

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GABRIELA ZAVAN DO VALE

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Ancistrus* KNER, 1854 DA REGIÃO
SUL DO BRASIL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**SANTA HELENA
2018**

GABRIELA ZAVAN DO VALE

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Ancistrus* KNER, 1854 DA REGIÃO
SUL DO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo.

Orientador: Prof. Vanessa Bueno

**SANTA HELENA
2018**

GABRIELA ZAVAN DO VALE

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Ancistrus* KNER, 1854 DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 10 de Dezembro de 2018, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O aluno foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Erika Izumi
UTFPR

Prof. Dr. Daian G. P. de Oliveira
UTFPR

Prof. Dra. Vanessa Bueno
Orientador - UTFPR

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

Dedico este trabalho para aqueles que me apoiaram em todos os momentos da graduação e especialmente minha boa força de vontade que permitiu chegar até o final.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram do meu lado, meus pais, família e amigos. Em especial tenho que agradecer aos meus irmãos João e Natalia por nunca me deixarem esquecer que eu preciso estar de pé para enfrentar a vida. Minha amiga Kelin Richter, por aguentar as coisas que falo e meus tropeços e mesmo assim nunca sair do meu lado e fazer parte da pessoa que sou hoje. Meu amigo Rafael Freire, por ter enfrentado muitos problemas junto comigo e me ensinar a ser forte. E sem dúvida uma gratidão eterna para minha orientadora e amiga Vanessa Bueno.

RESUMO

ZAVAN, Gabriela. **Análise citogenética de *Ancistrus* Kner, 1854 da região Sul do Brasil**. 2018. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2018.

O objetivo deste trabalho foi realizar a análise citogenética em peixes que pertencem ao gênero *Ancistrus*. A coleta foi realizada em Águas Mornas-SC, na bacia do rio Cubatão e na cidade de Santa Helena, na bacia do Rio Paraná 3. Os rins foram dissociados em solução de cloreto de potássio após extraídos, e colocados em uma solução de fixação. Os cromossomos foram tratados com o protocolo de coloração por Giemsa, precipitação por prata, bandamento C e FISH. O número diploide foi de $2n=49$ e $2n=50$ dos peixes coletados na bacia do Paraná 3, $2n=51$ e $2n=52$ coletados na bacia do Rio Cubatão. A fórmula cariotípica foi de $29m. + sm. 23a. + t.$ em 3 fêmeas, $22m. + sm. 27a. + t.$ em 2 fêmeas, $21m. + sm. 30a. + t.$ em um macho e uma fêmea e $28m. + sm. 22a. + t.$ em 3 machos e 2 fêmeas. As AgRONS foram encontradas próximas ao centrômero em um par de cromossomos acrocêntricos nos peixes de Santa Helena, nos peixes coletados no Rio Cubatão a AgRON apareceu em um único cromossomo acrocêntrico. As regiões ricas em heterocromatina se mostraram na maioria dos cromossomos nas regiões teloméricas e centroméricas em todos os peixes. O gênero *Ancistrus* possui uma ampla variação no número diploide e estrutura da heterocromatina constitutiva. Apesar disso, as AgRONS são relativamente constantes.

Palavras chave: Citogenética. *Ancistrus*. Cromossomos.

ABSTRACT

ZAVAN, Gabriela. **Cytogenetic analysis of *Ancistrus* Kner, 1854 in Southern Brazil**. 2018. 26 f. Work of conclusion of course (Bachelor's Degree in biological sciences), Coordination of the course of degree in biological sciences, Federal Technological University of Paraná. Santa Helena, 2018

The objective of this work was to perform cytogenetic analysis in fish species belonging to the genus *Ancistrus*. The collection was held in Águas Mornas, Cubatão River basin and in the town of Santa Helena, in the basin of the Paraná River 3. Kidneys were dissociated in potassium chloride solution and placed in a fixation solution. Chromosomes were treated with the Giemsa staining protocol, silver precipitation, C banding and FISH. The karyotype formula was 29m. + sm. + 23a. + t. in 3 females, 22m. + sm. + 27a. + t. on 2 females, 21m. + sm. 30a. + t. in one male and one female and 28m. + sm. 22a. + t. in 3 males and 2 females The AgRONS were found near the centromere in a pair of acrocentric chromosomes in fish of Saint Helena, in fish collected in the Rio Cubatão to AgRON appeared in a single acrocentric chromosome. The regions rich in heterochromatin were in most telomeric regions and centromeric chromosomes in all fish. The genus *Ancistrus* possess a wide variation in the number and structure of the constitutive heterochromatin diploid. Nevertheless, the relatively constant AgRONS.

Keywords: Cytogenetics. *Ancistrus*. Chromosomes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.2	Bacias hidrográficas do rio Paraná	12
3.2	Bacias hidrográficas de Santa Catarina.....	14
3.3	Gênero <i>Ancistrus</i>	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
5	RESULTADOS.....	19
6	DISCUSSÃO.....	2424
7	CONCLUSÕES	25
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25

1 INTRODUÇÃO

Segundo Guerra (1988) a citogenética pode ser compreendida como todo e qualquer estudo que abrange o estudo do cromossomo, sendo ele estudado isoladamente ou em conjunto com a célula, condensado ou distendido. O material genético pode ser estudado focando na sua estrutura morfológica, função e duplicação, assim como sua variação dentro da evolução de um organismo. (BRAMMER., ZANOTTO., CAVERZAN. 2007).

Desde o início, a citogenética impulsionou a genética molecular e gerou embasamento para novas tecnologias, como a biotecnologia e a engenharia genética. Sendo assim, a citogenética pode ser dividida em dois campos, a citogenética clássica e a citogenética molecular. A citogenética clássica tem como foco de estudo a análise cromossômica, principalmente durante a metáfase, que ainda é a melhor forma de observar o material genético de um organismo eucarioto de maneira a encontrar os cromossomos em blocos individuais. Técnicas moleculares estão permitindo um melhor detalhamento dos genes, característica principal no estudo da citogenética molecular. Em uma única foto é possível registrar a presença e posição de um determinado gene e utilizar esses dados para determinar a posição evolutiva de um organismo, por exemplo. (BRAMMER., ZANOTTO., CAVERZAN. 2007; GUERRA. 1988).

