



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**



**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DE LORICARIIDAE (PISCES,  
SILURIFORMES) DAS NASCENTES DOS RIOS RIBEIRA E TIBAGI, PONTA  
GROSSA – PR.**

Kaline Ziemniczak

**CURITIBA – PR**

**2011**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**



**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DE LORICARIIDAE (PISCES,  
SILURIFORMES) DAS NASCENTES DOS RIOS RIBEIRA E TIBAGI, PONTA  
GROSSA – PR.**

Kaline Ziemniczak

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari – Orientador  
Universidade Estadual de Ponta Grossa –PR

Prof. Dr. Marta Margarete Cestari – Co-orientadora  
Universidade Federal do Paraná –PR

**CURITIBA – PR**

**2011**

Aos meus pais, Lenir Aires Toledo Ziemniczak  
e Sandro Luiz Ziemniczak e meu querido avô  
Belmiro Ziemniczak, pelo incentivo e apoio  
aos meus estudos.

|

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”*

Martin Luther King

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná – (PPG-Gen) e todos os professores que fazem parte deste.

Ao laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que forneceu o suporte necessário para a realização da parte prática deste projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, humilde, querido, atencioso, sempre disposto a ajudar. Marcelo, serei eternamente grata a ti por toda a sua ajuda, por me entender, pelo voto de confiança, por ter me acolhido, pelos ensinamentos, incentivo, paciência, por me fazer acreditar que é possível.

A minha co-orientadora Marta Margarete Cestari. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos professores Roberto Ferreira Artoni, Mara Cristina de Almeida Matiello, Viviane Nogaroto Vicari, Rafael Bueno Noleto, pelo auxílio, conselhos e ensinamentos.

Aos meus pais Lenir Aires de Toledo Ziemniczak e Sandro Luiz Ziemniczak pelo constante incentivo e apoio aos meus estudos, pelo amor, compreensão, confiança.

Ao meu avô Belmiro Ziemniczak e irmã Gabriele Ziemniczak.

Aos amigos que passaram e ainda fazem parte do laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná, Giselle, Rafael (Balen), Laércio, Wanessa, Taynah, Tati, Paula e também aos amigos e colegas do mestrado, Mariane, Cynthia, Georgia, Thais, Larissa, Nayara, Heloísa, Ricardo, Bruno, Juliane, Reginaldo, Luana, Luciane.

Aos amigos e colegas do laboratório de Citogénica e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Michelle, Tati, Léo, Ricardo, Priscila, Paulo, Thaís, Marcela, Dani, Jhonatan, Bárbara, Carla, meus agradecimentos especiais ao Alain e a Kamila que contribuíram e me ajudaram muito para realização deste trabalho.

Aos meus amigos Maelin Silva e Américo Moraes Neto, obrigada pela ajuda, conversas e conselhos.

A Simone Garcia de Azevedo e Andriane Schmiedel, grandes amigas desde os tempos de graduação.

As amigas da minha cidade, Andressa, Anne, Aline, Vand e Edi.

Meu agradecimento especial a minha grande amiga Naieli Bonatto pelo companheirismo, amizade, paciência, por todos os momentos que passamos nestes dois anos, sua amizade foi essencial para me dar força e coragem, principalmente neste período aqui em Ponta Grossa.

Ao meu namorado Nilo Boschilia, pelo amor, carinho, compreensão, pela ajuda naquele início conturbado do mestrado que passei em Curitiba, vários sufocos e perrengues que me ajudou a superar. Amo você!

Ao técnico de laboratório Miguel Airton Carvalho, pelas gargalhadas e brincadeiras, pelas conversas, por toda a ajuda no laboratório e nas coletas.

Ao REUNI - Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais, pelo apoio financeiro.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela I.</b> Dados cariotípicos dos sete citótipos de <i>Rineloricaria</i> cf. <i>lima</i> .....	<b>35</b>
--	-----------

### Capítulo 2

<b>Tabela I.</b> Espécies estudadas, respectiva localidade, bacia hidrográfica, número de fêmeas e machos.....	<b>53</b>
<b>Tabela II:</b> Dados citogenéticos para Loricariidae.....	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material e locais de coleta

**Figura 1.** Mapa hidrográfico do estado do Paraná, em destaque região de divisão das bacias do rio Tibagi e Ribeira na região de Ponta Grossa. Em (a) Rio Verde – Ponta Grossa; (b) Córrego Ribeirão do Areia – Ponta Grossa, (c) rio Açungui – Campo Largo..... **12**

#### 3.2. Métodos

**Figura 2.** Espécimes estudados. (A) *Rineloricaria cf. lima*; (B) *Neoplecostomus yapo*; (C) *Kronichthys lacerta*; (D) *Isbrueckerichthys duseni* e (E) *Parotocinclus maculicauda*..... **13**

### Capítulo 1

**Figura 1.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima*: (A e B) citótipo A; (C e D) citótipo B; (E e F) citótipo C. (A, C, E) coloração convencional por Giemsa e em (B, D e F) bandamento C sequencial. Nas caixas, par portador da RON. Barra = 10 µm..... **31**

**Figura 2.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima*: (A e B) citótipo D; (C e D) citótipo E; (E e F) citótipo F; (G e H) citótipo G.. (A, C, E e G) coloração convencional por Giemsa e em (B, D, F e G) bandamento C sequencial. Nas caixas, par portador da RON. Barra = 10 µm..... **32**

**Figura 3.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima* submetidos à técnica de dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S. Citótipos A a G ordenados alfabeticamente. Barra = 10 µm..... **33**

**Figura 4.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima* submetidos à técnica de FISH utilizando sonda telomérica. Em (A) citótipo A; (B) citótipo C e; (C) citótipo E. Barra = 10 µm..... **34**

**Figura 5.** Gráfico com o número de espécimes observados de cada citótipo nas duas populações..... **35**

## Capítulo 2

**Figura 1.** Cariótipos de *Neoplecostomus yapo* e *Kronichthys lacerta* com coloração convencional por Giemsa: (a) espécime macho de *N. yapo*; (c) *K. lacerta* macho; (e) *K. lacerta* fêmea; e análise sequencial da heterocromatina (b, d, f), respectivamente. Nos destaques, o par cromossômico portador do sítio Ag-RON positivo. Barra = 10 µm.....**47**

**Figura 2.** Cariótipos de *Isbrueckerichthys duseni* em coloração convencional por Giemsa: (a) população córrego da Areia; (c) população rio Açungui; (b, d) bandamento C sequencial, respectivamente. No destaque, o par cromossômico portador do sítio Ag-RON positivo. Em (e) heteromorfismo de tamanho para o par 11 mostrando a situação homozigota menor, heterozigota e homozigota maior. Barra = 10 µm.....**48**

**Figura 3.** Cariótipos de *Paratocinclus maculicauda* em coloração convencional por Giemsa: (a) exemplar macho; (c) exemplar fêmea; (e) exemplar fêmea evidenciando o heteromorfismo de tamanho do par 12; (b, d, f) bandamento C sequencial, respectivamente. No destaques, o par cromossômico portador do sítio Ag-RON positivo. Barra = 10 µm.....**49**

**Figura 4.** Metáfases de *Neoplecostomus yapo* (a) e *Kronichthys lacerta* (b) submetidas a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho) e contracorasadas com DAPI. Barra = 10 µm.....**50**

**Figura 5.** Cariótipos de *Isbrueckerichthys duseni* submetidos a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho) e contracorasados com DAPI. Em (a) localização dos sítios rDNA 18S; em (b) localização dos sítios rDNA 5S e; (c) sobreposição das duas sondas. Nos destaques, o par cromossômico heteromórfico demonstrando a variação de tamanho do sítio de rDNA 5S. Barra = 10 µm.....**51**

**Figura 6.** Cariótipos de *Paratocinclus maculicauda* submetidos a dupla FISH com sondas de rDNA 18S e rDNA 5S contracorasados com DAPI. Em (a) localização dos sítios rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) em exemplar macho; em (b) localização dos sítios rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) em exemplar fêmea com situação homozigota e; (c) localização dos sítios

rDNA 18S (vermelho) e 5S (verde) em exemplar fêmea com heteromorfismo de tamanho para o par 12. Barra = 10  $\mu$ m.....**52**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. PEIXES DE CABECEIRAS DE RIACHOS.....	1
1.2. RIOS RIBEIRA E TIBAGI.....	3
1.3. DIVERSIDADE CITOGENÉTICA EM PEIXES NEOTROPICAIS, COM ESPECIAL ENFOQUE ÀS ESPÉCIES RESIDENTES EM CABECEIRAS DE RIOS.....	4
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA.....	12
3.2. MÉTODOS.....	12
3.2.1. <i>Obtenção de Cromossomos Mitóticos</i> .....	14
3.2.2. <i>Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-CBG</i> .....	15
3.2.3. <i>Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos: Ag-RONs</i> .....	16
3.2.4. <i>Hibridação fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e telomérica</i> .....	16
3.2.5. <i>Análises Cariotípicas</i> .....	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 1.</b> Polimorfismo cariotípico numérico e estrutural em <i>Rineloricaria cf. lima</i> (Siluriformes, Loricariidae): sítios cromossômicos instáveis atuando na diversificação cariotípica.....	21
<b>Capítulo 2.</b> Citogenética comparativa em Loricariidae (Actinopterygii, Siluriformes): Uma análise cromossômica em grupos basais.....	36
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

## RESUMO

A ictiofauna neotropical é uma das mais diversificadas do mundo, constituindo a maior de todas as faunas epicontinentais do planeta. Contudo, esta elevada diversidade ainda é pouco conhecida, particularmente em regiões de cabeceiras de rios. Desta forma, este estudo procurou caracterizar as regiões das nascentes das bacias dos rios Ribeira e Tibagi quanto à diversidade citogenética de peixes loricariídeos de pequeno porte, as quais são reconhecidas por fixar mais facilmente rearranjos cromossômicos. Neste trabalho foram analisados citogeneticamente cinco espécies da família Loricariidae: *Neoplecostomus yapo*, *Kronichthys lacerta*, *Isbrueckerichthys duseni*, *Parotocinclus maculicauda* e *Rineloricaria* cf. *lima*. Foram utilizados marcadores cromossômicos convencionais (número diplóide, fórmula cariotípica, número fundamental e Ag-RON) e moleculares (FISH com sondas de rDNA 18S e 5S e sonda telomérica) com intuito de comparar os cariótipos destas espécies e contribuir com a citotaxonomia dos grupos basais de Loricariidae. Todas as espécies estudadas apresentaram  $2n=54$  cromossomos que é considerado um caráter plesiomórfico em Loricariidae, exceto *Rineloricaria* cf. *lima* que apresentou uma variação de  $2n=66$  a  $2n=70$  cromossomos. Em *R.* cf. *lima* foi demonstrado ocorrer uma série de eventos cromossômicos para a manutenção da viabilidade populacional da espécie que diversificou até  $2n=70$  st/a por fissões cêntricas gerando sítios instáveis nos pontos de quebra. Para cicatrizar estes pontos de quebra, fusões Robertsonianas ocorreram gerando o polimorfismo de 66 a 70 cromossomos observados atualmente. Diferentes combinações gaméticas gerariam as alterações do NF superior a 70. Ainda, a heterocromatinação facultativa parece ter ocorrido para evitar possíveis danos das duplicações de braços cromossômicos. Ainda, foram comparadas as três espécies de Neoplecostominae (*N. yapo*, *K. lacerta*, *I. duseni*) consideradas de grupos basais em Loricariidae juntamente com *P. maculicauda* (Hypoptopomatinae) e dados da literatura. Os resultados demonstraram que o  $2n=54$  cromossomos, pouca quantidade de heterocromatina e a sintenia dos rDNAs 18S e 5S podem ser consideradas características primitivas em Loricariidae por estarem presentes no grupo irmão Trichomycteridae e nas subfamílias consideradas basais Delturinae e Neoplecostominae. Assim, esta análise cromossômica entre os Loricariidae propicia um melhor entendimento dos processos de evolução cromossômica e das relações filogenéticas nesse grupo de constantes reformulações cladísticas.

