<i>H. ancistroides</i>	68	14	14	8	32	–	–	–	–	–	–	–	Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR	12
<i>H. ancistroides</i>	68	14	14	14	26	6	bc	7	10		22		Ribeirão Cambira, bacia do rio Ivaí, PR	15
<i>H. ancistroides</i>	68	16	12	18	22	5	bc	5 <sup>1</sup>	11	15			Ribeirão Maringá, Maringá, PR	13
<i>H. ancistroides</i>	68	16	18	10	24	7	bc	7	13	19	23 <sup>1</sup>		Córrego Tauá, bacia do rio Pirapó, PR	15
<i>H. ancistroides</i>	68	16	18	34		6	bc•		10, 17	18			Rios Piracicaba e Mogi-Guaçu, SP	2
<i>H. ancistroides</i>	68	16	20	10	22	6	bc		11, 14, 17				Córrego Jurumirim, bacia do rio Tietê, SP	
<i>H. ancistroides</i>	68	18	10	12	28	6	bc	6	13, 14				Rio Araquá, Botucatu, SP	8
<i>H. boulengeri</i>	68	14	14	18	22	8	bc		9, 11	16			Córrego Onça, bacia do rio Paraguai, MS	16
							bl			24*				
<i>H. macrops</i>	68	10	14	44		–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>Hypostomus</i> sp. A	70	18	14	38		2	bc•	7					Córrego Rincão, SP	2
						4	bl•			26, 28				
<i>H. goyazensis</i>	72	10	16	10	36	2	bc			18			Rio Vermelho, GO	8
<i>H. regani</i>	72	10	18	44		4	bc			26*, 27			Rio Jacutinga; bacia rio Paranapanema, PR	14
<i>H. regani</i>	72	10	20	42		–	–	–	–	–	–	–	Rios Piracicaba e Mogi-Guaçu, SP	2

<i>H. regani</i>	72	12	14	26	20	4	bc		12	19		Rio Ivaí, Floresta, PR	13	
<i>H. regani</i>	72	12	18	26	16	4	bl				35, 36	Rio Araquá, Botucatu, SP	8	
<i>Hypostomus</i> sp. B	72	12	18	42		2	bl				17*	Rio Mogi-Guaçu, SP	2 e 4	
<i>Hypostomus</i> sp. C	72	10	18	44		2	bl				?	Rio Mogi-Guaçu, SP	2	
<i>Hypostomus</i> sp. D <sub>1</sub>	72	10	26	36		2	bl				20	Rio Mogi-Guaçu, SP	2	
<i>Hypostomus</i> sp. D <sub>2</sub>	72	14	20	38		2	bl				26	Rio Mogi-Guaçu, SP	2	
<i>H. strigaticeps</i>	72	10	14	18	30	8	bc		10	14, 18	29	Rio Ivaí, Floresta, PR	13	
<i>H. strigaticeps</i>	72	10	16	46		4	bl				18*, 28	Bacia do Rio Paranapanema, PR	14	
<i>H. albopunctatus</i>	74	10	20	44		2	bc•	?					Rios Piracicaba e Mogi-Guaçu, SP	2
						2	bl•							
<i>H. paulinus</i>	74	18	20	44		–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>H. strigaticeps</i>	74	8	4	62		–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>Hypostomus</i> sp. F	75	10	17	48		–	–	–	–	–	–	Rio São Francisco, MG	4	
<i>H. aff. aurogutattus</i>	76	8	30	38		2	bl				25	Rios Piracicaba e Mogi-Guaçu, SP	2	
<i>H. nigromaculatos</i>	76	8	20	48		3	bl				25 <sup>1</sup> , 28*	Rio Mogi-Guaçu, SP	9	
<i>H. nigromaculatos</i>	76	6	20	50		3	bc				16*, 27 <sup>1</sup>	Ribeirões Três Bocas e Apertados, PR	9	
<i>H. paulinus</i>	76	6	16	54		2	bl				16*	Ribeirões Três Bocas e Apertados, PR	14	
<i>Hypostomus</i> sp. F	76	10	16	50		–	–	–	–	–	–	Rio São Francisco, MG	4	
<i>Hypostomus</i> sp. E	80	8	16	56		4	bc		?		32	Rio Mogi-Guaçu, SP	2 e 4	
<i>H. topavae</i>	80	14	10	26	30	–	–	–	–	–	–	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, PR	12	
<i>Hypostomus</i> sp. 3 Cór. Salobrinha; NUP 4247	82	6	12	64		–	–	–	–	–	–	Rio Salobra, Planalto da Bodoquena; MS	10	
	83	6	12	65		–	–	–	–	–	–			
	84	6	12	66		–	–	–	–	–	–			
<i>Hypostomus</i> sp. 2 Rio Perdido; NUP 4249	84	6	16	62		2	bl				35*	Rio Perdido, Planalto da Bodoquena; MS	10	

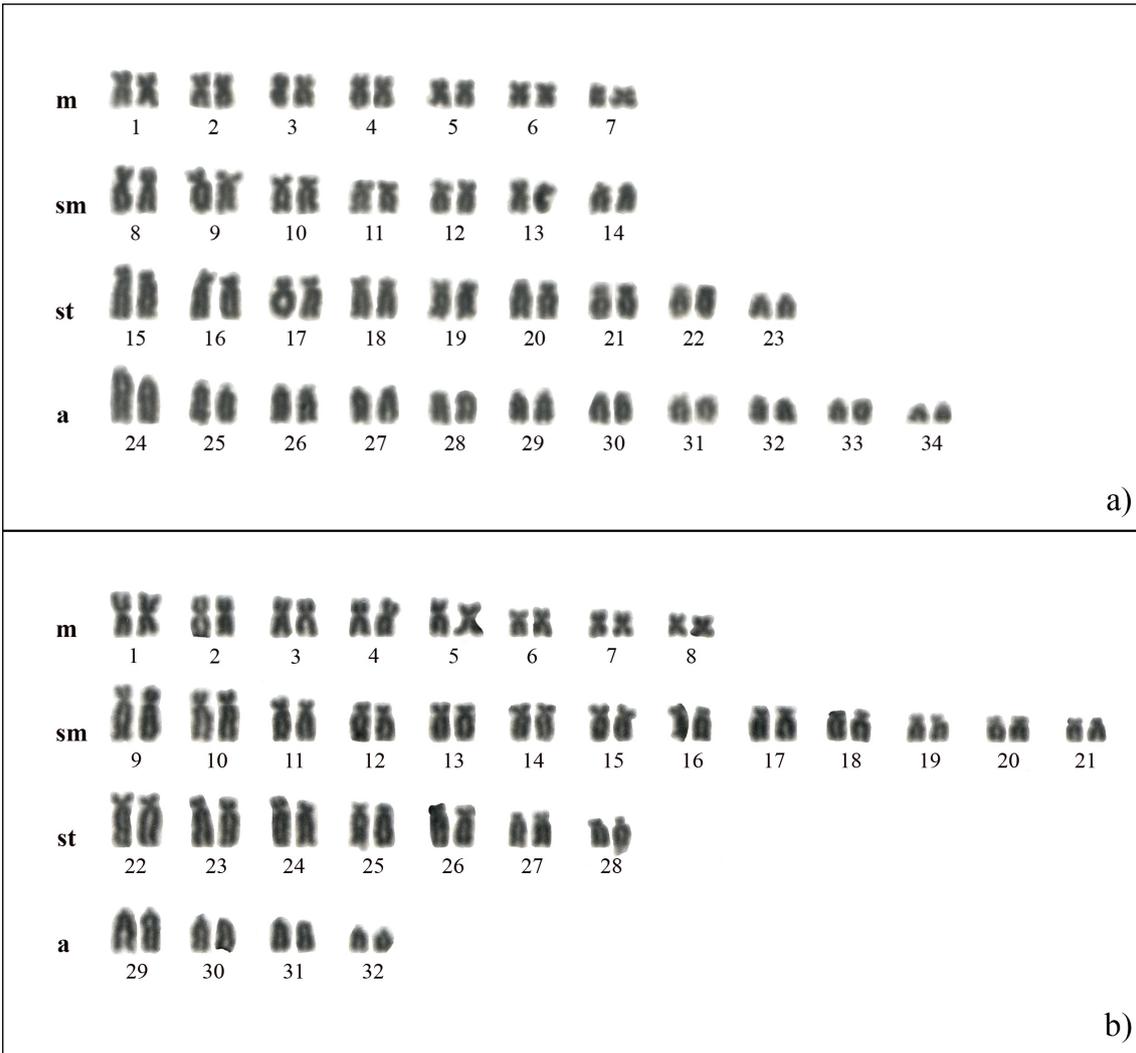
1. Michele et al., 1977; 2. Artoni e Bertollo, 1996; 3. Artoni et al., 1998; 4. Artoni e Bertollo, 1999; 5. Artoni e Bertollo, 2001; 6. Kavalco et al., 2004; 7. Kavalco et al., 2005; 8. Alves et al., 2006; 9. Rubert et al., 2008; 10. Cereali et al., 2008; 11. Millhomen et al., 2010; 12. Bueno et al., no prelo; 13. Endo et al., no prelo; 14. Rubert et al., no prelo; 15. Paiva et al., em preparação; 16. Presente trabalho.