Os peixes são os organismos com uma posição importante na filogenia dos vertebrados, sendo eles o grupo mais numeroso e diversificado. São conhecidas por volta de 25.000 espécies, o que representa cerca da metade das espécies conhecidas entre todos os vertebrados conhecidos. Se formos considerar as informações de diversidade biológicas dos peixes, não existe dúvida sobre a adaptação que ocorreu com esse grupo. Existem espécies altamente especializadas, assim como espécies com alimentação generalizada, além de outras que são parasitas. Quanto ao sistema sexual, é possível encontrar todos os sistemas sexuais dentro do grupo, espécies bissexuais, hermafroditas, fecundação interna e externa. Espécies que apresentam dimorfismo sexual e outras não, assim como também existem espécies com ritual de acasalamento. (MARIOTTO, 2008).

Este projeto vem com o objetivo de agregar ao conhecimento da evolução do gênero *Ancistrus* no âmbito de análise citogenética clássica e molecular, a fim de agregar resultados sobre este grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Fazer a análise citogenética e molecular de espécies do gênero *Ancistrus* coletados na Bacia do Rio Paraná e na Bacia do Rio Cubatão.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o levantamento de espécies de *Ancistrus* encontradas no rio Paraná 3 na região de Santa Helena – PR e no Rio Cubatão na cidade de Águas Mornas-SC;
- Caracterizar cariotipicamente as espécies/populações através de técnicas citogenéticas básicas (Giemsa, bandamento-C e impregnação por prata);
- Caracterizar cariotipicamente as espécies/populações através de técnicas de genética molecular (hibridização *in situ* com sondas fluorescentes de DNAr 5S, 18S e sondas teloméricas);
- Tendo em vista a grande diversidade de sistemas de cromossomos sexuais encontrada neste grupo de peixes, tem como objetivo verificar a possível ocorrência de sistemas sexuais nas espécies analisadas e identificar os prováveis rearranjos que atuam na diversidade de cromossomos sexuais;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bacia hidrográfica do rio Paraná

Podemos definir “Bacia Hidrográfica”, segundo o site Só Geografia (2018), como um “conjunto de terras drenadas por um rio e seus afluentes”. Para Barella, et

al. (2000) o alto relevo causa o que é chamado de divisores de água fazendo com que a água da chuva escoe pelo solo, parte formando os rios e riachos e parte infiltrando no solo formando as nascentes e os lençóis freáticos. Os divisores de águas são os responsáveis pela limitação de uma Bacia Hidrográfica das demais. Os primeiros rios são formados por riachos que brotam de regiões montanhosas e em devido momento se juntam a outros riachos aumentando o volume de água. Essa mesma lógica segue com os rios formados, onde seu volume de água aumenta até chegar ao oceano.

Podemos dizer que a Bacia com maior capacidade de instalação de usinas hidroelétricas e com maior demanda do país é a Bacia do Rio Paraná. Esta se localiza em seis Estados brasileiros e no Distrito Federal. Possui 57 grandes reservatórios, onde seus principais afluentes são os rios Grande, Paranapanema, Iguaçu, Paranaíba e Tietê. (ITAIPU BINACIONAL, 2010).

No Estado do Paraná existem 16 Bacias Hidrográficas, sendo elas: Bacia do Ribeira, Bacia do Iguaçu, Bacia do Piquiri, Bacia do Itararé, Bacia Litorânea, Bacia do Cinzas, Bacia do Tibagi, Bacia Pirapó, Bacia do Ivaí, Bacias do Paranapanema 1, 2, 3 e 4, e a Bacia que será mais destacada no atual trabalho, Bacia do Paraná 1, 2 e 3. As divisões das Bacias Hidrográficas do Paraná foram baseadas em regiões hidrográficas limitadas por divisores de águas seguindo a Resolução “Nº 024/2006/SEMA”. Além do mapeamento das Bacias Hidrográficas, o estado do Paraná é subdividido e/ou agrupado considerando as características socioeconômicas e ocupação de solo. Ao total foi obtido 12 Unidades Hidrográficas do estado do Paraná descritas na Resolução nº. 49 do Conselho Estadual de Recursos Hídricos - CERH/PR em 2006. (SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS, 2013; SUDERHSA, 2006).

A bacia do rio Paraná 3 tem como afluentes o rio São Francisco, São Francisco Falso, Ocoí e o rio Iguaçu, tendo suas nascentes em Cascavel, Céu Azul, Toledo e Matelândia respectivamente. É nela que está instalada a Hidroelétrica de Itaipu, maior geradora de energia do mundo. A instalação da hidroelétrica causou uma grande mudança nas margens do rio afetando o meio físico, biológico e social, devido a isso, atualmente a bacia é delimitada por uma Área de Proteção Ambiental – APA. A barragem de Itaipu cobriu o que era considerado um arquipélago fluvial.

(SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS, 2013; SUDERHSA, 2006).

Em 2007 Langeani, et al fizeram um levantamento da ictiofauna do Alto Paraná, composto pela drenagem do Rio Paraná na qual inclui o atual Reservatório de Itaipu. No resultado foi possível registrar 310 espécies neste rio, as quais foram distribuídas em 11 ordens e 38 famílias, de forma que 80% das espécies coletadas pertencem as ordens Siluriformes e Characiformes. Esse resultado se mostrou com maior número de espécies do que os trabalhos anteriores, na discussão os autores colocam que um dos motivos para esse resultado foi a construção da barreira do Reservatório de Itaipu, causando a junção entre os trechos do Alto Paraná com o Médio Paraná destruindo a barreira natural que havia ali, a denominada “Sete Quedas”. Das 310 espécies, 236 são autóctones (se originam no mesmo local onde ocorrem), 67 alóctones (se originam em locais diferentes onde ocorrem) e 7 são exóticas (não ocorrem naturalmente em determinado local). Entre os peixes coletados, o único indivíduo do gênero *Ancistrus* encontrado foi o *A. cirrhosus* (Valenciennes, 1836) (Siluriformes: Loricariidae) no qual apresenta ocorrência nativa e origem autóctone. (CASTRO, MENEZES, 1998; BONETTO, 1986; AGOSTINHO, JÚLIO-JR., 1999).