## ABSTRACT

The neotropical ictiofauna is one of the most diversified in the world, constituting the biggest of all epicontinental faunas in the planet. However, this high diversity is still poorly known, particularly in river headwater regions. Therefore, this study aimed to characterize the basin's source regions from the Ribeira and Tibagi rivers in relation to cytogenetic diversity of small size loricariids fishes, which are known for acquire chromosomal rearrangements more easily. At the present work, five species from the Loricariidae family were citogenetically analyzed: *Neoplecostomus yapo*, *Kronichthys lacerta*, *Isbrueckerichthys duseni*, *Parotocinclus maculicauda* and *Rineloricaria cf. lima*. Conventional and molecular chromosomal markers were utilized (diploid number, Karyotypic formula, fundamental number and Ag-NOR) and (FISH with 18S rDNA, 5S rDNA and telomeric probes), respectively with the intention of the comparing the Karyotypes from these species and contribute with the cytotaxonomy from the basal groups of the Loricariidae. All the studied species presented  $2n=54$  chromosomes, what is considered a plesiomorphic character in Loricariidae, except for *Rineloricaria cf. lima*, which presented a variation from  $2n=66$  to  $2n=70$  chromosomes. In *R. cf. lima* was demonstrated to occur a series of chromosomal events for the maintenance of population viability of the species that diversified until  $2n=70$  st/a for centric fissions generating instable sites in breaking points. To heal these breaking points, Robertsonians fusions occurred generating the 66 to 70 chromosome polymorphism observed presently. Different gametic combinations would generate the alterations superior to 70 at the FN. Still, the facultative heterochromatinization seems to have occurred to avoid possible damage to the duplications of chromosome arms. Also, the three species of Neoplecostominae (*N. yapo*, *K. lacerta*, *I. duseni*) were compared, considered from basal groups in Loricariidae together with *P. maculicauda* (Hypoptopomatinae) and literature data. The results demonstrate that the  $2n=54$  chromosomes, a small quantity of heterochromatin and the 18S and 5S rDNA's sinteny can be considered primitive characteristics in Loricariidae, because are present in both, the out group Trichomycteridae and the families considered basal, Delturinae e Neoplecostominae. Thus, this chromosomal analysis among the Loricariidae lead a better understanding from the chromosome evolution processes and the phylogenetic relationships in this group of constant cladistic reformulations.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Peixes de cabeceiras de riachos*

Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos de variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados (NELSON, 2006). A grande maioria das espécies é cariotipicamente única, tornando a citogenética uma ferramenta extremamente importante para a citotaxonomia e citossistemática (WHITE, 1978). A fauna composta por espécies de peixes de pequeno porte que habitam pequenos riachos de cabeceiras representam no mínimo 50% do total de espécies. Regiões de cabeceiras de rios, particularmente composta de peixes de pequeno porte são menos estudadas que as espécies maiores. Na maioria das vezes, apresentam elevado grau de endemismo, não realizando migrações extensas, fato proporcionado pela ocorrência de eventos de vicariância, levando à multiplicação, por especiação em isolamento geográfico de espécies de peixes de riachos, caracterizadas pela distribuição geográfica restrita (CASTRO e MENEZES, 1998). Desde modo, é importante ressaltar a necessidade de se coletar e estudar peixes de áreas com endemismo acentuado, como as cabeceiras de rios de distintos sistemas hidrogáficos. Assim, riachos e cabeceiras de rios são ambientes que deveriam receber prioridade em sua exploração (CASTRO e MENEZES; 1998 e CASTRO, 1999), especialmente no que diz respeito ao estudo da sistemática, evolução e biologia geral de sua ictiofauna (CASTRO, 1999).

Uma bacia fluvial é formada por uma sequência de corpos de água que se organizam de forma dendrítica. Seus componentes podem ser classificados em categorias, sendo a menor destas formada pelos riachos de primeira ordem, que constituem as cabeceiras das bacias, não possuindo tributários. Os riachos de primeira ordem são sempre os mais numerosos (~60% do total) e a soma de seus comprimentos lineares é próxima da metade do comprimento linear de toda a bacia de drenagem (WELCOMME, 1985).

De acordo com o trabalho de Castro (1999), o termo riacho refere-se aquelas partes de um sistema fluvial qualquer, pouco ou não alterado pela ação antrópica, com produção primária autotrófica local baixa, devido a presença de vegetação ripária que bloqueia total ou parcialmente a incidência direta de luz solar, sendo a comunidade lótica predominantemente heterotrófica e dependendo em grande parte da importação de material orgânico alóctone para subsistir. Difere de corpos de água corrente de maior porte, onde de modo geral, existe uma maior insolação possibilitando a existência de algas e macrófitas, levando a uma produção primária local relativamente maior, tornando a comunidade lótica menos dependente da importação de matéria orgânica para a sua subsistência. O ponto onde um riacho muda de heterotrófico para autotrófico depende primariamente do nível de sombreamento e, portanto, da presença, densidade e posição da vegetação ripária, que por sua vez dependem do tipo de vegetação dominante na área, latitude, altitude e estrutura física do riacho. Espera-se que a composição da ictiofauna dos tributários de primeira ordem seja diferente daquela dos riachos de maior ordem (JUNK, 1993). A maioria das espécies de peixes que vivem em cabeceiras de riachos são de pequeno porte e pouco conhecidas. A família Loricariidae representa uma importante família da ictiofauna de riachos e é subdividida em seis subfamílias: Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae (REIS *et al.*, 2006). As espécies de Neoplecostominae e Hypostominae da tribo Ancistrini são características das zonas encachoeiradas. Algumas espécies de Hypostominae tribo Hypostomini e Loricariinae são habitantes permanentes de riachos. Entre os loricariídeos, destacam-se as espécies de *Rineloricaria* pela sua ocorrência nos fundos arenosos e pedregosos de pequenos riachos (BUCKUP, 1999). As regiões das cabeceiras das bacias hidrográficas dos rios Ribeira e Tibagi, Ponta Grossa-PR são ainda pouco exploradas quanto a diversidade de espécies, principalmente no que se refere à loricariídeos de pequeno porte. Estudos citogenéticos e de levantamento da ictiofauna podem auxiliar ao entendimento da diversidade, distribuição, aspectos de biogeografia e evolutivos que envolvem este gênero de peixes em nossa região, bem como, a descrição de possíveis espécies novas.

## **1.2. Rios Ribeira e Tibagi**

A porção paranaense da bacia hidrográfica do Rio Ribeira que também abrange o estado de São Paulo, é de 9.130 Km<sup>2</sup>. O rio Ribeira do Iguape nasce na vertente leste da serra de Paranapiacaba, tendo como principais contribuintes os rios, Piedade, Pardo, Turvo, Capivari e Açungui (SEMA, 2010). O rio Ribeira somente passa a ser denominado Ribeira de Iguape após a confluência com seu principal afluente, o Juquiá. É o principal rio da região, formado pelos rios Ribeirão Grande e Açungui, que nascem no estado do Paraná, a noroeste da Região Metropolitana de Curitiba, a uma altitude de aproximadamente 1.000 metros. Possui uma extensão total de aproximadamente 470 km, sendo cerca de 220 km em terras paranaenses. Sua foz localiza-se no município de Iguape, no local denominado Barra do Ribeira (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2003).

É uma importante bacia hidrográfica entre as bacias litorâneas do Brasil. Um aspecto ecológico importante é que este sistema de rio é totalmente incluído no interior de um dos maiores restos da floresta Atlântica do sudeste Brasil. Muitos dos seus tributários têm a ictiofauna totalmente desconhecida. As ameaças aos ecossistemas atlânticos da floresta incluem a degradação de córregos naturais e dos rios, causados pela perda de vegetação ciliar, erosão, poluição orgânica e química, represamento, e introduções de espécies exóticas. Os peixes são provavelmente os vertebrados menos conhecidos da floresta Atlântica, em parte devido à falta da informação taxonômica e sistemática (PEREIRA e OYAKAWA, 2003).

Por sua vez, o Rio Tibagi possui 550 km de extensão com 91 saltos e cachoeiras (SEMA, 2010). A bacia do rio Tibagi tem área aproximada de 25.293 km<sup>2</sup>, o que corresponde a cerca de 13% da área do estado do Paraná. Percorre o primeiro, o segundo e o terceiro planalto Paranaense, possui 65 tributários principais e sua nascente está localizada na Serra das Almas entre Ponta Grossa (PR) e Palmeira (PR) a 1.100 metros de altitude, atravessa o estado em direção norte, até desembocar no reservatório da Usina Hidrelétrica de Capivara, no rio Paranapanema a 298 metros de altitude (PINESE, 2002). A bacia do rio Tibagi

apresenta uma grande diversidade de peixes e esta tende a aumentar da nascente em direção a foz. Todas as espécies registradas para a bacia pertencem à subclasse Actinopterygii e, principalmente, à superordem Ostariophysi. Mas o que se verifica é que, embora ainda exista riqueza de espécies, predominantemente pertencentes às ordens Characiformes e Siluriformes, muitas tiveram sua abundância reduzida. Grande parte dessa situação é consequência de alterações ambientais causadas pela destruição das florestas ciliares, pelo não tratamento de efluentes urbanos, pela falta de controle e de cuidados na aplicação de defensivos agrícolas (SHIBATTA *et al.*, 2002), e pela construção de represas.

Em coletas realizadas em quatro trechos da bacia do rio Tibagi por Shibatta *et al.*, (2007), descreveram um número de 68 espécies de quatro ordens (32 espécies da ordem Characiformes, 32 Siluriformes, 2 Gymnotiformes e 2 Perciformes). Com este estudo, são acrescentadas mais 13 espécies para a bacia do rio Tibagi, além das 110 citadas por Shibatta *et al.* (2002). Dessa forma, a análise citogenética de populações de cabeceiras dos rios, principalmente aquelas relacionadas a tributários de primeira ordem e segunda ordem, são extremamente interessantes para o reconhecimento de espécies novas, compreensão da biogeografia e dispersão da fauna de peixe local.

### **1.3. Diversidade citogenética em peixes neotropicais, com enfoque especial na família Loricariidae**

Atualmente são reconhecidas aproximadamente 1,8 milhão de espécies de organismos vivos (COX e MOORE, 2000), dos quais aproximadamente 55.000 são vertebrados e, dentre esses, aproximadamente 32.500 são espécies de peixes reconhecidas (NELSON, 2006). A grande riqueza de espécies de peixes reflete-se também na sua diversidade morfológica e ecológica e a maior parte dessa riqueza e diversidade encontra-se em águas brasileiras (LOWE-McCONNELL, 1999). Grande

parte desta riqueza está nas águas doces neotropicais, onde quatro ordens podem ser destacadas, em números de espécie e abundância: Characiformes, Siluriformes, Perciformes e Gymnotiformes (LOWE-MecCONNELL, 1987; AGOSTINHO *et al.*, 2007).

A ictiofauna neotropical é uma das mais diversificadas do mundo, representa um oitavo da diversidade de vertebrados vivos e constituem a maior de todas as faunas epicontinentais do planeta (VARI e MALABARBA, 1998), com mais de 46% das 13.000 espécies de água doce registradas até então (REIS *et al.*, 2003). Contudo, esta elevada diversidade ainda é pouco conhecida, com grandes áreas geográficas que representam lacunas no conhecimento da composição e ecologia da ictiofauna (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). A família mais representativa em termos de número de espécies é Characidae, com pelo menos 1.352 espécies (REIS *et al.*, 2003). Este grupo forma o principal conjunto de espécies nectônicas em riachos de médio e baixo gradiente (BUCKUP, 1999), predominando inclusive em termos de abundância e biomassa (CASTRO *et al.*, 2003, 2004, 2005) e desempenhando um papel importante na produção de peixes de riachos.