**Tabela 3.** Frequências alélicas, número de indivíduos analisados (n), número de locos polimórficos (P), porcentagem de locos polimórficos (P%), número de alelos por loco (K), heterozigosidade média obtida (H<sub>o</sub>) e esperada (H<sub>e</sub>) das populações de *Hypostomus boulengeri* (*H. b.*) e *Hypostomus cochliodon* (*H. c.*). Em parênteses estão os respectivos desvios padrões.

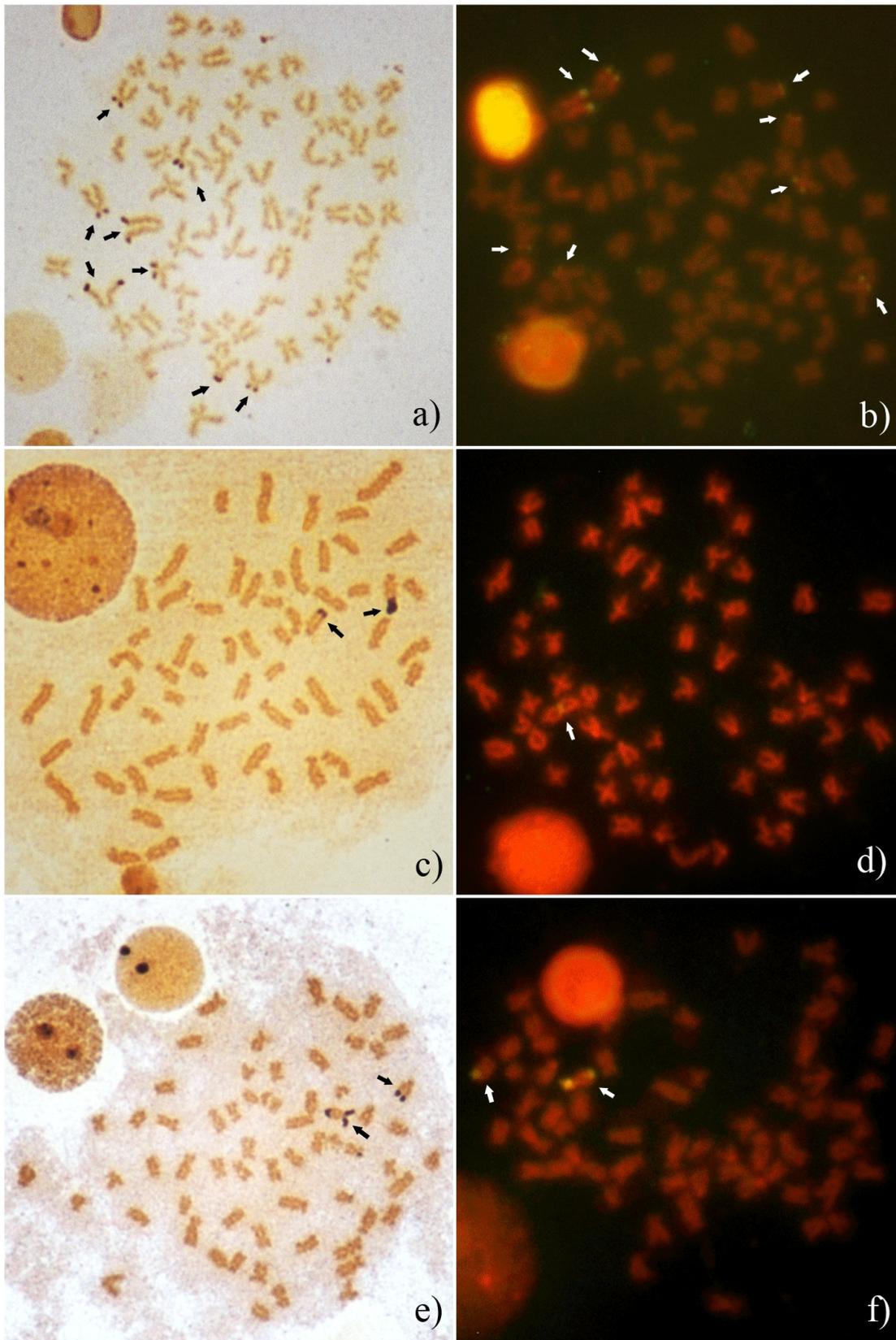
Locos	Alelos	<i>Hypostomus boulengeri</i>	n ( <i>H. b.</i> )	<i>Hypostomus cochliodon</i>	n ( <i>H. c.</i> )
Aat-A	<i>a</i>	0,0526	19	—	24
	<i>b</i>	0,5789		1,0000	
	<i>c</i>	0,3684		—	
Aat-B	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	22
Acp-A	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	24
Adh-A	<i>a</i>	0,3000	20	1,0000	24
	<i>b</i>	0,6500		—	
	<i>c</i>	0,0500		—	
Gcdh-A	<i>a</i>	1,0000	20	—	24
	<i>b</i>	—		1,0000	
Gpi-A	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	24
Gpi-B	<i>a</i>	0,2250	20	—	24
	<i>b</i>	0,4000		0,6522	
	<i>c</i>	0,2000		0,3478	
	<i>d</i>	0,1750		—	
G3pdh-A	<i>a</i>	0,5750	20	1,0000	24
	<i>b</i>	0,3250		—	
	<i>c</i>	0,1000		—	
G3pdh-B	<i>a</i>	0,2000	20	1,0000	24
	<i>b</i>	0,8000		—	
Idh-A	<i>a</i>	—	20	1,0000	24
	<i>b</i>	0,2000		—	
	<i>c</i>	0,6500		—	
	<i>d</i>	0,1500		—	
Idh-B	<i>a</i>	0,6000	20	—	22
	<i>b</i>	0,4000		1,0000	
Mdh-A	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	24
Mdh-B	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	24
Mdh-C	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	24
Sod-A	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	24
P		7		1	
P%		46,67		6,67	
K		1,8667		1,0667	
H <sub>o</sub>		0,0981 (0,1702)		0,0000 (0,0000)	
H <sub>e</sub>		0,2461 (0,2836)		0,0309 (0,1171)	