3.2 Bacias hidrográficas de Santa Catarina

A Agencia Nacional de Águas reuniu informações de diversos estudos que apontaram a existência de 221 postos fluviométricos e 443 postos pluviométricos no Estado de Santa Catarina e circunvizinhança. Os rios que drenam esse estado são compostos por três Regiões Hidrográficas, Região Hidrográfica do Paraná, do Uruguai e também do Atlântico Sul. Entre esses corpos de água que compõem a hidrografia de Santa Catarina, a Constituição Federal de 1988 os classificou conforme a região que abrangem. Corpos de água da União são aqueles que banham mais de uma área federal ou que formam divisa com a mesma. Os corpos de água do Estado permanecem somente na região do Estado, nascendo e desaguando nessa área. (SANTA CATARINA, 2014; SANTA CATARINA, 2006).

A hidrografia de Santa Catarina possui uma rede hidrográfica dividida em dois sistemas independentes: Vertente do Interior e Vertente Atlântico. Elas são separadas pela Serra Geral que forma um grande divisor de águas. (SANTA CATARINA, 2014).

A Vertente do Interior abrange a Bacia Paraná-Uruguaí, denominada assim por serem bacias com nascentes principais fora do Estado de Santa Catarina. As bacias principais que se localizam nessa Vertente são: Rio Peperi-Guaçu e Rio das Antas no Extremo Oeste (RH 1), Rio Chapecó e Irani no Meio Oeste (RH 2).

A Vertente Atlântico é composta por dois tipos de rios, os que nascem na Serra do Mar e aqueles que se originam na mesma planície. As bacias principais que compõem essa Vertente são: Rio Cubatão (Norte) e Itapocu na Baixada Norte (RH 6), Rio Itajaí-açu no Vale do Itajaí (RH 7), Rio Tijucas, Biguaçu, Cubatão (Sul) e Madre no Litoral Centro (RH 8), Rio Tubarão e D'uma no Sul Catarinense (RH 9), Rio Araraguá, Urussanga e Mampituba no Extremo Sul Catarinense (RH 10).

A bacia do Cubatão do Norte tem como principal função abastecer a cidade de Joinville, cidade mais populosa do estado. O curso superior é direcionado para o abastecimento da cidade, o curso médio da água é utilizado para irrigação e agropecuária, tendo, assim, uma intensa exploração de minério. Já é evidente a contaminação por substâncias orgânicas neste rio. O rio do Braço é o principal receptor do polo industrial do norte de Joinville e causa intoxicação no Rio Cubatão Norte ao desaguar nele. (SANTA CATARINA, 2014).

O Rio Cubatão Sul origina-se da junção do rio Cedro e Bugres na cidade de Bonifácio. O principal problema deste rio é a elevada turbidez que ele apresenta, principalmente em épocas de chuva, devido ao processo de erosão em vários pontos de desmatamento da mata ciliar. (SANTA CATARINA, 2014).

Silveira (2012) realizou um levantamento bibliográfico sobre a ictiofauna do estado de Santa Catarina. Foram registradas 337 espécies, 12 ordens e 43 famílias no período de 1987 a 2012. As ordens com maior frequência foram: Siluriformes, Characiformes e Perciformes. Dentro da Ordem Siluriformes a família com predominância foi a Loricariidae com 86 espécies coletadas. No rio Cubatão Norte e Sul foram registradas 36 espécies de peixes, 8 ordens e 19 famílias. Na bacia hidrográfica do Sudeste Catarinense, onde se localiza o rio Cubatão Sul e Norte, foram

registrados peixes que pertencem ao gênero *Ancistrus* sendo eles: *A. brevipinnis*, *A. cirrhosus*, *A. multispinis*, *A. taunayi* e *A. sp.*

3.3 Gênero *Ancistrus*

A tribo Ancistrini alocada na subfamília Hypostominae, de acordo com Lujan, et al. (2015) é o segundo grupo com maior número de gêneros estudados em sua pesquisa sobre análise molecular da família Loricariidae, no qual o autor deu mais enfoque à subfamília Hypostominae. Ele pôde concluir que a tribo Ancistrini é a que possui maior distribuição dentro da Família Loricariidae. Esses peixes são comumente chamados de “cascudinhos” e apresentam profusões de tentáculos sexualmente dimórficos, separando-os das demais tribos. Seus habitats costumam ser de terras baixas, lânticas e com um fluxo de regiões montanhosas com até 1100 metros acima do nível do mar.

Ancistrini é um grupo complexo que possui alguns gêneros possivelmente não monofiléticos e mal diagnosticados (ARMBRUSTER, 2004). A tribo também está entre as com maior diversidade cromossômica em Hypostominae, juntamente com Hypostomini. Porém, ao contrário desta, os números diploides em Ancistrini variam de 34 a 54 cromossomos, com a redução do número diploide (OLIVEIRA et al., 2009; MARIOTTO et al., 2011; 2013). A maior parte dos gêneros de Ancistrini apresenta espécies com $2n=52$ cromossomos, sendo *Ancistrus* o único gênero onde é observada uma ampla variação no número diploide (OLIVEIRA et al., 2009). A ocorrência de diversas espécies de *Ancistrus* com números diploides inferiores a 52 indica uma evolução cariotípica marcada por fusões cêntricas (ALVES et al., 2003), com outros rearranjos como inversões pericêntricas e translocações originando variação nas fórmulas cariotípicas. Mesmo espécies de *Ancistrus* com 52 cromossomos apresentam uma macroestrutura cromossômica consideravelmente distinta dos outros gêneros de Ancistrini, com uma proporção maior de cromossomos subteloicêntricos e acrocêntricos. Além disso, diferentes sistemas de cromossomos sexuais são observados no gênero, o que indica que estes sistemas possam ter evoluído separadamente ao longo da diferenciação das espécies de *Ancistrus* (OLIVEIRA et al., 2009).