De acordo com Ferraris (2007) a família Loricariidae é a segunda mais numerosa entre os peixes neotropicais. Recentemente, Eschmeyer e Fricke (2010) descreveram 785 espécies reconhecidas em Loricariidae alocadas em cerca de 100 gêneros. Estes peixes estão distribuídos por toda a região Neotropical, estendendo-se da Costa Rica à Argentina (REIS *et al.*, 2003). Os loricariídeos são comumente reconhecidos por possuírem o corpo recoberto por placas dérmicas (o que lhes confere o nome popular de “cascudos”) e a boca em forma de ventosa localizada na região ventral. Entretanto, a classificação das subfamílias e o agrupamento dos gêneros tem sido alvo de constantes reformulações (ISBRÜCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; REIS *et al.*, 2006). Armbruster (2004) considera as subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae válidas para este grupo. Nesta revisão, a antiga subfamília Ancistrinae foi considerada como sinônima de Hypostominae, a qual passou a ser constituída por cinco tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini,

Pterygoplichthini e Ancistrini. Adicionalmente, os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram alocados na subfamília Neoplecostominae (ARMBRUSTER, 2004). Posteriormente, foi criada a subfamília Delturinae incorporando os gêneros *Delturus* e *Upsilonodus*, os quais apresentam duas sinapomorfias irreversíveis (REIS *et al.*, 2003). Mais recentemente, Cramer (2009) usando dados moleculares nucleares, mitocondriais e morfológicos, alocou o gênero *Hemipsilichthys* na subfamília Delturinae. Desta forma, a atual família Loricariidae é dividida em seis subfamílias: Lithogeneinae Eigenmann, 1909 (1 gênero, 3 espécies), Delturinae Reis *et al.*, 2006, (2 gêneros, 7 espécies), Neoplecostominae Regan, 1904 (5 gêneros, 39 espécies), Hypoptopomatinae Eigenmann e Eigenmann, 1890 (18 gêneros, 103 espécies), Loricariinae Bonaparte, 1831 (~36 gêneros, 222 espécies) e Hypostominae Kner, 1853 (~40 gêneros, 411 espécies). Do ponto de vista citogenético e evolutivo, esta família apresenta peculiaridades interessantes, tais como a grande diversificação de formas e grande variedade de tipos e números cromossômicos (LARA-KAMEI, 1998). Pouco se sabe sobre organização cariotípica desta família e existe uma grande variação no número cromossômico, a qual pode apresentar de  $2n=34$  cromossomos em *Ancistrus* sp. 1 e *Ancistrus* sp. 2 (OLIVEIRA, 2006) a  $2n=96$  cromossomos em *Upsilonodus* sp. (KAVALCO *et al.*, 2004).

O gênero *Neoplecostomus*, pertence à subfamília Neoplecostominae e está composto atualmente por dez espécies distribuídas em rios e riachos do sudeste do Brasil, sendo que destas, três foram descobertas recentemente por Zawadzki *et al.*, (2008), provenientes de pequenos afluentes das bacias de Paranaíba, Paranapanema, Tibagi e Alto Rio Paraná. Estas três novas espécies fornecem um forte indicativo que um número maior ainda deverão ser inventariadas, uma vez que, há um aumento de expedições de coleta em pequenos córregos e nascentes dos sistemas hidrográficos brasileiros. Dados citogenéticos para espécies deste gênero estão disponíveis apenas para *Neoplecostomus microps* e *Neoplecostomus paranensis*. Os estudos cariotípicos nestas espécies demonstraram o número diplóide de  $2n=54$  cromossomos e uma aparente conservação cariotípica (ALVES *et al.*, 2005; KAVALCO *et al.*, 2005).

O gênero *Isbrueckerichthys* foi agrupado entre os Neoplecostominae por Armbruster (2004). *Isbrueckerichthys* foi proposto por Derijst (1996) para incluir a espécie *Pareiorhaphis duseni* e *Pareiorhaphis alipionis*. Este gênero é composto de espécies de porte pequeno e médio, comumente encontradas em cabeceiras de córregos com água clara e bem oxigenada, onde o fundo é composto de rochas, pedras e cascalho (PEREIRA e REIS, 2002). As três espécies descritas de *Isbrueckerichthys* eram atribuídas como endêmicas da bacia do rio Ribeira de Iguape. A espécie *Isbrueckerichthys duseni*, foi descrita para a parte mais alta desta bacia no Estado do Paraná, *I. alipionis*, a partir do rio Betari, afluente do rio Ribeira de Iguape e, *I. epakmos*, reconhecida em um afluente do rio Juquiá, em São Paulo (JEREP *et al.*, 2006). No trabalho destes mesmos autores, duas novas espécies de *Isbrueckerichthys* são descritas, *I. saxicola* e *I. calvus*, ambas coletadas em riachos de cabeceira do rio Tibagi, bacia do rio Paranapanema, no Estado do Paraná. Essas são as primeiras descrições para o gênero *Isbrueckerichthys* fora da bacia do Ribeira de Iguape, demonstrando um aumento na faixa de distribuição geográfica do gênero.

Dados citogenéticos para este gênero são encontrados no trabalho de Alves (2000) para *Isbrueckerichthys alipionis*, coletados no Rio Betari, São Paulo, com  $2n=54$  e cariótipo composto de 38 cromossomos meta/submetacêntricos e 16 subtelo/acrocêntricos. Alves *et al.*, (2005) analisaram o cariótipo de representantes dos gêneros da família Loricariidae *Corymbophanes*, *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* e de Neoplecostominae gênero *Neoplecostomus*. Neste trabalho o número diplóide encontrado para a espécie *Isbrueckerichthys duseni* do Rio Betari, Iporanga (SP) foi de  $2n=54$ , com cariótipo composto de 20 cromossomos metacêntricos, 20 submetacêntricos e 14 subtelocêntricos.

Por sua vez, o gênero *Kronichthys* foi descrito por Miranda Ribeiro, 1908 e tem uma distribuição geográfica restrita à bacia do leste entre os estados do Paraná e Rio de Janeiro. Neste gênero são descritas três espécies: *Kronichthys heylandi*, *K. lacerta* e *K. subteres* (FERRARIS, 2007). A espécie *K. lacerta* é encontrado na bacia

da Baía de Paranaguá e do rio Ribeira de Iguape (WEBER, 2003). Descrições citogenéticas para as três espécies indicam um número diplóide de 54 cromossomos (ALVES *et al.*, 2005; KAVALCO *et al.*, 2005) no entanto, estudos pormenorizados para marcadores cromossômicos não são disponíveis.

A similaridade cariotípica identificada entre as espécies dos gêneros *Neoplecostomus*, *Hemipsilichthys*, *Kronichthys*, *Isbrueckerichthys* e *Pareiorhina* reforça a hipótese de que esses gêneros podem estar mais relacionados entre si do que para outras espécies de Hypostominae, compondo um grupo primitivo na família Loricariidae. As novas análises citogenéticas de espécies adicionais, e a análise de dados morfológicos e moleculares serão muito importantes para uma melhor compreensão da relação entre os gêneros de Loricariidae (ALVES *et al.*, 2005).

A subfamília Loricariinae é a segunda mais numerosa da família Loricariidae e os dados citogenéticos apresentados mostram uma grande diversidade tanto no que se refere ao número de cromossomos quanto à fórmula cariotípica. *Rineloricaria* Bleeker, 1862, é o gênero mais rico em espécies da família Loricariinae, com cerca de 60 espécies (RODRIGUEZ e REIS, 2008; GHAZZI, 2008). Este gênero possui uma ampla variação cariotípica, com o menor número diplóide equivalente a  $2n=36$  cromossomos em *Rineloricaria latirostris* e o maior apresentando  $2n=70$  cromossomos em *Rineloricaria* sp. (GIULIANO-CAETANO, 1998; ALVES *et al.*, 2003; RODRIGUES e ALMEIDA-TOLEDO, 2008). As espécies deste gênero habitam uma variedade de ambientes que vão de riachos de montanha com águas rasas, claras, frias e de forte correnteza, a grandes rios ou lagoas em planícies da América do Sul (REIS e CARDOSO, 2001). Considerando a complexidade taxonômica de *Rineloricaria* e sua ampla distribuição geográfica, poucos estudos foram feitos sobre o gênero (GHAZZI, 2008). Ainda, segundo o mesmo autor, levantamentos recentes nas coleções do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – SP, Museu Nacional - RS e Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba – PR, constataram que ocorrem pelo menos duas espécies não descritas no sistema do rio Ribeira de Iguape; uma no rio Paraíba do Sul; duas nos rios que drenam para a baía da Guanabara e Sepetiba e; finalmente os rios

Itabapoana (divisa RJ/ES) e Doce abrigam pelo menos uma espécie de *Rineloricaria* não descrita.

Mendes Neto (2008) analisou *Rineloricaria* cf. *latirostris*, sugerindo esta como uma possível espécie invasora do rio São Francisco, apresentando  $2n=48$  com fórmula cromossômica  $16m/sm$  e  $32st/a$ . Nesta espécie o  $2n$  pode variar de  $2n=36$  a  $2n=48$  cromossomos. Mesmo com uma variação cromossômica tão grande o número fundamental ( $NF=60$ ) da espécie mantém-se conservado, obtendo-se uma relação direta entre a diminuição do número diplóide e o aumento do número de cromossomos do tipo  $m/sm$  e conseqüente diminuição do número de cromossomos do tipo  $st/a$ , o que representa um polimorfismo estável nessas populações devido a rearranjos Robertsonianos (GIULIANO-CAETANO, 1998).

A subfamília Hypoptopomatinae é considerada monofilética, inclui 19 gêneros com mais de 80 espécies, chamados popularmente de cascudinhos (CARVALHO *et al.*, 2008). O monofiletismo do gênero *Parotocinclus* Eigenmann e Eigenmann, 1889 tem sido muito controverso. Schaefer (1991) reconheceu *Parotocinclus* como monofilético considerando uma série de caracteres: uma robusta crista curta para a musculatura adutora, um grande primeiro acúleo da nadadeira dorsal e uma linha lateral interrompida, terminando em duas ou quatro placas antes da última placa lateral. No mesmo estudo, *Parotocinclus* foi considerado grupo irmão de *Schizolecis*, em um clado que inclui *Otothyri* e *Pseudotothyris*. Em outro estudo, *Parotocinclus* foi considerado em uma posição basal dentro da tribo Otothyri (SCHAEFER, 1998). De acordo com uma análise de parcimônia de relações filogenéticas, *Parotocinclus* foi considerado como um agrupamento polifilético (GAUGER e BUCKUP, 2005). Em uma hipótese mais recente para as relações filogenéticas de Hypoptopomatinae não foram encontradas evidências que suportem a monofilia da tribo Otothyri e considerado *Parotocinclus* como um agrupamento altamente parafilético (LEHMANN, 2006). Atualmente, este gênero é composto por 23 espécies, no entanto, novas estimativas de relações filogenéticas, a biodiversidade de *Parotocinclus* e uma nova diagnose da subfamília Hypoptopomatinae são necessárias. São poucos os estudos citogenéticos nesta subfamília, no entanto o

número diplóide (54 cromossomos) e Ag-RONs intersticiais têm sido encontradas em quase todas as espécies de Hypoptopomatinae (ANDREATA *et al.*, 1992, 1993, 1994, 2000; KAVALCO *et al.*, 2005). As exceções são para *Hisonotus gibbosus* com  $2n=58$  cromossomos (ANDREATA *et al.*, 2000) e *Otocinclus aff. vestitus* com  $2n=72$  cromossomos (ANDREATA *et al.*, 1994).

Desta forma, torna-se interessante caracterizar as regiões de nascentes das bacias do Ribeira e Tibagi quanto à diversidade citogenética de peixes loricariídeos, principalmente no que se refere a espécies residentes, as quais são reconhecidas por fixar mais facilmente rearranjos cromossômicos, constituindo assim uma fonte de variabilidade genética. Em consequência, estas informações servirão ao propósito de diagnosticar áreas de endemismo, importantes para a conservação biológica de espécies regionais.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As técnicas utilizadas em citogenética têm gerado resultados e informações importantes que vem sendo interpretadas com um enfoque evolutivo e que ajudam na compreensão das relações de parentescos entre ou dentro de diferentes ordens, famílias e gêneros de peixes. Em peixes há registro de grande número de variações cromossômicas que significam, em parte, a adaptabilidade das espécies aos diferentes ambientes onde ocorrem (MARQUES, 2003). As regiões de cabeceiras de rios são particularmente importantes por apresentar um grande número de espécies de peixes de pequeno porte ainda não descritas. As regiões das cabeceiras dos rios Ribeira e Tibagi, nas proximidades do município de Ponta Grossa, PR foram pouco estudadas no que se refere a identificação de espécies de peixes loricariídeos, sua genética e mecanismos de evolução cariotípica. Diante deste cenário, este trabalho realizou uma descrição citogenética em exemplares de Loricariidae de pequeno porte capturados nesta região, comparando os dados obtidos com àqueles da literatura, buscando contribuir com a citotaxonomia, biogeografia de espécies e no entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica para a família.