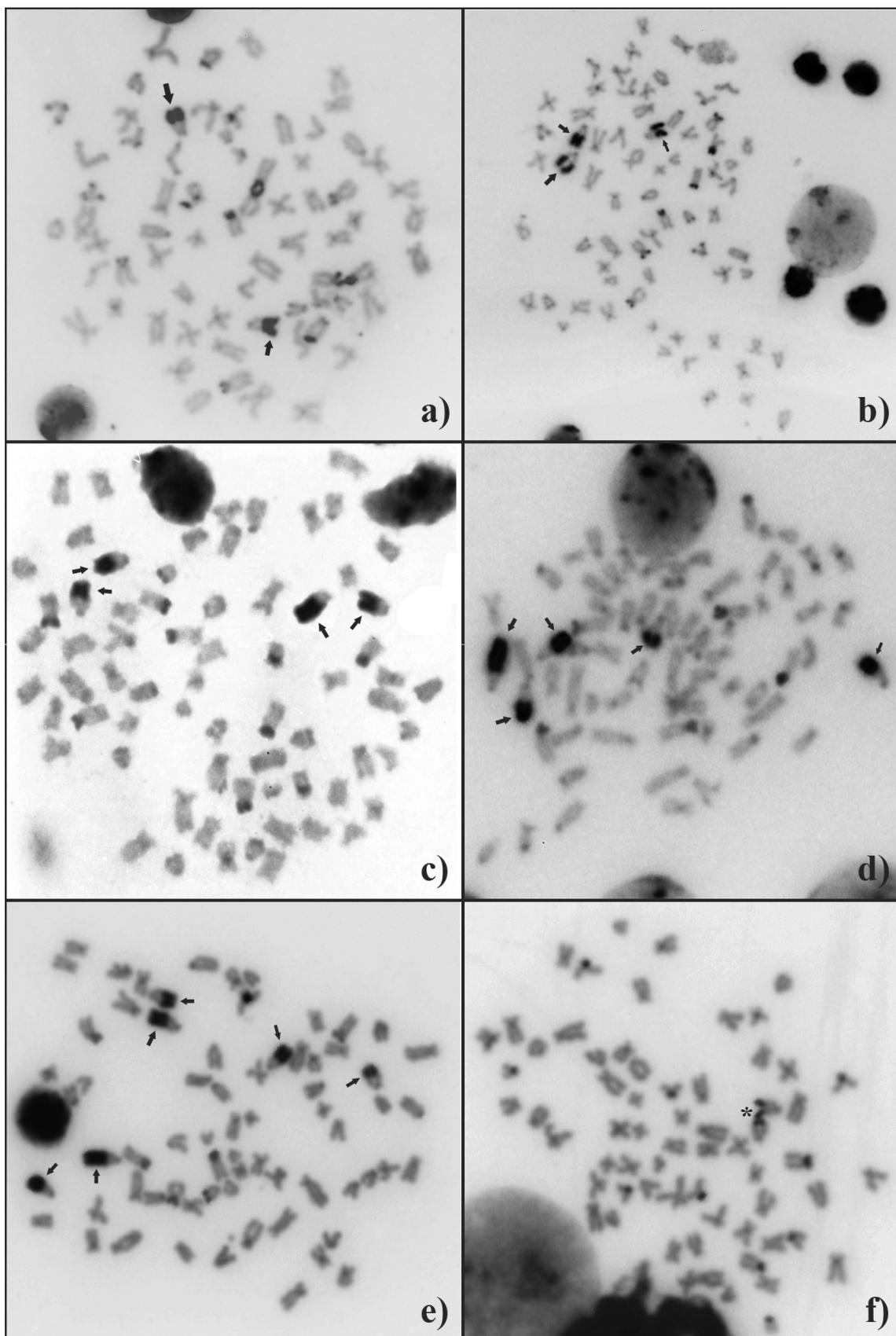
**Figura 1.** Exemplos de *Hypostomus boulengeri* (a) e *Hypostomus cochliodon* (b).



**Figura2.** Cariótipos de *H. bouleengeri* (a) e *H. cochliodon* (b) corados com Giemsa.



**Figura 3.** Metáfases de Ag-NOR e FISH de *H. bouleengeri* (a e b, respectivamente) e de *H. cochliodon* (c e d, respectivamente). Exemplar de *H. cochliodon* com marcação bitelomérica para NOR (e e f). As setas indicam os cromossomos com as marcações de Ag-NOR e DNA 18S.



**Figura 4.** Metáfases de bandeamento C de *Hypostomus boulegeri* com seus respectivos padrões em sequência: a) I; b) II; c) III; d) IV; e) V; e de *H. cochlodon* (f). Setas indicam os blocos heterocromáticos; asterisco corresponde ao par da NOR.

## CAPÍTULO II

**Estudos citogenéticos e aloenzimáticos de três populações de *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae: Hypostominae), da bacia do alto rio Paraná**

**Estudos citogenéticos e aloenzimáticos de três populações de *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae: Hypostominae), da bacia do alto rio Paraná**

Suzana de Paiva<sup>1</sup>, Erasmo Renesto<sup>1, 2</sup>, Cláudio H. Zawadzki<sup>2, 3</sup>, Flávio J. Codognoto<sup>1</sup>, Paulo E. B. Ferreira<sup>1</sup>, Ana Camila Prizon<sup>1</sup> e Isabel C. Martins dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá (UEM); Departamento de Biologia Celular e Genética (DBC). Av. Colombo, 5.790; Jd. Universitário. Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá (UEM); Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia). Av. Colombo, 5.790; Jd. Universitário. Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá (UEM); Departamento de Biologia (DBI). Av. Colombo, 5.790; Jd. Universitário. Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900.

## RESUMO

O gênero *Hypostomus* apresenta aproximadamente 130 espécies descritas. No entanto, a distinção morfológica entre as espécies já catalogadas e, também entre estas e os espécimes ainda não descritos do mesmo gênero, é geralmente difícil devido a variações na sua morfologia e padrão de cores. Neste trabalho, propomos o estudo de populações de *Hypostomus ancistroides*, de três sub-bacias de afluentes distintos da bacia do alto rio Paraná, através da citogenética e da eletroforese de isoenzimas, a fim de contribuir para a caracterização cariotípica e genotípica desta espécie. A análise citogenética revelou o mesmo número diplóide ( $2n = 68$ ) para as três populações. Porém, as fórmulas cariotípicas foram distintas:  $16m+20sm+10st+22a$  para os espécimes da bacia do rio Tietê (Córrego Jurumirum),  $14m+14sm+14st+26a$  para os da bacia do rio Ivaí (Ribeirão Cambira) e  $16m+18sm+10st+24a$  para aquela da bacia do rio Pirapó (Córrego Tauá). As marcações de NOR foram múltiplas e no braço curto das três populações analisadas. Assim, os dados encontrados corroboram com os da literatura que revelam uma ampla variação, tanto nas fórmulas cariotípicas, quanto nas marcações de NOR. Verificou-se a presença de locos diagnósticos nos espécimes da bacia do rio Ivaí (Idh-A) e naqueles da bacia do rio Pirapó (Gpi-B, G3pdh-A). Além de um alelo exclusivo com alta frequência (Idh-B-a) para os exemplares da bacia do rio Tietê. Contudo, a variabilidade genética das populações, medida pelo valor de  $H_e$ , se mostrou baixa em relação à média calculada para peixes. Assim, sugerimos a ampliação das análises de populações de *H. ancistroides*, a fim de compreender seus padrões citogenéticos e aloenzimáticos de forma a auxiliar na identificação destes espécimes.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Hypostomus*, o mais especioso da família Loricariidae, era composto, segundo Weber (2003), por 106 espécies válidas. Nos últimos anos foram descritas aproximadamente mais 20 espécies (Armbruster, 2003; Carvalho e Weber, 2004; Armbruster e de Souza, 2005; Oyakawa et al., 2005; Armbruster et al., 2007; Birindelli et al., 2007; Jerep et al., 2007; Zawadzki et al., 2008a; Zawadzki et al., 2008d; Carvalho et al., 2010; Zawadzki et al., 2010), elevando o número total de seus representantes conhecidos. No entanto, há uma grande dificuldade de identificação dos exemplares deste gênero devido principalmente a uma ampla variação na sua morfologia e padrão de cores (Weber, 2003).