Silva (2016) realizou uma pesquisa que consistiu na análise das sequências repetitivas no gênero *Ancistrus*, onde analisou 42 exemplares coletados na bacia do rio Paranguai, 34 exemplares do Rio Flecha, 9 do Córrego Sangradouro e 19 do Córrego Pari. Seu resultado demonstrou marcações de dois satélites isolados em determinados cromossomos em todos os peixes coletados, na porção centromérica. Em uma das populações foi observado marcação nos cromossomos sexuais, porém a maioria não possuía essa marcação sendo que em algumas populações não foi possível encontrar os cromossomos sexuais.

Segundo Favarato (2014), em uma análise de peixes também do gênero *Ancistrus*, pôde averiguar a quantidade e localização dos sítios de rDNA 18S e 5S, a qual se mostrou com muita variação entre os espécimes coletados. A marcação telomérica apareceu sempre na região terminal do cromossomo, com exceção de duas espécies. Para as sequências repetitivas associadas ao rDNA 5S e às sequências teloméricas já foi sugerido que participam na alteração cariotípica causando uma evolução cromossomal. Como essas sequências, no atual trabalho, podem ser observadas na região intersticial próximas à região de fusão cromossômica é possível relacioná-las com o ponto de fusão cromossômica. Se caso essas sequências forem encontradas em apenas uma cromátide irmã de um par, elas podem significar uma translocação ou deleção causadas por um reparo cromossômico com sequências de repetição telomérica. O número diploide variou entre $2n=34$ e $2n=52$, onde em alguns grupos da mesma espécie o $2n$ era igual para os dois sexos podendo apresentar a mesma fórmula cariotípica ou não. Em outros casos obtive o $2n$ diferente entre macho e fêmea, assim como a fórmula cariotípica. Apenas duas espécies demonstraram a marcação 18S e 5S no mesmo par cromossômico e neste caso em apenas um par, o restante possuía um único par com a marcação 18S e entre um par a oito pares de cromossomos que apresentavam a marcação 5S. Oliveira (2009) concluiu que as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) seguem o mesmo padrão do rDNA 18S e Favarato (2014) corroborou sua hipótese. Já foi proposto que as RONs simples na posição intersticial do cromossomo é uma característica primitiva dentro da família Loricariidae, porém não são todos os indivíduos dentro deste grupo que apresentam essa característica. No estudo de Favarato (2014) apenas duas espécies, de oito, apresentaram as RONs na posição intersticial. Na pesquisa de Silva (2016),

das quatro espécies coletadas foi possível observar RONS simples, porém, na região terminal do cromossomo.

Considerando todos os aspectos levantados, este trabalho tem como objetivo fazer a análise de representantes do gênero *Ancistrus* coletados na bacia do rio Paraná 3 e no rio Cubatão e, assim, comparar os trabalhos já realizados sobre esse gênero. Desta forma será possível agregar nossos resultados aos conhecimentos da filogenia deste grupo, assim como na comparação dos demais grupos pertencentes à família Loricariidae.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies de *Ancistrus* provenientes de afluentes do rio Paraná 3, região de Santa Helena-PR e provenientes do rio Cubatão, foram coletados manualmente por meio de tarrafas. Foi obtido a licença do SISBIO 10522-1. Os peixes foram mantidos vivos em um saco plástico cheio de água do local da coleta com uma bomba de ar dentro para manter a água oxigenada. Ao chegarem no laboratório, foram colocados em aquários de vidro com a mesma água da coleta, em alguns casos foi preciso completar com água da torneira, mas sempre com o cuidado da água estar com a mesma temperatura e pouca quantidade de cloro para não prejudicar os peixes.

O órgão utilizado para a obtenção de células mitóticas foi a porção anterior do rim, que é o órgão hematopoiético do peixe, de acordo com (BERTOLLO et al., 1978). Para melhor obtenção de células em metáfase, foi provocado uma infecção com fermento, sendo injetado 24h antes da coleta do rim. Para a obtenção do rim, o peixe foi colocado em um balde com água e óleo de cravo (misturado com um pouco de álcool para se dissolver melhor na água), o que provocou uma overdose do anestésico. Os rins foram coletados, diluídos e armazenados. As vísceras foram retiradas e jogadas fora, o restante foi fixado para, posteriormente, ser feita a identificação da espécie.

Para os estudos cromossômicos, foi utilizada a técnica de coloração por Giemsa. A determinação das AgRONS foi realizada por meio da impregnação por prata, de acordo com o protocolo publicado por Howell & Black (1980). Para determinar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, foi utilizada a

técnica de bandamento C descrita por Sumner (1972), com adaptações propostas por Lui et al. (2012). A classificação da heterocromatina de acordo com a composição de bases nitrogenadas foi realizada através da coloração pelos fluorocromos base-específicos CMA3/DAPI, de acordo com o protocolo proposto por Schweizer (1980). A hibridização *in situ* por fluorescência foi realizada com sondas de DNA ribossomal 5S e 18S, segundo o protocolo de Pinkel et al. (1986) com modificações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho (2008). As sondas de DNAr 5S foi obtidas de acordo com Martins & Galetti (1999), e as sondas de DNAr 18S de acordo com Hatanaka & Galetti (2004). A marcação das sondas foi realizada através de nick translation com digoxigenina-11-dUTP (DNAr 5S) e biotina-16-dUTP (DNAr 18S), e a detecção dos sinais com anti-digoxigenina rodamina (DNAr 5S) e streptavidina-FITC (DNAr 18S), utilizando o DAPI como contra-corante. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) para a montagem dos cariótipos.