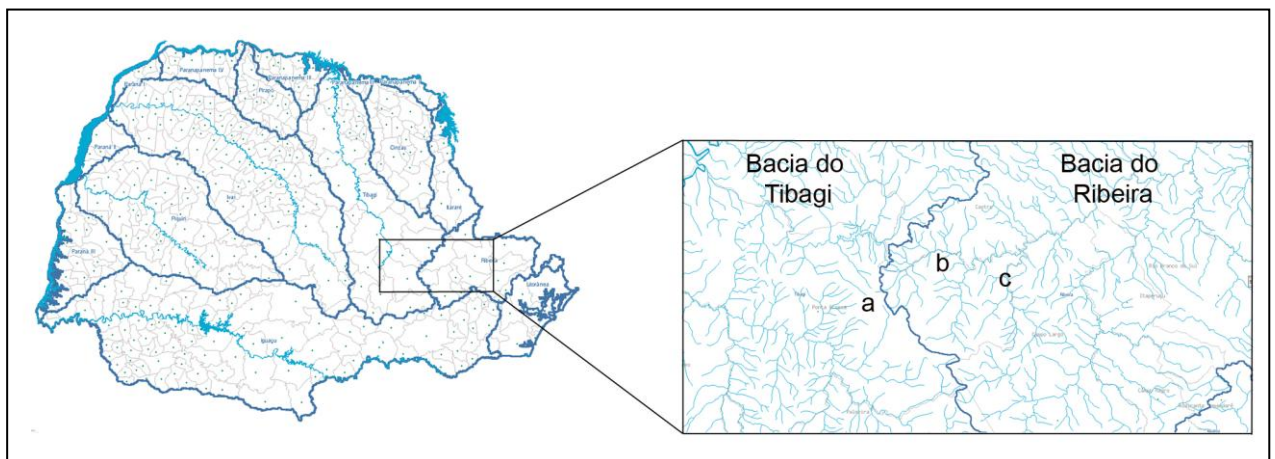
Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) caracterizar, cariotipicamente, diferentes populações de espécies de Loricariidae, residentes nas cabeceiras dos rios Ribeira e Tibagi, região de Ponta Grossa (PR);
- b) identificar marcadores cromossômicos que sejam informativos para análises comparativas entre espécies e populações em estudo;
- c) utilizar os dados obtidos e de literatura, para o entendimento da evolução cariotípica, biodiversidade e distribuição de grupos da ictiofauna, em relação a áreas ecologicamente diversificadas de nosso sistema fluvial;
- d) contribuir para um inventário de espécies residentes nas regiões de estudo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material e locais de coleta

Os exemplares foram coletados no Rio Verde, Ponta Grossa-PR (bacia do rio Tibagi); Córrego do Areia, Ponta Grossa – PR e; Rio Açungui, Campo Largo – PR, nascentes do Rio Ribeira (Fig. 1). As populações de *Rineloricaria cf. lima*; *Neoplecostomus yapo*; *Kronichthys lacerta*; *Isbrueckerichthys duseni* e *Parotocinclus maculicauda* (Fig. 2), foram submetidas à identificação do número diplóide modal e realização dos demais procedimentos citogenéticos.

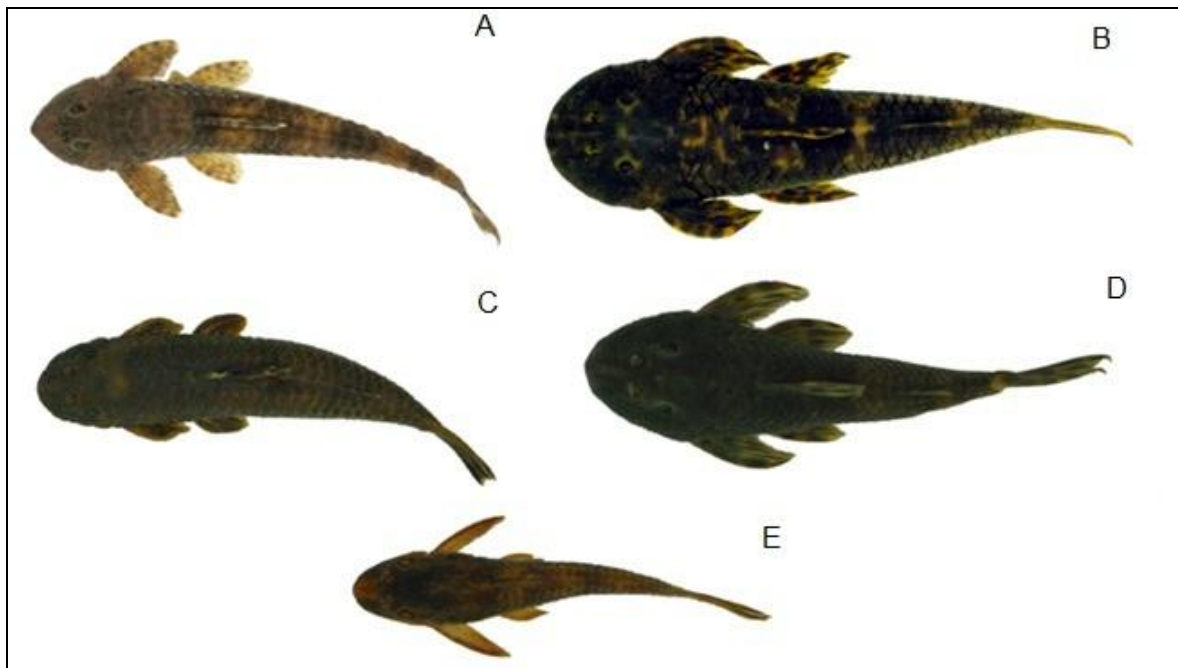


**Figura 1.** Mapa hidrográfico do estado do Paraná, em destaque a região de divisão das bacias do rio Tibagi e Ribeira na região de Ponta Grossa. Em (a) Rio Verde – Ponta Grossa; (b) Córrego Ribeirão do Areia – Ponta Grossa e (c) rio Açungui – Campo Largo. (Fonte: <http://www.itcg.pr.gov.br/> - Instituto de Terras, Cartografia e Geociências – ITCG).

#### 3.2. Métodos

O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza (Licença permanente para coleta de material zoológico

MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1) ou, eventualmente, a partir do banco de preparações cromossômicas do Laboratório de Citogenética e Evolução, do Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 04741/08). Os exemplares foram coletados com auxílio de redes e/ou tarrafas, levados vivos para o laboratório de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus de Uvaranas (PR) e mantidos em aquários aerados. Foram sacrificados posteriormente para retirada de tecido para preparações citogenéticas (porção anterior do rim). O material obtido foi analisado no Laboratório de Citogenética Animal do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Citogenética e Evolução, do Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa.



**Figura 2.** Espécimes estudados. (A) *Rineloricaria cf. lima*; (B) *Neoplecostomus yapo*; (C) *Kronichthys lacerta*; (D) *Isbrueckerichthys duseni* e (E) *Parotocinclus maculicauda*.

### 3.2.1 Obtenção de Cromossomos Mitóticos

#### A. Preparações Diretas (BERTOLLO *et al.*, 1978)

1. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso.
2. Manter o peixe em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos.
3. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida.
4. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha.
5. Incubar em estufa a 37°C durante 25-30 minutos.
6. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrífuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.
7. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes.
8. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm.
9. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm.
10. Repetir novamente o item 9.
11. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material.
12. Acondicionar em frascos do tipo Ependorff. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.
13. Pingar 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina bem limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina.
14. Deixar o material secar ao ar.
15. Corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

16. Lavar com água corrente e deixar secar ao ar.

### **B. Cultura Celular de Curta Duração (FENOCCHIO *et al.*, 1991)**

1. Anestésiar o animal colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.1%, sacrificando-o em seguida.

2. Retirar uma porção do rim anterior e colocar o material em uma cuba de vidro, contendo aproximadamente 5 ml de meio de cultura TC199 modificado (Interlab com Licença Flow Laboratories), suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (5mg de penicilina/litro; 10mg de estreptomicina/litro).

3. Dissociar os tecidos, com uma seringa sem agulha, até obter uma suspensão celular homogênea.

4. Incubar o material em uma estufa a 30°C, durante aproximadamente 6 horas.

5. Adicionar 2 gotas de solução de colchicina a 0,017%, 30 minutos antes do término da incubação.

6. Re-suspender o material com uma pipeta Pasteur, transferindo-o para um tubo de centrífuga.

7. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm e eliminar o sobrenadante.

8. Acrescentar 10 ml de solução de KCl a 0,075M e levar a estufa a 36-37°C, durante 25-30 minutos.

9. Repetir os itens 6 a 16, conforme o método anterior (preparação direta).

### **3.2.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-CBG**

(SUMNER, 1972, com pequenas modificações).

1. Tratar as lâminas contendo o material celular em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 37°C, durante 10 minutos e lavar com água destilada.

2. Incubar a preparação em hidróxido de Bário ( $Ba(OH)_2$ ) a 5%, recém preparada e filtrada, a 42°C, durante 1 a 2 minutos.

3. Submergir a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavar com água destilada.

4. Imergir a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos.

5. Lavar bem, com água destilada e secar ao ar.
6. Corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

### **3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos: Ag-RONs**

(HOWELL e BLACK, 1980).

1. Colocar, sobre as preparações cromossômicas, 3 gotas de solução de gelatina (1%) e 6 gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50%). Misturar levemente com a ponta de uma lamínula, tomando cuidado para não riscar o material.
2. Cobrir a lâmina com uma lamínula (60x20mm) e manter em estufa a 60°C, o tempo necessário para que os cromossomos e núcleos assumam uma coloração amarelada e os nucléolos e as RONS uma coloração quase preta (em geral esse tempo varia entre 3 a 5 minutos).
3. Remover a lamínula com um jato de água destilada.
4. Secar ao ar.
5. Corar o material com solução de Giemsa a 1%, durante 1 minuto.
6. Lavar em água corrente e secar ao ar.

### **3.2.4 Hibridação fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e telomérica (PINKEL *et al.*, 1986).**

#### **A. Marcação das sondas**

Neste estudo, foram utilizadas três sondas para o mapeamento físico destas sequências sobre os cromossomos: uma sonda de rDNA 18S, obtida do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004), uma sonda de rDNA 5S, isolada a partir do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999) e uma sonda para sequência telomérica de eucariotos (IJDO *et al.*, 1991). As sondas foram marcadas pela técnica de PCR, utilizando os haptenos biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche). A reação de PCR de marcação a partir de primers para a região flanqueadora do plasmídeo PGemT foi realizada para os clones de rDNA com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM

MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de dUTP 11-digoxigenina ou dUTP 16 biotina, 1 μM primer M13 F, 1 μM primer M13 R e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 5 min a 94°; 35 ciclos: 1 min a 90°C, 1 min e 30 s a 52°C e 1 min e 30 s a 72°C. Para a marcação da sonda telomérica foi utilizada a seguinte reação (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de dUTP 11-digoxigenina, 0,2 μM primer (TTAGGG)<sub>6</sub>, 0,2 μM primer (AATCCC)<sub>6</sub> e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes especificações: duas condições de amplificação, a primeira amplificação é realizada com baixa estrinência: 4 min a 94°; 12 ciclos de (1 min a 94°C, 45s a 52°C e 1 min e 30s a 72°C), seguidos por 35 ciclos de alta estrinência (1 min a 94°C, 1 min e 30 s a 60°C e 1 min e 30 s a 72°C). Os produtos obtidos são checados em gel de agarose 1%. Os produtos destas reações de marcação foram precipitados com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20° C. Posteriormente, o material será centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, será descartado o sobrenadante, deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a 37° C.

### **B. Preparação das lâminas**

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 μg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x / MgCl<sub>2</sub> 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

### **C. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes**

O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência usou as seguintes condições para a solução de hibridação (2,5 ng/μL para cada sonda, 50% formamida, 2XSSC, 10% sulfato dextrano – 77% de estringência). Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 μl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 0,05%/4xSSC, por 5 minutos, incubação em 90 μl de tampão NFDM a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 0,05%/4xSSC, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda, foram colocados sobre as lâminas 90 μl da solução (avidina-FITC - Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada a 0,25 μg/μl e antidigoxigenina rodamina a 1 mg/ml diluídos em tampão NFDM a 5% nas concentrações de 1:1000 e 5:1000, respectivamente), permanecendo por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 0,05%/4xSSC, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 μg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

#### **3.2.5 Análises Cariotípicas**

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41. As preparações com hibridação *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados Olympus Bx41. As imagens foram capturadas com utilização da câmera CCD DP71 (Olympus) e software DP controller. As melhores imagens foram utilizadas para organizar os cariótipos, onde os homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico), com a utilização do Programa Adobe Photoshop.