Populações de *Hypostomus ancistroides* são encontrados em maior abundância em riachos de águas calmas, com pouca vegetação ripária e pousados sobre rochas juntos ao fundo ou sobre galhadas submersas. Eles começam a forragear depois do “cair da noite”, alimentando-se principalmente de cianobacterias, clorófitas e matéria orgânica vegetal (Casatti, 2002; Casatti et al., 2005). Esta espécie é amplamente distribuída através da bacia do alto rio Paraná (Casatti et al., 2005), e é uma das espécies de *Hypostomus* mais facilmente coletada nos riachos desta bacia. Também é a mais estudada citogeneticamente e tem apresentado uma ampla variação nas fórmulas cariotípicas e números de cromossomos portadores da região organizadora de nucléolos (NOR).

Contribuições utilizando as técnicas de citogenética e eletroforese de isoenzimas para estudos de peixes foram realizadas em *Serrasalmus spilopleura* e *S. marginatus* (piranha) das bacias do médio e alto rio Paraná e rio Paraguai (Cestari, 1996); *Serrasalmus rhombeus* da Amazônia Central (Teixeira et al., 2006), *Mugil rubrioculus* e *M. curema* (tainha) da Lagoa La Restinga na Venezuela (Nirchio et al.,

2007) e um complexo de híbridos *Cobitis taenia* de vários rios da Europa (Janko et al., 2007).

A eletroforese de isoenzimas tem contribuído para auxiliar na distinção de espécies de *Hypostomus*. No ribeirão Keller, bacia do rio Ivaí, Zawadzki et al. (2004b) encontraram diferenças alélicas entre *H. hermanni* e outras três espécies que não estavam descritas na literatura (*Hypostomus* sp. 1, *Hypostomus* sp. 2, *Hypostomus* sp. 3). O mesmo ocorreu com *H. strigaticeps* que foi distinguido de *Hypostomus* sp. 1 e *Hypostomus* sp. 2, coletados no ribeirão Maringá, afluente do rio Pirapó (Paiva et al., 2005).

Desta forma, propomos neste trabalho um estudo citogenético e aloenzimático de três populações de *H. ancistroides*: uma pertencente à bacia do rio Tiête, uma da bacia do rio Ivaí e a outra da bacia do rio Pirapó, com o objetivo de verificar a existência de variações citogenéticas para esta espécie, investigar a presença de marcadores bioquímicos, bem como avaliar a variabilidade genética em cada uma delas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

No presente trabalho foram analisadas citogeneticamente e aloenzimaticamente três populações de *Hypostomus ancistroides*. Uma população proveniente do córrego Jurumirim (23°25'30" S; 47°57'15" W), afluente do rio Tatuí, e este do rio Sorocaba (bacia do rio Tietê - SP), uma do ribeirão Cambira, afluente do rio Bom (23°63'73" S; 51°51'63" W) (bacia do rio Ivaí - PR) e outra do córrego Tauá, afluente do ribeirão Morangueira (23°37'25" S; 51°84'58" W) (bacia do rio Pirapó - PR). Todas as localidades pertencentes à bacia do alto rio Paraná.

## **Citogenética**

As análises citogenéticas foram realizadas em 11 exemplares (1 macho, 7 fêmeas, 3 não identificados) do córrego Jurumirim, 16 (2 macho, 10 fêmeas, 4 não identificados) do ribeirão Cambira e 10 (1 macho, 7 fêmeas, 2 não identificados) do córrego Tauá.

Para as análises foram obtidos cromossomos mitóticos utilizando células do rim, de acordo com a técnica *air drying* descrita por Bertollo et al. (1978). Esta técnica consiste, basicamente, na aplicação de uma solução de colchicina no animal, seguido da hipotonização das células em KCL 0,075M, a fim de obter uma suspensão celular e em seguida, o material é fixado em solução de metanol e ácido acético (3:1). Os cromossomos foram identificados de acordo com os critérios de relação de braços (RB), propostos por Levan et al. (1964). Para caracterização das regiões organizadoras do nucléolo (RONs) utilizou-se a técnica de impregnação pelo nitrato de prata (Ag-RON), descrita por Howell e Black (1980).

## **Isoenzimas**

Os géis de amido foram preparados a uma concentração de 15%, utilizando três sistemas tampão distintos, cada um específico para os diferentes sistemas enzimáticos: Tris-Borato-EDTA (TBE), pH 8,6 (Boyer et al., 1963) - Álcool desidrogenase (ADH) e Superóxido dismutase (SOD); Tris-Citrato (TC), pH 7,0 (Shaw e Prasad, 1970) - Fosfatase ácida (ACP), Glicerol-3-fosfato-desidrogenase (G3PDH), Glicose-6-fosfato isomerase (GPI), Isocitrato desidrogenase (IDH), Lactato desidrogenase (LDH) e Malato desidrogenase (MDH); Tris-EDTA-Maleato (TEM), pH 7,4 (Murphy et al., 1996) - Aspartato aminotransferase (AAT) e Glicose-1-desidrogenase (GDH).

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas, centrifugadas e o sobrenadante aplicado no gel e submetido à eletroforese horizontal contínua. Após, o gel foi fatiado e incubado com soluções histoquímicas específicas, preparadas segundo o protocolo de Murphy et al. (1996).

A interpretação genética dos zimogramas foi baseada na estrutura quartenária das enzimas segundo Ward et al. (1992). Os dados foram analisados no programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999).

## **RESULTADOS**

### **Análise citogenética**

As três populações de *H. ancistroides* analisadas apresentaram o mesmo número diplóide de 68 cromossomos. Contudo, a população do córrego Jurumirim apresentou fórmula cariotípica de  $16m+20sm+10st+22a$ , número fundamental (NF) igual a 114 e RONS localizadas nos braços curtos de seis pares de cromossomos submetacêntricos (11, 17 e 18) (Figura 1a; Tabela 1). Nos espécimes do ribeirão Cambira, a fórmula cariotípica encontrada foi  $14m+14sm+14st+26a$ , NF = 110, e as RONS foram detectadas nos braços curtos de um par de cromossomos metacêntrico pequeno (par 7), em um par de submetacêntrico (par 10) e um par de acrocêntrico (par 22). Um dos cromossomos do par 10, coincidente com a região de constrição secundária em alguns exemplares (Figura 1b; Tabela 1). Em *H. ancistroides* do córrego Tauá, a fórmula cariotípica foi evidenciada com  $16m+18sm+10st+24a$ , número fundamental igual a 112, e com RONS localizadas também nos braços curtos de um par de cromossomos metacêntrico pequeno (par 7), um par de submetacêntrico (par 13), um par de subtlocêntrico (par 18) e um cromossomo de um par de acrocêntrico (par 23) (Figura 1c; Tabela 1).

## **Análise Aloenzimática**

A análise de 10 sistemas isoenzimáticos das três populações de *H. ancistroides*, permitiu verificar a presença de 17 locos, os quais apresentaram no total 26 alelos. Nos espécimes do córrego Tauá e do ribeirão Cambira foram encontrados locos diagnósticos: Gpi-B e G3pdh-A para a primeira população e Idh-A para a segunda. Além da presença de um alelo exclusivo com uma alta frequência (0,9286) na população do córrego Jurumirim (Tabela 2).

Os valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foram de 0,0080, 0,0224 e 0,0384 para as populações do córrego Jurumirim, ribeirão Cambira e córrego Tauá, respectivamente (Tabela 2). A identidade (I) e distancia genética (D) entre as três populações estão relacionadas na Tabela 3.