5 RESULTADOS

Foram coletados 14 peixes no total, entre eles quatro machos e dez fêmeas, do gênero *Ancistrus*, sendo 8 da Bacia do Paraná 3 e 6 da Bacia do Cubatão. Dentre esses peixes dois deles possuíam o número diploide de $2n=49$ (Bacia do Paraná 3), cinco apresentavam $2n=50$ (Bacia do Paraná 3), dois apresentavam $2n=51$ (Bacia do Cubatão) e três apresentavam $2n=52$ (Bacia do Cubatão). Duas amostras, uma da Bacia do Paraná 3 e a outra da Bacia do Cubatão, tiveram o material coletado de baixa qualidade, do qual não foi possível fazer a análise.

A fórmula cariotípica das amostras apresentou muita variação, sendo elas $29m. + sm. 23a. + t.$ (Figura 1a) em 3 fêmeas, $22m. + sm. 27a. + t.$ (Figura 1d) em 2 fêmeas, $21m. + sm. 30a. + t.$ (Figura 1b) em um macho e uma fêmea e $28m. + sm. 22a. + t.$ (Figura 1c) em 3 machos e 2 fêmeas.

A impregnação por nitrato de prata indicou uma marcação em apenas um cromossomo acrocêntrico na porção terminal do braço curto nos peixes coletados na Bacia do Cubatão (Figura 2b) e uma marcação simples em um par acrocêntrico na porção terminal nos peixes coletados na Bacia do Paraná 3 (Figura 2a). A demarcação

de heterocromatina com bandamento C demonstrou marcações em quase todos os cromossomos variando sua posição dentro dos cromossomos em todas as amostras coletas (Figura 2 c e d).

A análise utilizando o método da FISH indicou uma marcação em dois pares de cromossomos do tipo 5S nos peixes coletados em Santa Catarina (Figura 3d). Nos peixes coletados em Santa Helena foi observado apenas um cromossomo marcado (Figura 3c). Na marcação do tipo 18S, os peixes de Santa Catarina apresentaram diversos cromossomos marcados principalmente na porção média do braço longo (Figura 3b), os peixes de Santa Helena apresentaram apenas um par de cromossomo marcado na região terminal do braço curto (Figura 3a). Esses resultados da FISH foram inconclusivos devido a imprevistos que impossibilitaram melhor análise molecular das amostras.

Tabela 1: Síntese dos resultados obtidos com este projeto, com o sexo M (macho) e F (fêmea), a origem como o local de coleta PR (Cidade de Santa Helena-PR) e SC (Cidade de Águas Mornas-SC), número diploide (2n) e a fórmula cariotípica com m (metacêntrico), sm (submetacêntrico), a (acrocêntrico) e t (telocêntrico). Autoria própria.

	Sexo	Origem	2n	Fórmula cariotípica
Indivíduo 1	M	PR	50	28m. + sm. 22a. + t
Indivíduo 2	M	PR	50	28m. + sm. 22a. + t
Indivíduo 3	F	PR	50	28m. + sm. 22a. + t
Indivíduo 4	M	PR	50	28m. + sm. 22a. + t
Indivíduo 5	F	PR	49	22m. + sm. 27a. + t.
Indivíduo 6	F	PR	50	28m. + sm. 22a. + t.
Indivíduo 7	F	PR	49	22m. + sm. 27a. + t.
Indivíduo 8	F	PR	-	-
Indivíduo 9	F	SC	51	21m. + sm. 30a. + t.
Indivíduo 10	F	SC	-	-
Indivíduo 11	M	SC	51	21m. + sm. 30a. + t.
Indivíduo 12	F	SC	52	29m. + sm. 23a. + t.
Indivíduo 13	F	SC	52	29m. + sm. 23a. + t.
Indivíduo 14	F	SC	52	29m. + sm. 23a. + t.