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

RB= 1,00-1,70 , metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00 , submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00 , subtelocêntrico (st);

RB= maior que 7,00 , acrocêntrico (a)

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com 2 braços cromossômicos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram divididos em dois capítulos que correspondem a possíveis trabalhos a serem submetidos para publicação em periódicos especializados.

### Capítulo 1

Polimorfismo cariotípico numérico e estrutural em *Rineloricaria* cf. *lima* (Siluriformes, Loricariidae): sítios cromossômicos instáveis atuando na diversificação cariotípica

### Capítulo 2

Citogenética comparativa em Loricariidae (Actinopterygii, Siluriformes): Uma análise cromossômica em grupos basais

## Capítulo 1

### **Polimorfismo cariotípico numérico e estrutural em *Rineloricaria* cf. *lima* (Siluriformes, Loricariidae): sítios cromossômicos instáveis atuando na diversificação cariotípica.**

#### **Resumo**

Este trabalho procurou analisar a origem e manutenção do polimorfismo cromossômico, observado em duas populações de *Rineloricaria* cf. *lima* das nascentes do rio Ribeira (ribeirão do Areia e rio Açungui – PR, Brasil), utilizando procedimentos de citogenética clássica (coloração convencional por Giemsa, bandamento C e coloração por Prata coloidal - Ag-RON) e moleculares (FISH com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e telomérica). Foi detectada uma variação de  $2n = 66$  a  $2n = 70$  cromossomos em ambas as populações amostradas, com número fundamental variando de 70 a 72. Com base no cariótipo e nos resultados da FISH com as sondas empregadas foram estabelecidos sete citótipos presentes nas populações. Foi hipotetizado que *R. cf. lima* diversificou por fissão cêntrica a partir do número diplóide  $2n = 54$ , considerado basal para Loricariidae, gerando sítios instáveis nos pontos de quebra. Estes sítios instáveis podem ter desencadeado fusões Robertsonianas para sua cicatrização, gerando o polimorfismo de 66 a 70 cromossomos observados atualmente. A formação de números diplóides ímpares teriam como consequência a formação de diferentes combinações gaméticas, as quais podem ter gerado alterações do NF superior a 70. Por fim, a heterocromatinação facultativa parece ter atuado nos braços cromossômicos extras, uma decorrência adaptativa protetora de possíveis danos causados pela duplicação de braços cromossômicos. Todos estes mecanismos são promotores de aumento da variabilidade e auxiliam a manutenção do polimorfismo observado em *R. cf. lima*.

## Introdução

Entre os Loricariidae, a subfamília Loricariinae é a segunda mais numerosa e os dados citogenéticos mostram uma grande diversidade tanto no que se refere ao número de cromossomos quanto à fórmula cariotípica (ALVES *et al.*, 2005; KAVALCO *et al.*, 2005). Nesta família, o  $2n = 54$  cromossomos é considerado característica primitiva (ARTONI e BERTOLLO, 2001). *Rineloricaria* é um gênero especioso da subfamília que apresenta ampla variação de números diplóides:  $2n = 36$  em *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998) a  $2n = 70$  em *Rineloricaria* sp. (ALVES *et al.*, 2005). Outra característica cromossômica importante para espécies deste gênero é a grande quantidade de variações inter e intrapopulacionais (ALVES *et al.*, 2005). Em relação ao número diplóide ancestral ( $2n = 54$ ), duas tendências de evolução cariotípica são observadas em Loricariinae: (i) de redução numérica por fusão cêntrica e, (ii) aumento de número cromossômico atribuída a mecanismo de fissão Robertsoniana (ALVES *et al.*, 2005). Em *Rineloricaria latirostris* foi observado um polimorfismo Robertsoniano estável com variação de  $2n = 36$  a 48 cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998).

Os genomas eucarióticos contêm grandes somas de sequências repetitivas gênicas e principalmente não gênicas (BERIDZE, 1986). A atuação destes DNAs repetitivos é amplamente conhecida na organização e evolução dos genomas com reflexo na especiação (CHARLESWORTH *et al.*, 1994; MARTINS *et al.*, 2006; KANTEK *et al.*, 2009; VICARI *et al.*, 2010; BLANCO *et al.*, 2011). Também é entendido que mecanismos de fissão cêntrica, como os que levam ao aumento do número cromossômico em algumas espécies geram sítios instáveis nos cromossomos (PERRY *et al.*, 2004). Por outro lado, a redução do número diplóide a partir do  $2n$  primitivo é frequentemente atribuída a fusões Robertsonianas. Fusões Robertsonianas são conhecidas pela união de cromossomos acro/telocêntricos por seus centrômeros, algumas vezes mantendo resquícios de DNA telomérico (ITS – *interstitial telomeric sites*) ou não no ponto de fusão (SLIJEPCEVIC, 1998). Estas fusões são atribuídas a mecanismos de encurtamento ou inativação dos telômeros, regiões descondensadas do DNA, ou a presença de sequências similares a

telomérica em DNAs repetitivos centroméricos, como transposons e outros (SHAMPAY *et al.*, 1995; SLIJEPCEVIC, 1998). Vários estudos têm demonstrado que a presença de ITS pode promover rearranjos e fragilidade cromossômica (BOUFFLER *et al.*, 1993; DAY *et al.*, 1998; DESMAZE *et al.*, 1999; KILBURN *et al.*, 2001; PEITL *et al.*, 2002).

Diante das extensas variações cromossômicas observadas em espécies da subfamília Loricariinae, este estudo teve por objetivo caracterizar o polimorfismo cromossômico numérico e estrutural encontrado em *Rineloricaria cf. lima* por meio de procedimentos de bandamentos cromossômicos clássicos e citogenética molecular.

## **Material e Métodos**

No presente trabalho foram analisadas duas populações de *Rineloricaria cf. lima* das nascentes do rio Ribeira-PR, no Sul do Brasil. No Ribeirão do Areia, Ponta Grossa-PR foram coletados 8 machos e 7 fêmeas e no rio Açungui, Campo Largo-PR 5 machos e 3 fêmeas. A espécie foi identificada taxonomicamente pelo Dr. Cláudio Henrique Zawadzki da Universidade Estadual de Maringá. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo: 04741/08) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A obtenção dos cromossomos mitóticos foi através de células do rim anterior pelo procedimento “air drying”, segundo Bertollo *et al.*, (1978). As regiões heterocromáticas foram evidenciadas pelo bandamento C, descrita por Sumner (1972). Os sítios de regiões organizadoras de nucléolo (RON) foram detectados pela impregnação do íon Prata, de acordo com Howell e Black (1980). Ensaios de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram desenvolvidos conforme Pinkel *et al.*, (1986). Neste estudo, foram utilizadas três sondas para o mapeamento físico destas sequências sobre os cromossomos: uma sonda de rDNA 18S, obtida do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004), uma sonda de rDNA 5S, isolada a partir do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999) e uma sonda para sequência telomérica de eucariotos (IJDO *et al.*,

1991). As sondas foram marcadas pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), utilizando os haptenos biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche). A reação de PCR de marcação a partir de *primers* para a região flanqueadora do plasmídeo PGemT foi realizada para os clones de rDNA com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de dUTP 11- digoxigenina ou dUTP 16 biotina, 1 μM primer M13 F, 1 μM primer M13 R e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 5 min a 94°; 35 ciclos: 1 min a 90°C, 1 min e 30 s a 52°C e 1 min e 30 s a 72°C. Para a marcação da sonda telomérica foi utilizada a seguinte reação (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de dUTP 11- digoxigenina, 0,2 μM primer (TTAGGG)<sub>6</sub>, 0,2 μM primer (AATCCC)<sub>6</sub> e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes especificações: duas condições de amplificação, a primeira amplificação é realizada com baixa estringência: 4 min a 94°; 12 ciclos de (1 min a 94°C, 45s a 52°C e 1 min e 30s a 72°C), seguidos por 35 ciclos de alta estringência (1 min a 94°C, 1 min e 30 s a 60°C e 1 min e 30 s a 72°C). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus). Para a montagem dos cariótipos os cromossomos foram identificados de acordo com a relação de braços (RB), proposto por Levan *et al.* (1964) e agrupados como metacêntricos/submetacêntricos (m/sm) e subtelo-cêntricos/acrocêntricos (st/a). Para o estabelecimento do NF foram considerados os cromossomos st/a como um único braço cromossômico.

## Resultados

A análise do número diplóide de *Rineloricaria cf. lima* demonstrou um polimorfismo numérico de  $2n = 66$  a  $2n = 70$  cromossomos em ambas as populações estudadas. Neste estudo, determinou-se a ocorrência de sete citótipos distintos, aqui denominados de A – G. A frequência de ocorrência populacional destes citótipos está indicada na Tabela I.

### **Citótipo A**

O citótipo A foi caracterizado por apresentar  $2n = 66$  cromossomos, fórmula cariotípica  $4m/sm+62st/a$ ,  $NF = 70$  (Fig. 1 A). A heterocromatina encontra-se na região centromérica de todos os cromossomos do complemento, além de estar co-localizada aos sítios de RONS em todos citótipos analisados (Figs. 1 e 2). O rDNA 18S foi localizado no braço curto do primeiro par subtelo/acrocêntrico em todos os citótipos (Fig. 3). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região centromérica de um cromossomo metacêntrico e na região terminal do braço curto dos quatro primeiros pares de acrocêntricos (Fig.3 A). A FISH com sonda telomérica evidenciou, além de todos telômeros marcados dois cromossomos meta/submetacêntricos não homólogos com sítios ITS em região centromérica (Fig.4 A).

### ***Citótipo B***

Este citótipo foi caracterizado por apresentar  $2n = 68$  cromossomos, fórmula cariotípica  $4m/sm+64st/a$  e  $NF = 72$  (Fig. 1 C). Além da distribuição padrão da heterocromatina, o braço curto de um par de cromossomos sm foi heterocromático (Fig. 1D). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região centromérica de três cromossomos meta/submetacêntricos e na região terminal do braço curto de dois pares de acrocêntricos (Fig. 3 B). Neste citótipo não foram observados sítios ITS.

### ***Citótipo C***

Espécimes com esta constituição apresentaram  $2n = 68$  cromossomos, fórmula cariotípica  $2m+66st/a$  e  $NF = 70$  (Fig. 1 E). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região terminal do braço curto de cinco pares de acrocêntricos (Fig. 3 C). Este citótipo apresentou sítios ITS em região intersticial de dois cromossomos metacêntricos, aparentemente não homólogos (Fig. 4B).

### ***Citótipo D***

O citótipo D foi caracterizado por apresentar  $2n = 69$  cromossomos, fórmula cariotípica  $2sm+67st/a$  e  $NF = 71$  (Fig. 2 A). Além da distribuição padrão da heterocromatina, o braço curto de um cromossomo sm foi heterocromático (Fig. 2B). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região centromérica de um cromossomo submetacêntrico e na região terminal do braço curto de quatro pares de acrocêntricos (Fig. 3 D). Não foram observados sítios ITS.

### ***Citótipo E***

Neste citótipo foi observado  $2n = 69$  cromossomos, fórmula cariotípica  $1m+68st/a$  e  $NF = 70$  (Fig. 2 C). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região terminal do braço curto de cinco pares de acrocêntricos (Fig. 3 E). Um sítio ITS foi localizado em região centromérica de um cromossomo metacêntrico (Fig. 4C).

### **Citótipo F**

Este citótipo foi caracterizado por apresentar  $2n = 70$  cromossomos, fórmula cariotípica  $2m+68st/a$  e  $NF = 72$  (Fig. 2 E). Além da distribuição da heterocromatina padrão, este citótipo apresentou grandes blocos heterocromáticos na região centromérica e terminal do braço longo do par metacêntrico (Fig. 2 F). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região centromérica do par metacêntrico e na região terminal do braço curto de três pares de acrocêntricos (Fig. 3 F). Não foram observados sítios ITS.

### **Citótipo G**

O citótipo G foi caracterizado por apresentar  $2n = 70$  cromossomos, fórmula cariotípica  $70st/a$ ,  $NF = 70$  (Fig. 2 G). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região terminal do braço curto de cinco pares de acrocêntricos (Fig. 3 G). Neste citótipo não foram observados sítios ITS.