## **DISCUSSÃO**

### **Citogenética**

Os *Hypostomus ancistroides* das três localidades analisadas apresentaram número diplóide igual a 68 cromossomos, mas com diferenças na distribuição das fórmulas cariotípicas. Esta é uma divergência macroestrutural relativamente comum nas populações de *Hypostomus* já estudadas: mesmo número diplóide, porém fórmulas cariotípicas distintas (Tabela 1). Acredita-se que esta variação aconteça devido a rearranjos cromossômicos, como os eventos de fissões e fusões cêntricas ocorridos ao longo da evolução cariotípica dos espécimes deste gênero (Artoni e Bertollo, 1996).

No entanto, é possível encontrar também os casos de similaridade, como por exemplo, na análise realizada por Martinez (2009) em duas populações de *H. ancistroides* da bacia do rio Tietê, que verificou a mesma fórmula cariotípica  $8m+10sm+26st+24a$ , em ambas. Assim como Rubert (2007), no estudo de três populações do rio Tibagi e uma do rio Paranapanema, constatou a mesma distribuição

dos cromossomos  $10m+26sm+32st/a$  (Tabela 1), nos espécimes das quatro localidades. Estas descrições indicam que existem populações de *H. ancistroides* citogeneticamente um pouco mais homogêneas (Tabela 1).

Devido as diferentes fórmulas cariotípicas, o número fundamental das populações de *H. ancistroides* também varia, indo de 96 para os indivíduos do rio Piracicaba e Mogi-guaçu (Anderson et al, 2003) até 114 para os espécimes do ribeirão Maringá (Endo et al., no prelo) e do córrego Jurumirim (Tabela 1).

As RONS foram múltiplas nas três populações estudadas, porém com a maioria das marcações localizadas em cromossomos de morfologia distintas, corroborando com a diversidade de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos encontrada na literatura para *H. ancistroides* (Tabela 1). Entretanto, houve algumas características em comum entre as populações deste trabalho e aquelas analisadas por outros autores. É o caso dos espécimes do córrego Jurumirim, que apresentaram marcação de RON no braço curto do terceiro par de cromossomos submetacêntricos, assim como os cascudos do ribeirão Cambira, ribeirão Dourado e ribeirão Maringá (Endo et al., no prelo).

Ainda, as populações do ribeirão Cambira e córrego Tauá coincidiram na presença de regiões impregnadas com prata nos braços curtos do par de cromossomos metacêntricos 7 e no primeiro par de cromossomos acrocêntricos. Artoni e Bertollo (1996), analisando uma população de *H. ancistroides* da bacia do rio Tietê e Rubert et al. (no prelo), no estudo de quatro populações (três do rio Tibagi e uma do rio Paranapanema) classificaram os cromossomos em metacêntricos, submetacêntricos e subtelo-acrocêntricos, e encontraram também marcação de RON no braço curto, do que poderia ser o primeiro par de cromossomo acrocêntrico.

Duas pequenas características são comuns a todas as populações de *H. ancistroides* analisadas até o momento, incluindo as do presente trabalho: 1º) as RONS

são múltiplas, ou seja, são detectadas em mais de um par de cromossomos, estando geralmente em cromossomos submetacêntricos e subtelocêntrico; 2º) as marcações das RONS são encontradas sempre nas extremidades dos braços curtos dos respectivos cromossomos portadores (Tabela 1). Mesmo com estas similaridades aqui discutidas ainda não foi possível estabelecer uma correlação entre as fórmulas cariotípicas ou dos cromossomos portadores das NORs, com a distribuição geográfica das populações de *H. ancistroides*. Embora, todos os dados disponíveis para o gênero e principalmente para a referida espécie, que apresenta uma expressiva variação cariotípica, ampliam a caracterização dos espécimes do gênero *Hypostomus*.

### **Isoenzimas**

A análise das isoenzimas permitiu a detecção de dois locos diagnósticos para *H. ancistroides* do córrego Tauá e um para a população do ribeirão Cambira, através da expressão dos alelos *Gpi-B-b*, *G3pdh-A-b* e *c* para a primeira e *Idh-A-a* e *b* para a segunda população, respectivamente (Tabela 2). Uma análise semelhante entre *H. nigromaculatus* e *H. cf. nigromaculatus* do ribeirão Atlântico (afluente do rio Pirapó, PR), identificou seis locos diagnósticos (*Aat-2*, *Gcdh-1*, *Gpi-A*, *Idh-1*, *Ldh-A*, *Mdh-A*), o que levou os autores a sugerirem que estas populações representariam duas espécies distintas (Ito et al., 2009). No gênero *Neoplecostomus* a análise entre *N. paranensis* (bacia do rio Paranapanema) e *Neoplecostomus* sp. (bacia do rio Corumbá) indicou a presença de seis locos diagnósticos (*Acp-A*, *Adh-A*, *Est-A*, *Gpi-A*, *Ldh-A* e *Ldh-B*) os quais ajudaram na distinção das duas populações (Zawadzki et al., 2004a) contribuindo para a descrição de uma nova espécie, nominada, posteriormente, como *Neoplecostomus corumba* (Zawadzki et al., 2008b).

Na Amazônia Central, Teixeira et al. (2006) complementaram os estudos citogenéticos de piranhas (complexo de *Serrasalmus rhombeus*) da Lagoa Catalão, que

apresentavam dois citótipos ( $2n = 58$  e fórmula cariotípica de  $22m+24sm+2st+10a$ ; e  $2n = 60$  e fórmulas cariotípicas =  $20m+24sm+6st+10a$  e  $20m+24sm+4st+12a$ ), com a análise da enzima esterase-D. A presença de alelos exclusivos com frequência de 0,237 (alelo *Est-D3<sup>1</sup>*) no citótipo com  $2n = 58$ , de 0,041 (alelo *Est-D3<sup>2</sup>*) e 0,959 (alelo *Est-D3<sup>0</sup>*) no citótipo  $2n = 60$  e a ausência destes alelos em parte dos peixes que apresentavam  $2n = 60$  permitiram distinguir mais um citótipo ( $2n = 60B$ ) entre os exemplares analisados.

Um alelo exclusivo (*Idh-B-a*) com alta frequência (0,9286) também foi verificado no presente trabalho para a população do córrego Jurumirim (Tabela 2). Limeira et al. (2009) sugeriram, devido a presença de dois alelos na população de *Rineloricaria pentamaculata* do ribeirão Keller e ausência deles em *R. aff. pentamaculata* do rio São João, associado a algumas diferenças morfológicas relatadas e por pertencerem a mesma bacia (bacia do rio Ivaí), porém separados por uma barreira geográfica, que estas populações estariam passando por um processo de divergência genética levando a distinção das duas espécies. De acordo com Mayr (1977), novos genes são incorporados em populações na condição heterozigota, sendo que os homozigotos só passam a ser frequentes muito depois dos heterozigotos.

Em relação à variabilidade genética, verificou-se que as três populações analisadas apresentaram valores baixos (Tabela 2) comparados com a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) para peixes de água doce que é de 0,051 (Ward et al., 1992). Já as populações de *H. ancistroides* do rio Corumbá (GO) (Zawadzki et al., 2008c) e do reservatório de Itaipu (PR) (Zawadzki et al., 2005) tiveram valores similares ( $H_e = 0,052$ ) e acima ( $H_e = 0,082$ ) da heterozigosidade média esperada para peixes, respectivamente. Esta diferença pode estar relacionada com a quantidade de sistemas enzimáticos analisados. Enquanto no presente trabalho foram estudadas 17 isoenzimas,

os peixes do rio Corumbá e do reservatório de Itaipu tiveram 25 sistemas enzimáticos avaliados. Outra consideração para explicar os distintos valores de  $H_e$ , seria a distribuição das populações aqui analisadas, que foram coletadas em pequenos córregos, o que facilitaria o efeito de processos endogâmicos entre os espécimes (Zawadzki et al., 2008c).