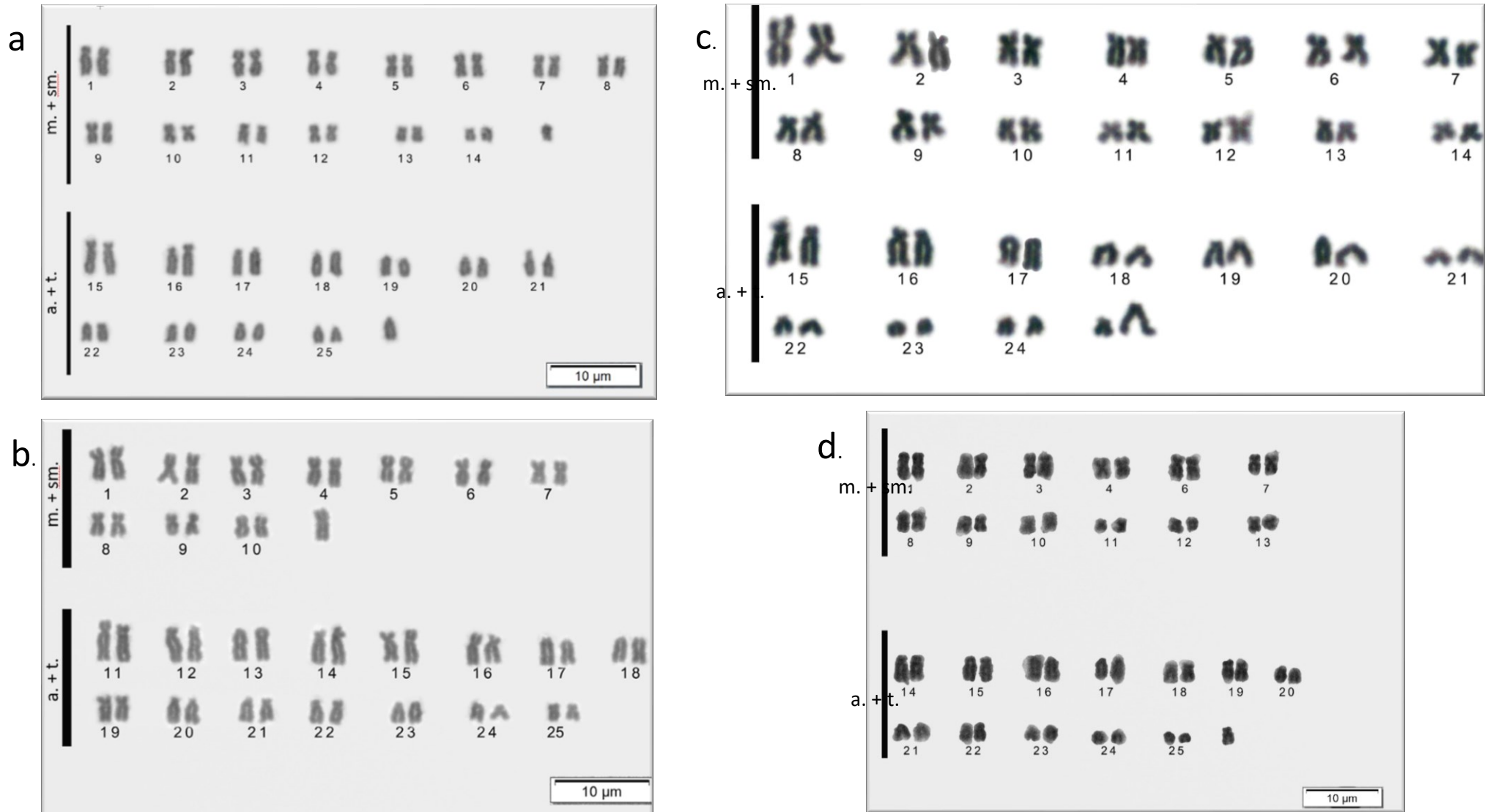


Figura 1: Cariótipo dos indivíduos com número diploide de $2n=52$ coletados na cidade de Águas Mornas-SC (a), cariótipo dos indivíduos com número diploide de $2n=51$ coletados na cidade de Águas Mornas-SC (b), cariótipo dos indivíduos com número diploide de $2n=50$ coletados na cidade de Santa Helena-PR (c) e o cariótipo dos indivíduos com número diploide de $2n=49$ coletados na cidade de Santa Helena-PR (d).

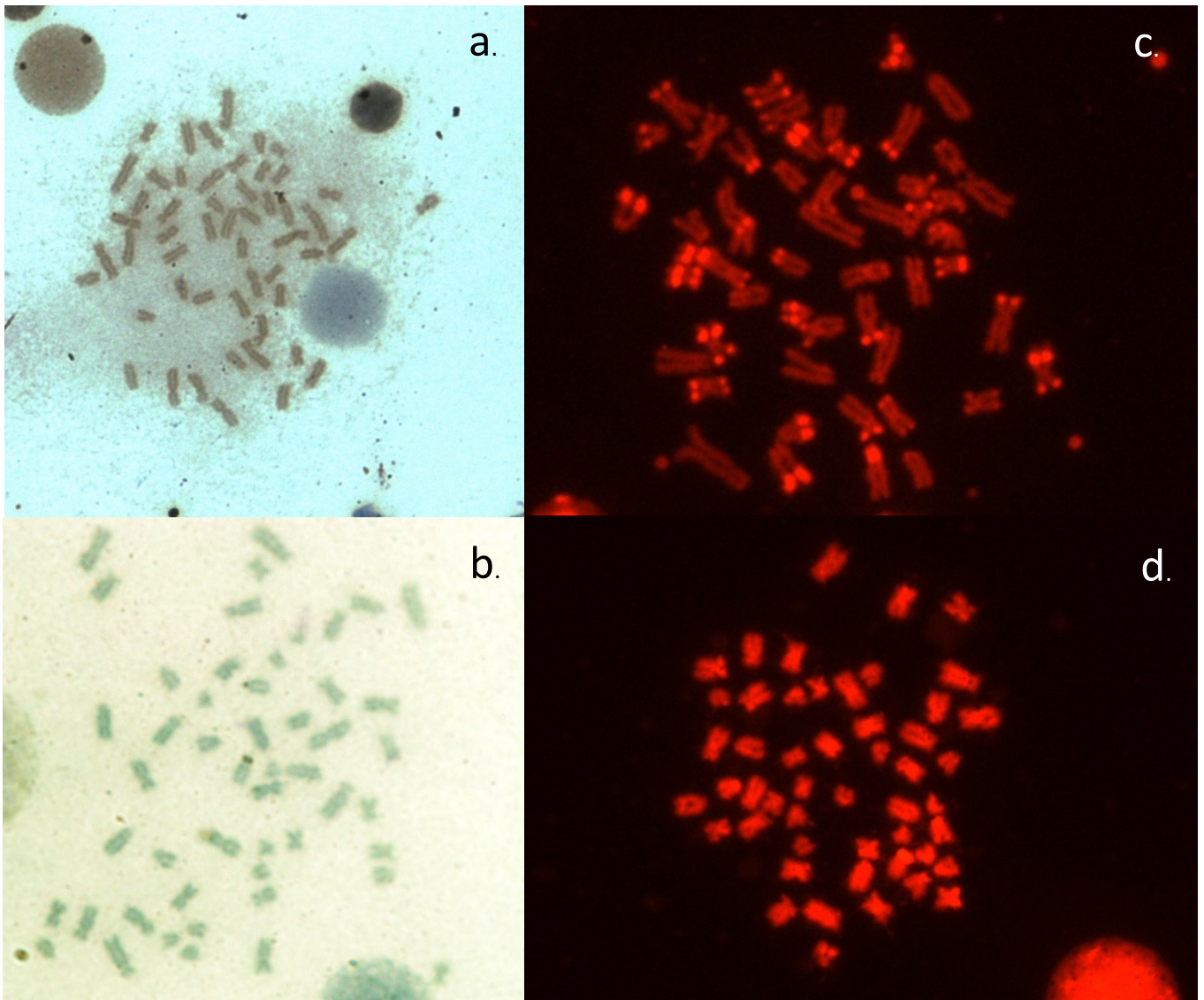


Figura 2: Marcação das AgRONs nas duas populações coletadas em Santa Helena-PR (a) e Águas Mornas-SC (b), e marcação de heterocromatina constitutiva nas duas populações coletadas em Santa Helena-PR (d) e Águas Mornas-SC (c).