## **Discussão**

A família Loricariidae tradicionalmente é conhecida por apresentar  $2n = 54$  cromossomos como caráter basal. Entre estes, a subfamília Loricariinae é uma das que apresenta maior variação no número diplóide:  $2n = 36$  a  $2n = 74$  cromossomos (ALVES *et al.*, 2005). Eventos de inversão pericêntrica e fusões/fissões Robertsonianas são considerados os principais processos causadores da diversidade cariotípica observada na subfamília Loricariinae e são os responsáveis pela ampla variabilidade de mudanças numéricas e estruturais (ALVES *et al.*, 2003).

No presente estudo, foi caracterizado um polimorfismo numérico e estrutural em *Rineloricari cf. lima* do extremo sul da bacia do rio Ribeira, Brasil, com variação do número diplóide ( $2n$ ), número de braços ( $NF$ ), heterocromatina, número e localização de sítios rDNA 5S e presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS)

(Tabela I). Seguindo a tendência da evolução cariotípica dos Loricariinae, uma hipótese para explicar a variação numérica de 66 a 70 cromossomos em *R. cf. lima* seria admitir mecanismos de fissão cêntrica a partir do  $2n = 54$  ancestral (ALVES *et al.*, 2005). No entanto, para *R. cf. lima*, um conjunto de evidências permitem inferir que tanto fissões quanto fusões atuaram na diversificação cromossômica da espécie em diferentes populações.

A primeira hipótese a ser postulada sugere que as populações de *R. cf. lima* estudadas diversificaram (a partir do  $2n = 54$ ) por fissões cêntricas até atingir o  $2n = 70$  cromossomos *st/a*,  $NF = 70$ , cinco pares acrocêntricos portadores de rDNA 5S pericentromérico e nenhum ITS, a exemplo do que ocorre no citótipo G. Essas inúmeras fissões gerariam cromossomos sem sequências teloméricas nas extremidades, o que tornaria estes cromossomos fissionados altamente susceptíveis a degradação (PERRY *et al.*, 2004). A proteção das extremidades cromossômicas, nestes casos, pode ocorrer por uma série de mecanismos. Primeiramente, à região final quebrada deve ser adicionado um novo telômero. Esse processo conhecido como cicatrização envolve a captura de uma região telomérica de um outro cromossomo por recombinação (DUNHAM *et al.*, 2000) ou pela adição de novas sequências de repetição telomérica aos finais quebrados dos cromossomos pela telomerase (MEYNE *et al.*, 1990; RICHARDS *et al.*, 1991; SLIJEPCEVIC, 1998). No entanto, a estabilização das fissões cromossômicas também pode ser gerada por rearranjos estruturais. Em *R. cf. lima* todos estes mecanismos podem estar atuando para a estabilização dos finais dos cromossomos gerados por fissão favorecendo o aparecimento de todos os outros citótipos observados até o  $2n = 66$  cromossomos.

A estabilização das fissões cromossômicas por rearranjos estruturais pode ocorrer de diversas formas: formação de cromossomos em anel; formação de isocromossomo pela união das duas cromátides irmãs quebradas no mecanismo tipo em U, translocação da cromátide quebrada e, por fusão final para final de cromossomos (GARDNER e SUTHERLAND, 2004; PERRY *et al.*, 2004). Diante deste aspecto, o próprio evento de amplificação, ou seja, maturação de neo-telômeros e centrômeros possibilitaria a fissão cêntrica o que torna o cromossomo mais instável e propício para se fundir a outro cromossomo (RUIZ-HERRERA *et al.*,

2008). Ainda, em um grande número de casos, os sítios de fusão exibem filamentos de cromatina indicativos de descondensação (SLIJEPCEVIC *et al.*, 1997). Ao que tudo indica, o mecanismo principal evidenciado em *R. cf. lima* para a estabilização dos sítios gerados por fissão deve ser de rearranjos do tipo fusão. As evidências para este mecanismo seriam a presença de sítios ITS na região pericentromérica de alguns cromossomos meta/submetacêntricos, como visualizado no citótipo A e a fusão de cromossomos portadores do rDNA 5S em região terminal formando cromossomos meta/submetacêntricos.

No citótipo G,  $2n = 70$  st/a (aqui considerado o ponto inicial da diversificação observada atualmente) ocorrem 10 cromossomos portadores de sítios com rDNA 5S em região terminal. Contando que 2 sítios de rDNA 5S geram um único no ponto de fusão (como observado nos citótipos A, B, D e F) a relação de “10 clusters” rDNA 5S seria mantida. Tradicionalmente, sítios de rDNA 5S ou seus pseudogenes são conhecidos pela ampla movimentação nos genomas de peixes (MARTINS *et al.*, 2006). No caso de *R. cf. lima* é possível inferir que este DNA repetitivo gênico propicie pontos de fusão devido a sua intensa atividade e descondensação. Este mecanismo está de acordo com Slijepcevic *et al.* (1997) que descreveram que a descondensação da cromatina terminal pode levar a fusões final para final de cromossomos mesmo na condição de telômeros longos. Ainda, para o citótipo C foram observados dois cromossomos m/sm portando ITS em região intersticial. Essa situação pode ser gerada por rearranjos estruturais tipo translocação ou inversão pericêntrica, e também atuam na cicatrização dos pontos instáveis (GARDNER e SUTHERLAND, 2004; PERRY *et al.*, 2004; RUIZ-HERRERA *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a ocorrência de diferentes NF seria outro ponto favorável a hipótese de fusão cêntrica como geradora do polimorfismo observado em *R. cf. lima*. Rearranjos Robertsonianos são conhecidos por aumentar ou diminuir o número cromossômico com manutenção do NF (MEYNE *et al.*, 1990; RICHARDS *et al.*, 1991; SLIJEPCEVIC, 1998). Entre os sete citótipos observados nesta espécie, foi observado uma variação de NF (70, 71 e 72). Nesta situação, considerando o NF=72 como primitivo, todos citótipos com NF =70 teriam sofrido importantes deleções de braços cromossômicos. Deleções são reconhecidas por serem altamente

prejudiciais e muitas vezes deletérias (KING, 1993; SUMNER, 2003). Desta forma, a hipótese de  $2n = 70$  st/a e  $NF = 70$  seria suportada pela manutenção dos conjuntos cromossômicos em todos citótipos e com duplicações nos  $NF = 71$  e  $72$ . As duplicações, na maioria das vezes, não são prejudiciais e geram fonte de variabilidade para evolução de sequências e cromossômica (KING, 1993; SUMNER, 2003).

Diante deste aspecto, como seriam gerados os  $NF$  maiores que 70? Combinações gaméticas com cromossomos meta/submetacêntricos originados por fusão poderiam levar ao aumento do  $NF$ . Usando como exemplo o citótipo E com  $2n = 69$  ( $1m+68st/a$ ), na segregação são formados gametas com  $34st/a$  e um desbalanceado  $1m+34st/a$  (com um braço cromossômico a mais). Na fecundação a partir de dois gametas desbalanceados com  $1m+34st/a$  originaria o citótipo F,  $2n = 70$ , fórmula cariotípica  $2m+68st/a$  e  $NF = 72$ . Claramente a geração destes gametas desbalanceados (com duplicação de braços cromossômicos) não está afetando a viabilidade individual. Embora a meiose destes indivíduos possa estar perturbada, a ausência ou baixa possibilidade de formar gametas com deleções tem mantido esta situação polimórfica.

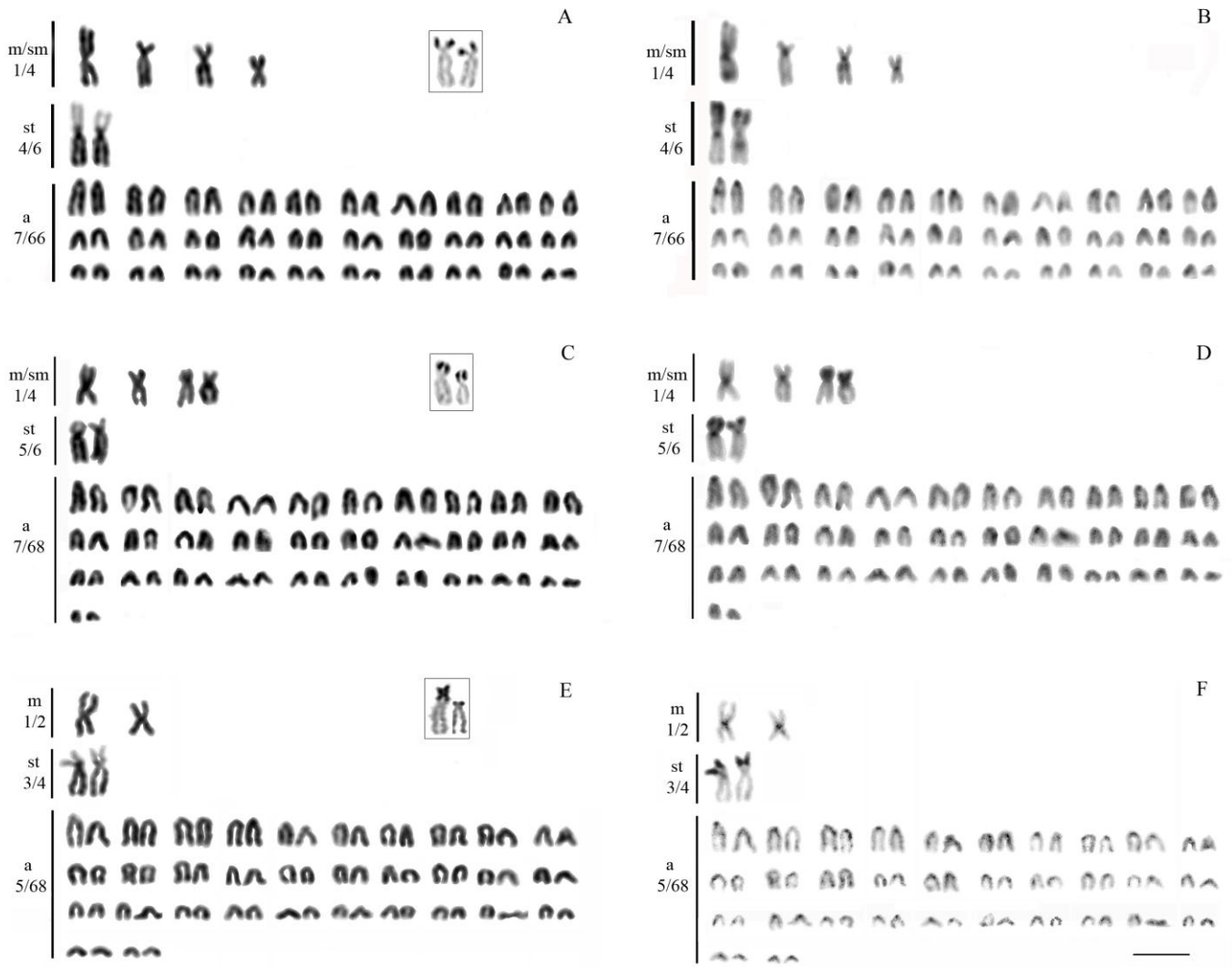
Ainda, citótipos com  $NF$  maiores que 70 mostram a heterocromatinização parcial ou total dos braços extras. O silenciamento gênico pode envolver a eucromatina ou genes  $\beta$ -heterocromáticos e é quando a heterocromatina se espalha normalmente em locos eucromáticos ou heterocromáticos (HOLMQUIST e ASHLEY, 2006). VICARI *et al.* (2008) já reportaram silenciamento gênico e heterocromatinização no peixe *Astyanax janeiroensis*. Em *R. cf. lima* a heterocromatinização facultativa dos braços cromossômicos extras parece surgir como alternativa adaptativa aos danos da duplicação gênica e auxiliar na manutenção da viabilidade individual.

Em síntese, em *R. cf. lima* é demonstrado ocorrer uma série de eventos cromossômicos sem comprometer a manutenção da viabilidade populacional da espécie que diversificou até  $2n = 70$  st/a por fissões cêntricas gerando sítios instáveis nos pontos de quebra. Na cicatrização destes pontos de quebra, fusões Robertsonianas ocorrem gerando o polimorfismo de 66 a 70 cromossomos.