No entanto, embora as populações do ribeirão Cambira e do córrego Tauá tenham apresentado locos diagnósticos, o valor da identidade genética (I) entre os peixes analisados destes dois locais ( $I = 0,9365$ ), foi acima daquele considerado para indivíduos de uma mesma espécie, que seria maior que 0,085 (Thorpe e Solé-Cava, 1994). Assim como a população do córrego Jurumirim apresentou  $I = 0,8256$  em relação aos peixes do córrego Tauá e  $I = 0,7740$  em relação aos espécimes do ribeirão Cambira.

Desta forma, considerando os dados citogenéticos obtidos para *H. ancistroides*, no qual as populações apresentaram fórmulas cariotípicas e/ou número e localização de RONS variáveis e em contrapartida os dados aloenzimáticos que mostraram pouca variabilidade genética, sugerimos a ampliação dos estudos com estas duas técnicas a fim de obter-se uma melhor compreensão da estrutura citogenética e alélica para a espécie em questão.

## REFERÊNCIAS

- Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F (2006) Karyotypic relationship among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical. *Genetica* 128:1-9.
- Armbruster JW (2003) The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa* 249: 1-60.

Armbruster JW, de Souza LS (2005) *Hypostomus macushi*, a new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from Guyana. *Zootaxa* 920: 1-12.

Armbruster JW, Tansey LA, Lujan NK (2007) *Hypostomus rhantos* (Siluriformes: Loricariidae), a new species from southern Venezuela. *Zootaxa* 1553: 59-68.

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

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 2: 103-120.

Birindelli JLO, Zanata AM, Lima FCT (2007) *Hypostomus chrysostiktos*, a new species of armored catfish (Siluriformes: Loricariidae) from rio Paraguaçu, Bahia State, Brazil. *Neotro Ichthyol* 5: 271-278.

Boyer SH, Fainer DC, Naughton MA (1963) Myoglobin inherited structural variation in man. *Science* 140: 1228-1231.

Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev. Fish Biol Fisheries* (no prelo)

Carvalho PH, Weber C (2004) Five new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the middle and lower Amazon System. *Rev Suisse Zool* 111: 953-978.

Carvalho PH, Lima FCT, Zawadzki CH (2010) Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. *Neotr Ichthyol* 8: 39-48.

Casatti L (2002) Alimentação dos peixes em um riacho do parque estadual morro do diabo, bacia do alto rio Paraná, sudeste do Brasil. *Biota Neotr* 2: 1-14.

Casatti L, Rocha FC, Pereira DC (2005) Habitat use by two species of *Hypostomus* (Pisces, Loricariidae) in Southeastern Brazilian Streams. *Biota Neotr* 5: 1-9.

Cestari MM (1996) Estudos citogenéticos e genético-bioquímicos em peixes do gênero *Serrasalmus* (Characiformes). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. Tese. 232p.

Endo, KS, Martinez ERM, Zawadzki CH, Paiva LRS, Júlio-Júnior HF. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scient Biol Sci* (no prelo).

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experimentia* 8: 1014-1015.

Ito KF, Renesto E, Zawadzki CH (2009) Biochemical comparison of two *Hypostomus* populations (Siluriformes, Loricariidae) from the Atlântico stream of the upper Paraná river basin, Brazil. *Genet Mol Biol* 32: 51-57.

Janko K, Flajshans M, Choleva L, Bohlen J, Slechtová V, Rabová M, Lajbner Z, Slechta V, Ivanova P, Dobrovolov I, Culling M, Persat H, Kotusk J, Ráb P (2007) Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic

distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination. J Fish Biol 71: 387-408.

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

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

Limeira DM, Renesto E, Zawadzki CH (2009) Allozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí river, upper Paraná river basin, Brasil. Genet Mol Biol 32: 431-435.

Martinez ERM (2009) Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e sequências de DNA. Tese. Universidade Estadual Paulista. 106p.

Mayr E (1977) Populações, espécies e evolução. Tradução: Reichardt, H. São Paulo: Universidade de São Paulo, 485p.

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

Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH (1996) Proteins: Isozyme. Electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BM (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Massachusetts, p. 51-120.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Pérez JE, Gaviria JI, Harrison I, Rossi AR, Sola L (2007) Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *M. curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. *Interciência* 32: 757-762.

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

Paiva S, Renesto E, Zawadzki CH (2005) Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genet Mol Biol* 28: 370-375.

Rubert M (2007) Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (Loricariidae: Hypostomiinae). Dissertação. Universidade Estadual de Londrina. 105p.

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 Cytogen* (no prelo).

Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem Genet* 4: 297-320.

Teixeira AS, Nakayama CM, Porto JIR, Feldberg E (2006) Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766) from Lake Catalão. *Genet Mol Biol* 29: 498-502.

Thorpe JP, Solé-Cava AM (1994) The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool Scr* 23: 3-18.

Yeh FC, Yang R, Boyle, T (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window - Based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research.

Ward RD, Skibinski DOF, Woodwark M (1992) Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evol Biol*, 26: 73-159.

Weber C (2003) Family Loricariidae: subfamily Hypostominae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ (ed) Check list of the freshwater fish of South America. Edipucrs, Porto Alegre, pp 351-372.

Zawadzki CH, Alves AL, Renesto E, Oliveira C (2004a) Biochemical evidence of a possible new species of *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Bioch Syst Ecol* 32: 573-582.

Zawadzki CH, Renesto E, Paiva S, Lara-Kamei MCS (2004b) Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica* 121: 251-257.

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

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

Zawadzki CH, Pavanelli CS, Langeani F (2008b) *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil, with description of three new species. *Zootaxa* 1757: 31-48.

Zawadzki CH, Renesto E, Mateus RP (2008c) Allozyme analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Corumbá, upper rio Paraná basin, Brazil. *Biochem Genet* 46: 755-769.

Zawadzki CH, Weber C, Pavanelli CS (2008d) Two new species of *Hypostomus* Lacépède (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. *Neotr Ichthyol* 6: 403-412.

Zawadzki CH, Weber C, Pavanelli CS (2010) A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. *Neotr Ichthyol* 8: 719-725.

**Tabela 1.** Dados citogenéticos de populações de *Hypostomus ancistroides*. (NF = número fundamental; Ref. = referência; bc = braço curto; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; t = telocêntrico; a = acrocêntrico)