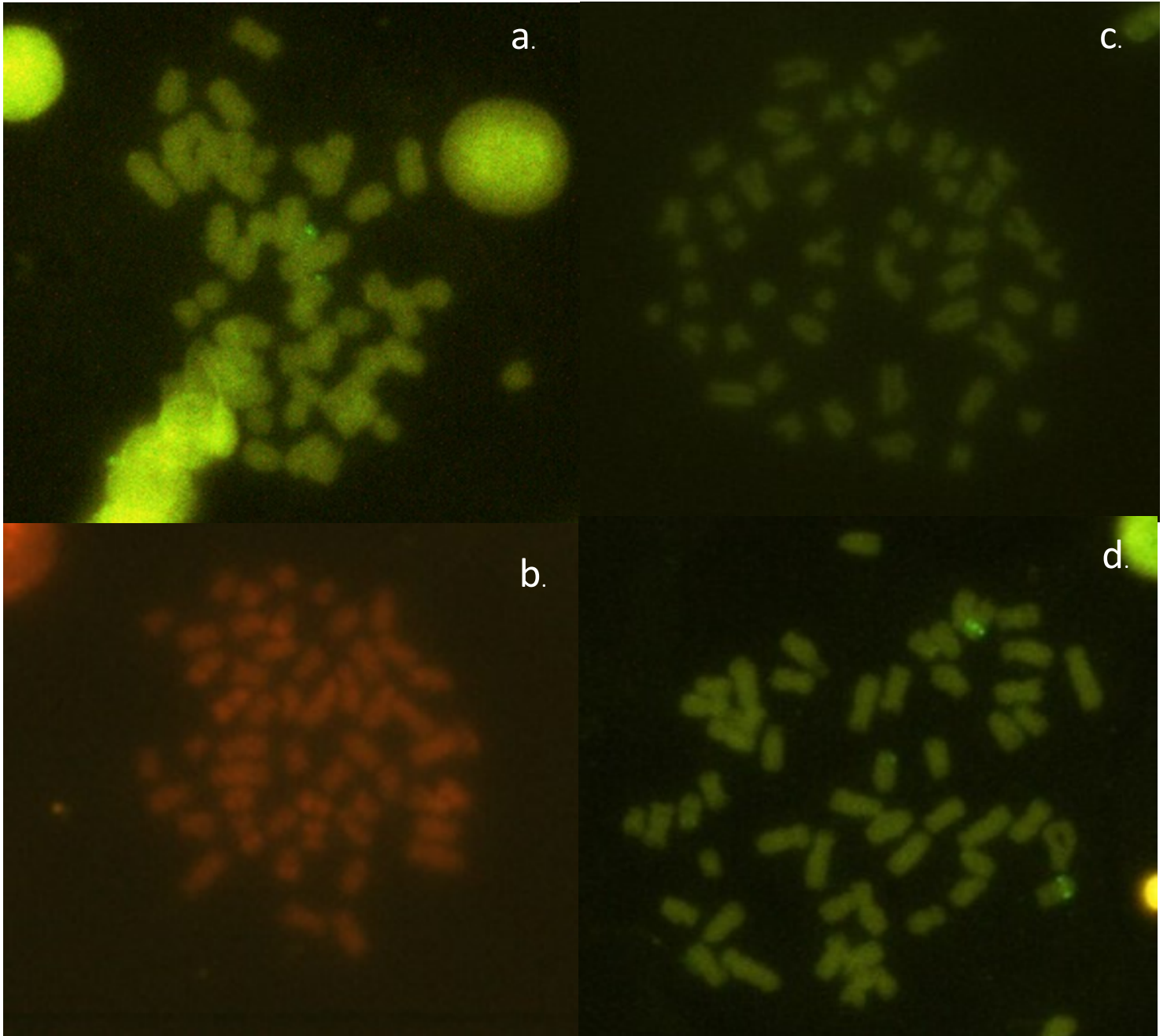


Figura 3: Marcação do sítio de rDNA 18S nas duas populações coletadas em Santa Helena-PR (a) e Águas Mornas-SC (b), e marcação do sítio de rDNA 5S nas duas populações coletadas em Santa Helena-PR (c) e Águas Mornas-SC (d).

6 DISCUSSÃO

O número diploide dos peixes variou dentro de $2n=49$ e $2n=52$. Esse mesmo resultado está dentro do previsto para o gênero, levando em consideração que o número diploide deste grupo varia em torno de $2n=34$ (*Ancistrus cuiabae*, Knaack 1999) e $2n=52$ (*Ancistrus* sp. chamado pelo nome popular de “Purus”). Além de uma ampla variação no número cromossômico em *Ancistrus*, os sistemas sexuais também apresentam grande variação no gênero. (MARIOTTO, et al, 2009; OLIVEIRA, et al, 2009).

A partir desses resultados é possível ver uma diferença razoável nas populações coletadas em ambas bacias. O número diploide dos peixes coletados na bacia do paraná 3 são inferiores à bacia do Cubatão, $2n=49$ e $2n=50$. Alves, et al. (2003), coloca que o gênero *Ancistrus* é caracterizado por um histórico de evolução com grande ocorrência de fusões cêntricas causando uma diminuição no número diploide. Dito isso, podemos inferir que os peixes coletados na bacia do Cubatão estão mais próximos do ancestral comum das espécies pertencentes ao gênero *Ancistrus*.

As fórmulas cariotípica mostram uma variação muito grande. Não só entre os indivíduos de bacias diferentes, mas também entre os indivíduos coletados no mesmo local. Esse dado pode indicar que existem no mínimo duas espécies diferentes do gênero *Ancistrus* em ambas as bacias.