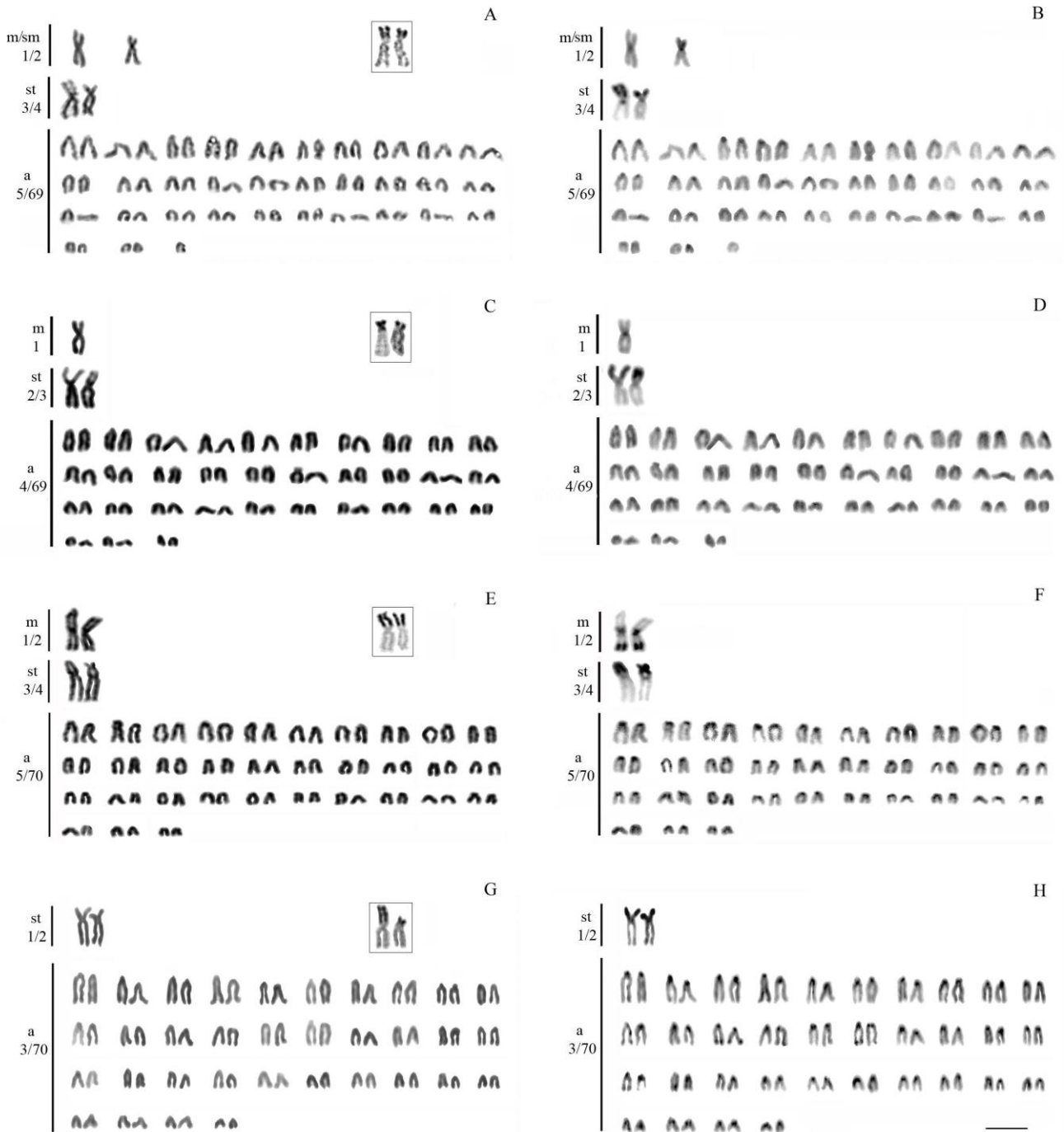
Diferentes combinações gaméticas geraram alterações do NF superior a 70. A heterocromatinação facultativa parece ocorrer de modo a evitar possíveis danos das duplicações de braços cromossômicos.

### **Referências**

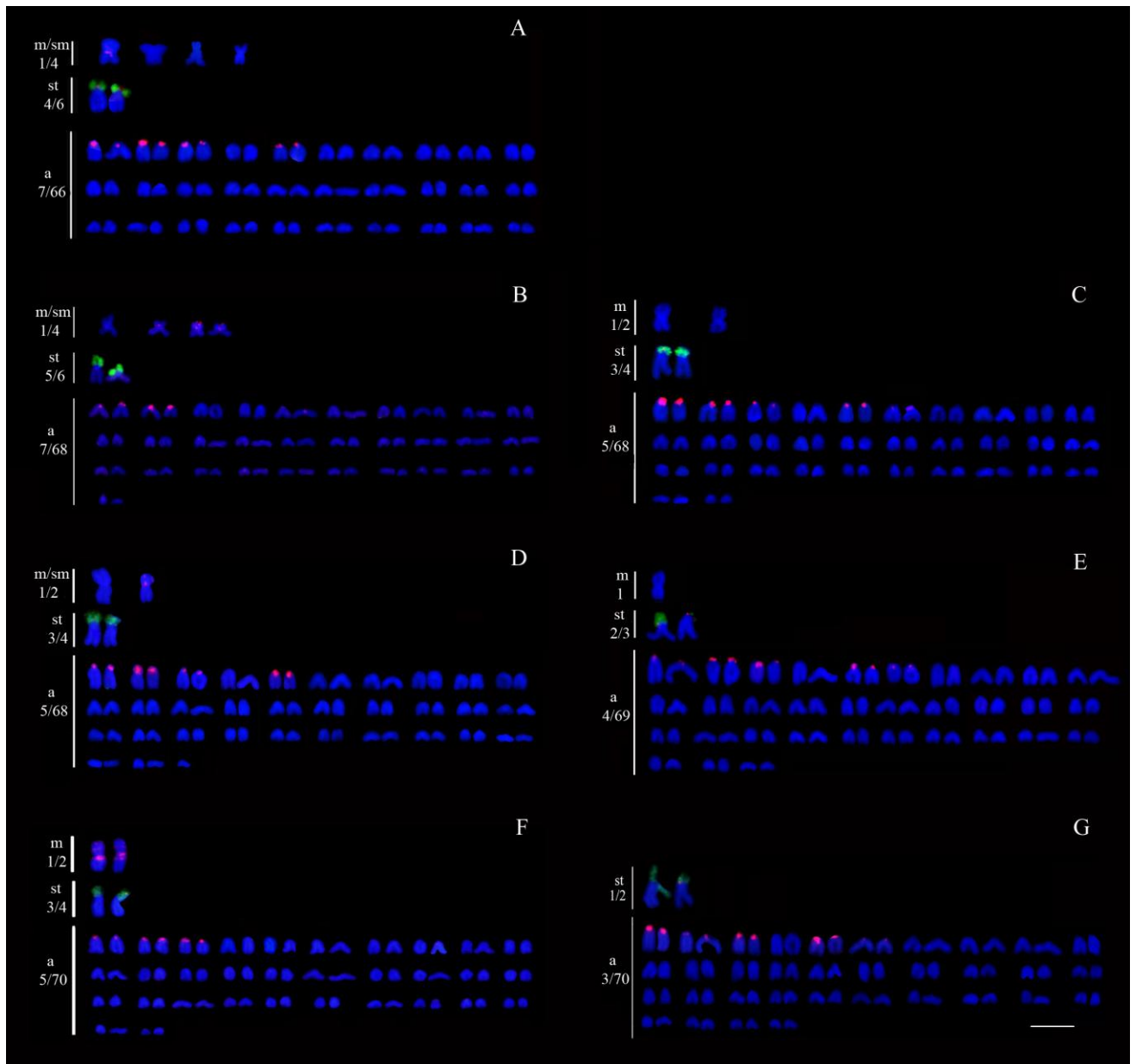
As referências bibliográficas deste capítulo estão reunidas no final deste trabalho.



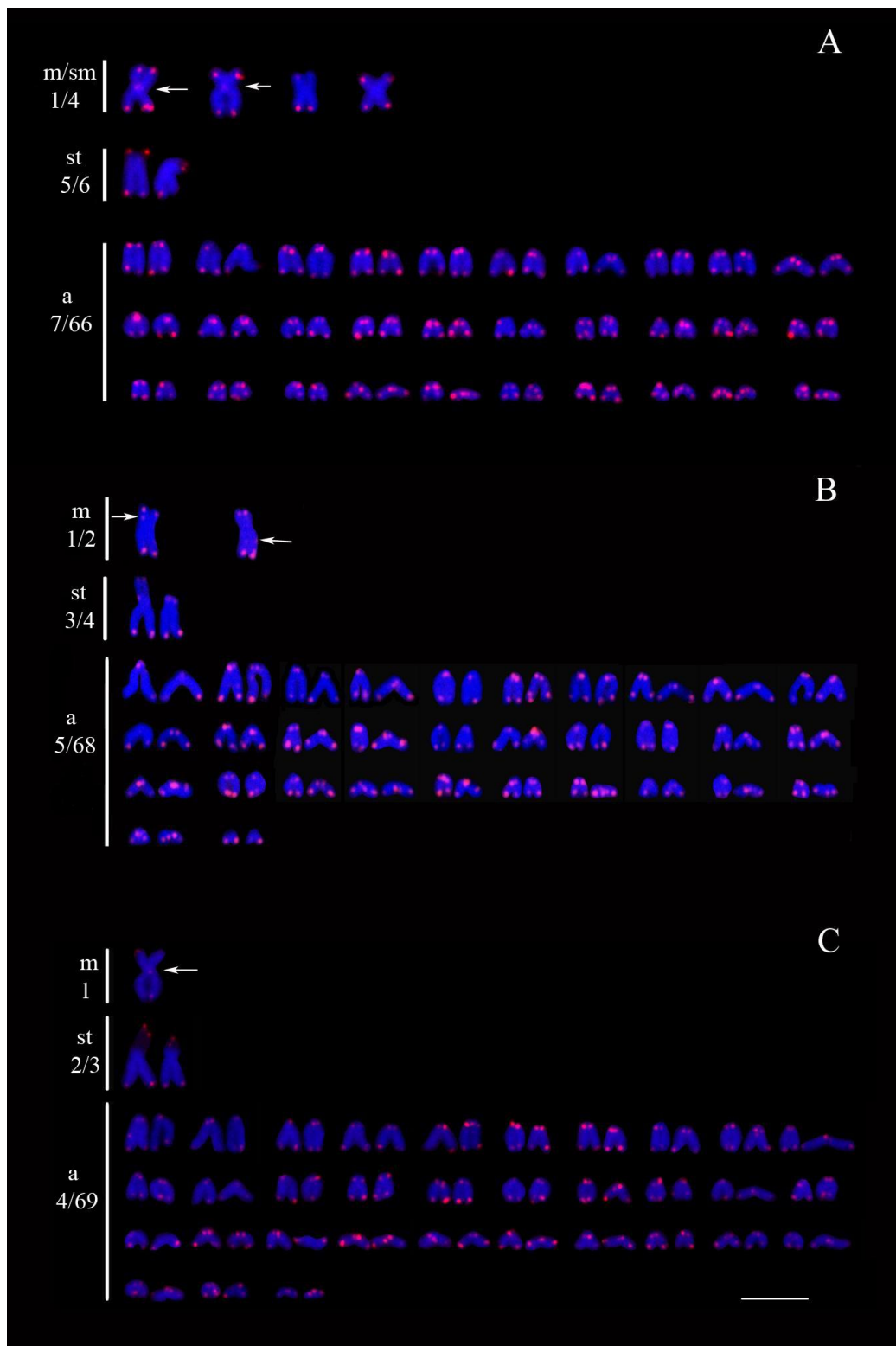
**Figura 1.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima*: (A e B) citótipo A; (C e D) citótipo B; (E e F) citótipo C. (A, C, E) coloração convencional por Giemsa e em (B, D e F) bandamento C sequencial. Nas caixas, par portador da RON. Barra = 10 µm.



**Figura 2.** Citótipos de *Rineloricaria* cf. *lima*: (A e B) citótipo D; (C e D) citótipo E; (E e F) citótipo F; (G e H) citótipo G. (A, C, E e G) coloração convencional por Giemsa e em (B, D, F e H) bandamento C sequencial. Nas caixas, portador da RON. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 3.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima* submetidos à técnica de dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Citótipos A a G ordenados alfabeticamente. Barra = 10  $\mu$ m.