Localidade	Fórmula cariotípica	NF	Nº de crom. com NOR	Posição da NOR	Ref.
Cór. Campo Novo; Bauru, SP; bacia do rio Tietê	4m+16sm+22st+26a	110	4	bc - st (17, 19)	4
Cór. Carrapato; Penápolis, SP; bacia do rio Paraná	8m+6sm+26st+28a	108	4	bc - st (10, 12)	4
Cór. Ximbuá; Ourizona, PR; bacia do rio Ivaí	8m+10sm+18st+32a	104	3	bc - m (3); sm (5, 9)	6
Rio Paraitinga; Salesópolis, SP; bacia do rio Tietê	8m+10sm+18st+32a	104	4	bc - st (13, 14)	4
Cór. Jacutinga; Bofete, SP; bacia do rio Tietê	8m+10sm+26st+24a	112	4	bc - st (11, 18)	4
Rio Capivara; Botucatu, SP; bacia do rio Tietê	8m+10sm+26st+24a	112	6	bc - st (12, 15, 19)	4
Rio Araquá; Botucatu, SP; bacia do rio Tietê	10m+4sm+28st+26a	110	4	bc - st (17, 21)	4
Rio Novo; Avaré, SP; bacia do rio Paranapanema	10m+10sm+24st+24a	112	4	bc - st (12, 13)	4
Rib. Três Bocas; PR; bacia do rio Tibagi	10m+26sm+32st/a	104	8	bc - st/a (19, 20, 21, 22)	7
Rio Taquari; PR; bacia do rio Tibagi	10m+26sm+32st/a	104	8	bc - st/a (19, 20, 21, 22)	7
Rio Águas das Pedras; PR; bacia do rio Tibagi	10m+26sm+32st/a	104	8	bc - st/a (19, 20, 21, 22)	7
Rio Água do Pato; SP; bacia do rio Paranapanema	10m+26sm+32st/a	104	8	bc - st/a (19, 20, 21, 22)	7
—————	10m+27sm+31a/t ♂	105	—	—	1
—————	10m+28sm+30a/t ♀	106	—	—	1
Rib. Dourados; Mandaguari, PR; bacia do rio Pirapó	14m+12sm+18st+24a	112	2	bc - sm (9,10)	6
Rio Piquiri, Formosa do Oeste, PR, bacia do rio Paraná	14m+14sm+8st+32a	104	—	—	5
Rib. Cambira; Cambira, PR; bacia do rio Ivaí	14m+14sm+14st+26a	110	6	bc - m (7); sm (10), a (22)	8
Rib. Maringá; Maringá, PR; bacia do rio Pirapó	16m+12sm+18st+22a	114	5	bc - m (5); sm (11); st (15)	6
Cór. Tauá; Maringá, PR; bacia do rio Pirapó	16m+18sm+10st+24a	112	7	bc - m (7); sm (13); st (19); a (23)	8
Rio Piracicaba e rio Mogi-Guaçu; bacia do rio Paraná	16m+18sm+34st/a	96	6	bc - sm (10, 17); st/a (18)	2
Cór. Jurumirim; Itapetininga; bacia do rio Tietê	16m+20sm+10st+22a	114	6	bc - sm (11, 14, 17)	8
Rio Araquá; SP; bacia do rio Tietê	18m+10sm+12st+28a	108	6	bc - m (6); sm (13, 14)	3

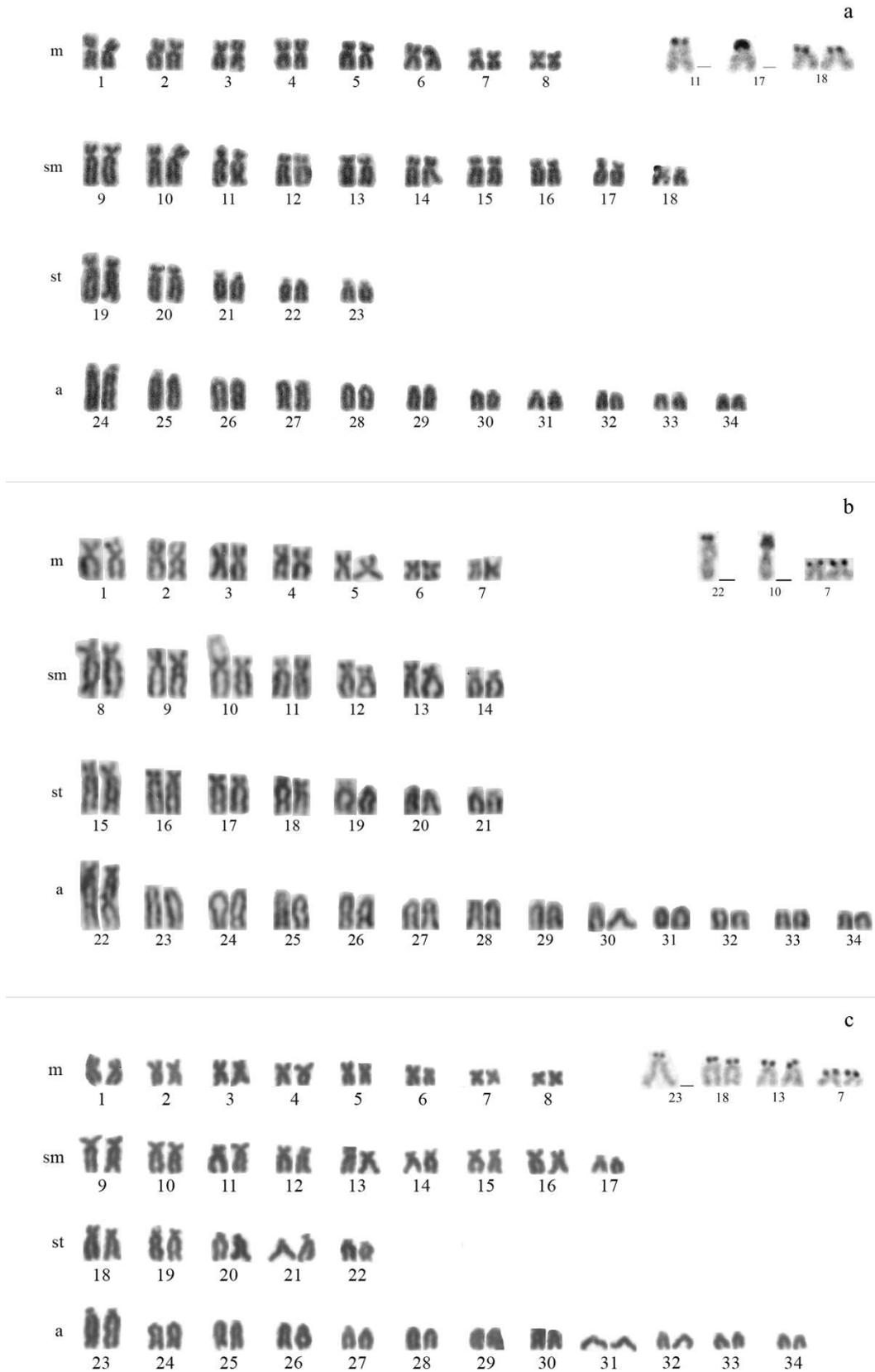
1. Michele et al., 1977; 2. Artoni e Bertollo, 1996; 3. Alves et al., 2006; 4. Martinez, 2009; 5. Bueno et al., no prelo; 6. Endo et al., no prelo; 7. Rubert et al., no prelo. 8. Presente estudo.

**Tabela 2.** Frequências alélicas, número de indivíduos analisados (n), número de locos polimórficos (P), porcentagem de locos polimórficos (P%), número de alelos por loco (K), heteroziguidade média obtida ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) das populações de *H. ancistroides*. Em parênteses está o desvio padrão e em negrito os locos diagnósticos.

Locos	Alelos	Córrego Jurumirim	n	Ribeirão Cambira	n	Córrego Tauá	n
Aat-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
Aat-B	<i>a</i>	1,0000	20	1,0000	31	1,0000	27
Acp-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
Adh-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	0,9833	30
	<i>b</i>	—		—		0,0167	
Gdh-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
Gpi-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
<b>Gpi-B</b>	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	—	30
	<i>b</i>	—		—		<b>1,0000</b>	
<b>G3pdh-A</b>	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	—	29
	<i>b</i>	—		—		<b>0,9138</b>	
	<i>c</i>	—		—		<b>0,0862</b>	
G3pdh-B	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	0,6552	30
	<i>b</i>	—		—		0,3448	
<b>Idh-A</b>	<i>a</i>	—	21	<b>0,9032</b>	31	—	30
	<i>b</i>	1,0000		—		1,0000	
	<i>c</i>	—		<b>0,0968</b>		—	
Idh-B	<i>a</i>	0,9286	21	—	31	—	30
	<i>b</i>	0,0714		1,0000		1,0000	
Ldh-A	<i>a</i>	1,0000	21	0,8871	31	1,0000	28
	<i>b</i>	—		0,1129		—	
Ldh-B	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	27
Mdh-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
Mdh-B	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
Mdh-C	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
Sod-A	<i>a</i>	1,0000	21	1,0000	31	1,0000	30
P		1		2		3	
P%		5,88		11,76		17,65	
K		1,0588		1,1176		1,1765	
$H_o$		0,0084 (0,0346)		0,0209 (0,0614)		0,0121 (0,0421)	
$H_e$		0,0080 (0,0330)		0,0224 (0,0635)		0,0384 (0,1154)	

**Tabela 3.** Valores da distância (D) e identidade (I) genética de Nei (1978), indicados respectivamente, abaixo e acima da diagonal, para as populações de *Hypostomus ancistroides*.