Outra diferença observada foi a demarcação da NOR. Apesar de em todos os casos a NOR aparecer em um cromossomo acrocêntrico, os da bacia do Cubatão possuem um único cromossomo marcado. Essa característica da NOR aparecer em um cromossomo acrocêntrico já foi registrada, como no caso da pesquisa realizada por Rubert (2011), onde foram analisadas 3 espécies do gênero *Ancistrus* da Bacia do Atlântico Sul, entre elas, duas espécies apresentavam as AgRON em um par st-a, o que pode fundamentar o resultado obtido na atual pesquisa que abrange regiões semelhantes. No arranjo dos cromossomos foi possível achar o cromossomo homólogo deste único cromossomo que possui a NOR, podendo indicar que a perda da região da NOR no decorrer da evolução não ocorreu por fissão centromérica ou a NOR do cromossomo homólogo não estava ativa no momento em que foi feita a fixação do material. É quase certo que o sítio da NOR no cromossomo homólogo foi perdido, considerando as muitas metáfases analisadas no atual trabalho, o número

de metáfases que apresentaram mais de um cromossomo marcado pela AgRON foram em números desconsideráveis.

Apesar de todas as diferenças, o bandamento C demonstrou uma semelhança estrutural da heterocromatina entre todos os peixes coletados. As várias marcações em diferentes cromossomos e posições pode indicar uma característica entre as espécies coletadas que foi preservada durante a evolução das mesmas. Um estudo realizado na bacia do estado de Mato Grosso por Mariotto, 2008, indicou que é possível encontrar espécies com variados padrões de heterocromatina constitutiva. Espécies que mesmo entre cromossomos homólogos os blocos de heterocromatina se manifestam em tamanhos e/ou posições diferentes (*Ancistrus* sp 10, *Ancistrus* sp 11, *Ancistrus* sp 12 e *Ancistrus* sp 13). Apesar destes dados, os resultados obtidos com o atual trabalho foram estruturas semelhantes de blocos de heterocromatina constitutiva entre cromossomos homólogos.

7 CONCLUSÕES

Ao finalizar esta pesquisa, é possível concluir que o gênero *Ancistrus* possui uma ampla variação no número diploide e estrutura da heterocromatina constitutiva. Apesar disso, as AgRONs são relativamente constantes, sendo elas encontradas normalmente em um par dos cromossomos st-a.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Ancistrus* se mostrou um grupo complexo para ser trabalhado devido aos poucos trabalhos de citogenética clássica e molecular realizados. Pelos dados muito amplos que já foram reunidos sobre as espécies desse grupo, esses fatos tornam difícil a formulação de hipóteses sobre a evolução do gênero ou mesmo das espécies em particular. Assim, é considerável que mais estudos sejam feitos com o intuito de preencher muitas lacunas referentes à evolução do gênero *Ancistrus*.

REFERÊNCIAS

BRAMMER, S. P., ZANOTTO, M., CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2007. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm>

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro. 1988. 154p.

AGOSTINHO, A. A., JÚLIO JR. H. F. Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais** (R.H. Lowe-McConnell). Edusp, São Paulo, p. 374-400. 1999.

ALVES, A. L., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia** 56: 57-63. 2003.

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

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

BARRELLA, W., et al. As relações entre as matas ciliares, os rios e os peixes. In: RODRIGUES, R. R.; FILHO, H. F. L. **Matas ciliares: conservação e recuperação**: 2. ed. Editora Edusp, 2000.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S., MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic Considerations on Hoplias lacerdae (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics** 1:103-120. 1978.

BONETTO, A. A. The Paraná river system. In The ecology of river systems (B.R. Davies & K.F. Walker, eds.). Dr. W.Junk Publishers, **Dordrecht**, p. 541-555. 1986.

CASTRO, R. M. C., MENEZES, N. A. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX, vertebrados (R. M. C., Castro, ed.). **WinnerGraph**, São Paulo, p. 1-13. 1998.

FAVARATO, R. M. **Evolução e diversificação cromossômica no gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) através da caracterização e mapeamento de DNA repetitivo**. Dissertação de mestrado, INPA. Manaus. 2014.

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

ITAIPU BINACIONAL. **Bacia do Paraná**. 2010. Disponível em: <<https://www.itaipu.gov.br/energia/bacia-do-rio-parana>>. Acessado em: 13 outubro 2017.

LANGGANI, et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras Biota. **Neotropica**, vol. 7, núm. 3, pp. 181-197. Instituto Virtual da Biodiversidade. Campinas, Brasil. 2007.

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

LUI, R. L., et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry** 87:433-438. 2012.

LUJAN, N. K., et al. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 82: 269-288. 2015.

MARGARIDO, V. P., MOREIRA FILHO, O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). **Genetics and Molecular Biology** 31:235-238. 2008.

MARIOTTO, S., CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O. Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. **Neotropical Ichthyology** 11:125-131. 2013.

MARIOTTO, S., et al. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics** 5:289-300. 2011.

MARIOTTO, S. Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo ancistrini (siluriformes, loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras. Tese de Pós-Graduação, 120f. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2008.

MARTINS, C., GALETTI, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Reserach** 7:363-367. 1999.

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

SANTA CATARINA. **Recursos Hídricos De Santa Catarina**. SDS, DRHI, GEPHI. 2014.

SANTA CATARINA. **Regionalização De Vazões Das Bacias Hidrográficas Estaduais Do Estado De Santa Catarina**: Volume 1. 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. **Bacias Hidrográficas do Paraná**: 2. ed. SEMA. Curitiba, 2013.

SILVA, K. R. **Isolamento de sequências repetitivas do genoma de espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae)**. Dissertação de mestrado, 99f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2016.

SÓ GEOGRAFIA. Bacias hidrográficas do Brasil. 2018. Disponível em: <<http://www.sogeografia.com.br/Conteudos/GeografiaFisica/Hidrografia>>. Acessado em: 9 novembro 2018.

SUDERHSAÁGUAS PARANÁ. **Unidades Hidrográficas do Paraná**. 2006. Disponível em: <<http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=82>>. Acessado em: 13 outubro 2017.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306. 1972.