<b>Localidades</b>	Córrego Jurumirim	Ribeirão Cambira	Córrego Tauá
Córrego Jurumirim	—	0,7740	0,8256
Ribeirão Cambira	0,2562	—	0,9365
Córrego Tauá	0,1917	0,0656	—



**Figura 1.** Cariótipo de *Hypostomus ancistroides* do córrego Jurumirim (a), ribeirão Cambira (b) e córrego Tauá (c). Ao lado estão os cromossomos portadores da NOR.

## **Anexos**

## Genetica

### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen

### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- **Journal article**  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8  
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:  
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329
- **Article by DOI**  
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- **Book**  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California  
Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see  
[www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)  
For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- **EndNote style (zip, 3 kB)**

### Table

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

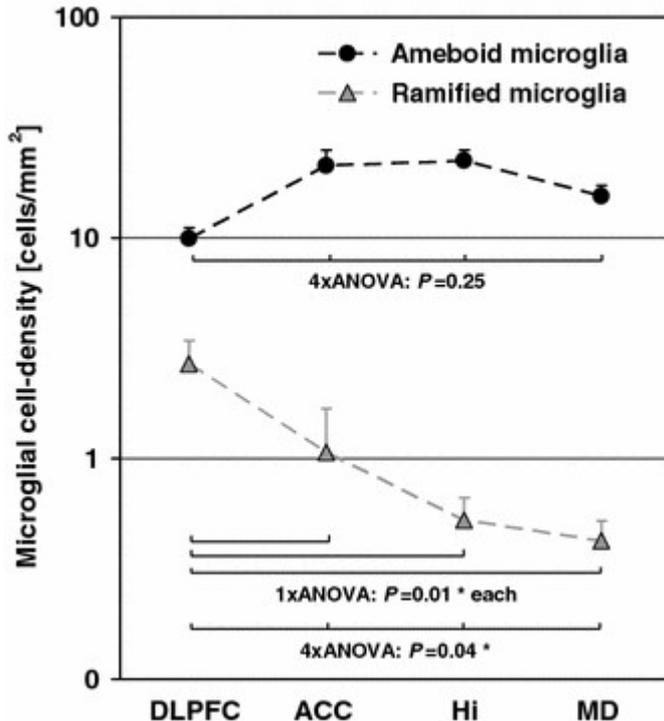
### ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

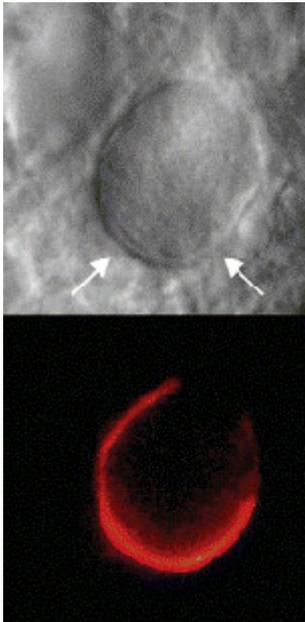
### Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

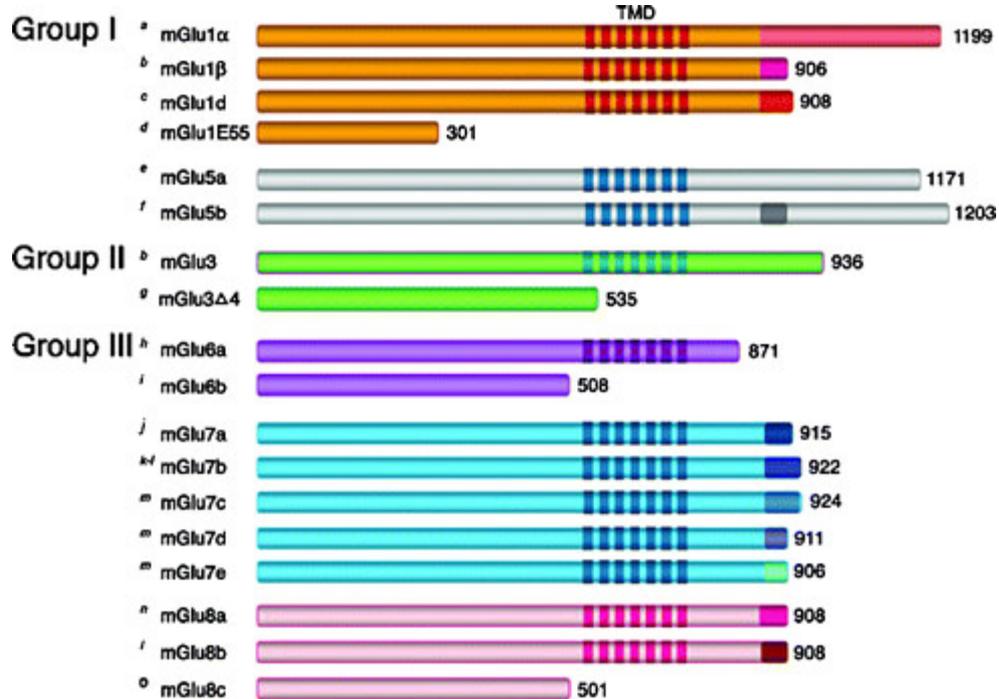
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

#### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another

when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

## **ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### **Submission**

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### **Audio, Video, and Animations**

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### **Text and Presentations**

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### **Spreadsheets**

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### **Specialized Formats**

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### **Collecting Multiple Files**

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### **Numbering**

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

### **Captions**

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### **Processing of supplementary files**

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

## **AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### **Open Choice**

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- Springer Open Choice

### **Copyright transfer**

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

### **Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### **Color illustrations**

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### **Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### **Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Submission of papers](#)

### Scope and policy

**Genetics and Molecular Biology** (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board, are reviewed by the Associate Editor and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

### Submission of papers

#### 1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief  
Genetics and Molecular Biology  
E-mail: [editor@gmb.org.br](mailto:editor@gmb.org.br)

#### 2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

**a)** The manuscript that must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment that may incur during the editorial process.

**b)** An accompanying cover letter, signed by the corresponding author, stating that the data have not being published and are

not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. It must also inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission. Possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must be disclosed.

**c)** An electronic copy of the text, tables and figures, including supplementary material to be published online only. Formats for text are Word or RTF in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h).

**d)** Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

### **3. Categories of Contribution**

#### **3.1. Research Articles**

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by

commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

*Introduction* - Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested byNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data

must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilopthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

*Sample book citation:*

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

*Sample chapter-in-book citation:*

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

*Sample electronic article citation:*

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *Plos Biol* 2:194-205.  
<http://www.plosbiology.org>.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

*Sample Internet resource citation:*

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software,

[http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid\\_design.htm](http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm)  
(September 4, 2005)

g) **Tables** must be in Word format prepared with table tool, inserted at the end of the main text file, each table starting on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic

numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations can be accepted.

Figure legends must be included in the main text file and should be typed on a new page that immediately follows the tables.

i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** reports of experiments on live vertebrates must include a statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, Supplementary material should be in PDF, JPEG or GIFF formats. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file,

containing the following statement: Supplementary material - the following online material is available for this article:

- Table S1 < short title >
- Figure S1 - < short title >

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

### **3.2 Short Communications**

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

### **3.3 Letters to the Editor**

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

### **3.4 Review Articles**

Review Articles are welcome. The Editor should be contacted prior to submission.

### **3.5 Book Reviews**

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

### **3.6 History, Story and Memories**

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

## **4. Proofs and Copyright Transfer**

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

## **5. Reprints**

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.