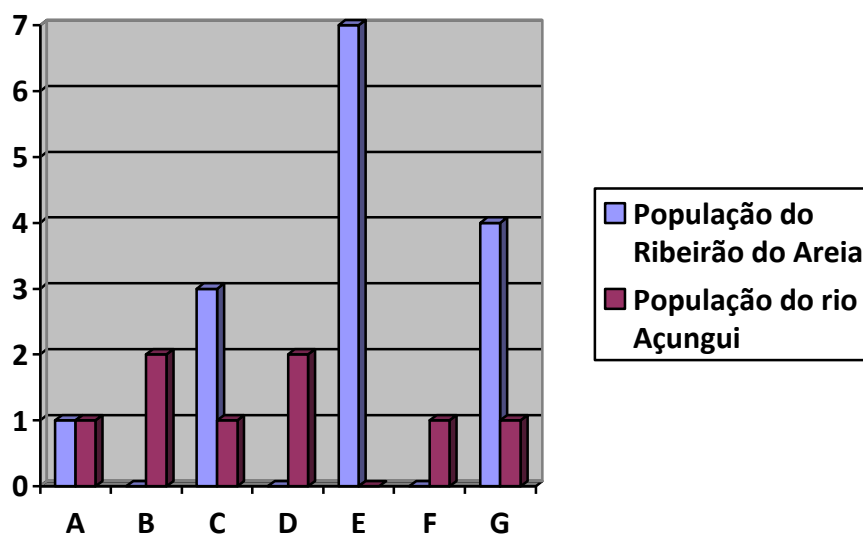


**Figura 4.** Citótipos de *Rineloricaria cf. lima* submetidos à técnica de FISH utilizando sonda telomérica. Em (A) citótipo A; (B) citótipo C e; (C) citótipo E. Barra = 10 µm.

**Tabela I.** Dados cariotípicos dos sete citótipos de *Rineloricaria cf. lima*.

Citótipos	2n	Fórmula cariotípica	NF	Sítios 18S	Sítios 5S	ITS
A	66	4m/sm+62st/a	70	1 par st	1 m + 8 a	2 m/sm
B	68	4m/sm+64st/a	72	1 par st	3 m/sm + 4 a	-
C	68	2m+66st/a	70	1 par st	10 a	2 m
D	69	2m/sm+67st/a	71	1 par st	1 sm + 8 a	-
E	69	1m+68st/a	70	1 par st	10 a	1 m
F	70	2m+68st/a	72	1 par st	2m + 6 a	-
G	70	70st/a	70	1 par st	10 a	-

Gráfico com o número de espécimes observados de cada citótipo nas duas populações.



## Capítulo 2

### **Citogenética comparativa em Loricariidae (Actinopterygii, Siluriformes): Uma análise cromossômica em grupos basais**

#### **Resumo**

Nas últimas décadas a família Loricariidae vem sofrendo constantes reformulações de agrupamentos filogenéticos. Neste trabalho foram estudadas quatro espécies da família, sendo três da subfamília Neoplecostominae: *Neoplecostomus yapo*, *Kronichthys lacerta*, *Isbrueckerichthys duseni* e; uma de Hypoptopomatinae: *Parotocinclus maculicauda*; com objetivo de comparar os dados cromossômicos em grupos basais de Loricariidae. Também foi organizada uma revisão dos dados cariotípicos já descritos na família no seu agrupamento mais recente com objetivo de discutir os dados frente a evolução cariotípica do grupo e da citotaxonomia dos táxons considerados basais em Loricariidae. Para isto, foram utilizados marcadores cromossômicos convencionais (número diplóide, fórmula cariotípica, número fundamental e Ag-RON) e moleculares (dupla FISH com sondas de rDNA 18S e 5S). Os resultados encontrados demonstraram uma estrutura cariotípica similar entre as espécies dos gêneros considerados primitivos da família. Foram estabelecidas e/ou corroboradas inferências sobre marcadores cromossômicos possivelmente plesiomórficos para Loricariidae, sendo estas:  $2n=54$  cromossomos, pouca quantidade de heterocromatina, um único par portador da RON e sintonia dos rDNAs 18S e 5S em região intersticial. A revisão também aponta tendências de diversificação cariotípica, onde as subfamílias mais especiosas apresentam intensa diferenciação cromossômica contribuindo para o isolamento genético/reprodutivo. Desta forma, esta análise cromossômica estabelece caracteres cromossômicos primitivos e propicia um melhor entendimento dos processos de evolução cromossômica entre os Loricariidae.

## Introdução

A ordem Siluriformes pertence à superordem Ostariophysi (REIS *et al.*, 2003). Dentro de Ostariophysi, os Siluriformes constituem um grupo bastante diverso com ampla distribuição geográfica. Representam a sexta maior ordem entre os vertebrados vivos, incluindo 36 famílias, cerca de 477 gêneros e mais de 3.088 espécies (FERRARIS, 2007). Porém estes números nunca são exatos devido à constante descoberta de novos táxons.

A superfamília Loricarioidea é um dos grupos de Siluriformes melhor estudado, onde encontramos três das famílias mais especiosas desta ordem, Loricariidae (785 espécies), Callichthyidae (194 espécies) e Trichomycteridae (207 espécies), entre outras (de PINNA, 1998; BRITTO, 2003; REIS, 2003; FERRARIS, 2007; ESCHMEYER e FRICKE, 2010). Os Loricariidae estão distribuídos por toda a região Neotropical, estendendo-se da Costa Rica à Argentina (REIS *et al.*, 2003). São comumente reconhecidos por possuírem o corpo recoberto por placas dérmicas (o que lhes confere o nome popular de “cascudos”) e a boca em forma de ventosa localizada na região ventral. No entanto, a classificação das subfamílias de Loricariidae e o agrupamento dos gêneros tem sido alvo de constantes reformulações (ISBRÜCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; REIS *et al.*, 2006). Armbruster (2004) considera as subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae válidas para este grupo. Nesta revisão, a antiga subfamília Ancistrinae foi considerada como sinônima de Hypostominae, a qual passou a ser constituída por cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepanini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. Adicionalmente, os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram alocados na subfamília Neoplecostominae (ARMBRUSTER, 2004). Posteriormente, Reis *et al.* (2006) criaram uma nova subfamília, Delturinae, incorporando os gêneros *Delturus* e *Upsilonodus*, os quais apresentam duas sinapomorfias irreversíveis. REIS *et al.* (2006) também mantiveram Neoplecostominae, no entanto, com a necessidade de reavaliar a relação de parentesco entre cada um de seus gêneros propostos por Armbruster

(2004) e com a subfamília Hypoptomatinae. Mais recentemente, Cramer (2009) usando dados moleculares nucleares e mitocondriais e dados morfológicos alocou o gênero *Hemipsilichthys* dentro da subfamília Delturinae.

Os estudos citogenéticos em Loricariidae demonstram uma ampla variabilidade de números, fórmulas e marcadores cromossômicos (Tabela II). Apesar desta grande variabilidade, a análise dos cariótipos nas espécies da família têm demonstrado tendências evolutivas bem definidas, possibilitando inferências de agrupamentos (ARTONI e BERTOLLO, 2001; ALVES *et al.*, 2005; KAVALCO *et al.*, 2005). A variação do número diplóide nos representantes estudados da família é de  $2n=34$  em *Ancistrus cuiabae* a  $2n=96$  em *Upsilonodus* sp. (Tabela II). No entanto, o  $2n=54$  cromossomos foi considerado basal na família (ARTONI e BERTOLLO, 2001). Mesmo com o grande número de espécies estudadas citogeneticamente em Loricariidae, a grande maioria destes são limitados a descrição de número e fórmula cromossômica. Assim, são poucas as inferências evolutivas a cerca de outros marcadores cromossômicos, como por exemplo, a heterocromatina e a localização cromossômica dos rDNAs.

Desta forma, este estudo utilizou marcadores cromossômicos de forma comparativa entre algumas espécies pertencentes a Neoplecostominae e Hypoptopomatinae e revisou esta situação entre as subfamílias no seu agrupamento mais recente com objetivo de discutir os dados frente a evolução cariotípica do grupo e da citotaxonomia dos táxons considerados basais em Loricariidae.

## **Material e Métodos**

No presente trabalho foram estudadas citogeneticamente quatro espécies da família Loricariidae: *Neoplecostomus yapo*; *Kronichthys lacerta* e *Isbrueckerichthys duseni* (Neoplecostominae); e *Parotocinclus maculicauda* (Hypoptopomatinae), com número de espécimes e localidade de amostragem resumidos na tabela I. As espécies foram identificadas taxonomicamente pelo Dr. Cláudio Henrique Zawadzki da Universidade Estadual de Maringá. Os procedimentos estão de acordo com o

Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo: 04741/08) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Nos procedimentos citogenéticos foi realizada a obtenção dos cromossomos mitóticos realizado pelo procedimento “air drying”, descrito por Bertollo *et al.* (1978). As regiões heterocromáticas foram evidenciadas pelo bandamento C, descrita por Sumner (1972). Os sítios de regiões organizadoras de nucléolo foram detectados pela impregnação do íon prata, descrita por Howell e Black (1980). Híbridizações *in situ* fluorescentes (FISH) foram desenvolvidas conforme Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI Jr 2004), rDNA 5S (MARTINS e GALETTI Jr 1999). As sondas foram marcadas pela técnica de PCR, utilizando os compostos biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche). A reação de PCR a partir de primers para a região flanqueadora do plasmídeo PGemT, o qual continha os insertos, foi realizada para a marcação dos clones de rDNA com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de dUTP 11- digoxigenina ou dUTP 16 biotina, 1 μM primer M13 F, 1 μM primer M13 R e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 5 min a 94°; 35 ciclos: 1 min a 90°C, 1 min e 30 s a 52°C e 1 min e 30 s a 72°C. Todas as misturas de hibridação tiveram uma estríngência de 77% (1μg de cada sonda, 50% formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2xSSC). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software DP controller (Media Cybernetics). Para a montagem dos cariótipos os cromossomos foram identificados de acordo com a relação de braços (RB), proposto por Levan *et al.* (1964), assim classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a).

## Resultados

As quatro espécies estudadas; três de Neoplecostominae (*Neoplecostomus yapo*, *Kronichthys lacerta* e *Isbrueckerichthys duseni*) e uma de Hypoptopomatinae: *Parotocinclus maculicauda* apresentaram 2n=54 cromossomos e NF = 108 (Figs. 1,

2 e 3). No entanto, as fórmulas cromossômicas foram de: 18m+20sm+16st em *N. yapo*, 22m+22sm+10st em *K. lacerta*, 20m+20sm+14st em *I. duseni* e 20m+20sm+14st na espécie *P. maculicauda* (Figs. 1, 2 e 3).

A heterocromatina foi localizada nos cromossomos das quatro espécies estudadas. Em *N. yapo* foram observados blocos heterocromáticos no braço longo dos pares 10 e 24 e bandas menos evidentes em região centromérica de outros cromossomos (Fig. 1B). Em *K. lacerta* a heterocromatina foi localizada na região pericentromérica dos cromossomos 12, 13, 24 e 25, na região distal do par 23 e em blocos menos evidentes de outros cromossomos (Fig. 1D). Nesta espécie, foi observado um heteromorfismo de heterocromatinização para o braço longo do par 24 (Fig. 1F). Em ambas as populações de *I. duseni* evidenciou-se uma distribuição de blocos de heterocromatina em região terminal do braço curto dos pares 7, 9, 10, 23, 25 e 26, em região proximal e equidistante dos pares cromossômicos 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 21, além do grande bloco heteromórfico para o par sm 11 (Fig. 2B e 2D). Esse par demonstra-se polimórfico em ambas as populações analisadas, onde são verificadas situações (i) homozigota para blocos de tamanho reduzido, (ii) a situação heterozigota, (iii) homozigota para os blocos maiores (Fig 2E). Em *P. maculicauda* a heterocromatina foi localizada preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos pares 4, 11, 14, 16, 17 e 18, além de estar localizada no braço longo do par 12 em região proximal e terminal (Fig. 3B, D, F).

As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram localizadas por impregnação do íon prata na região intersticial do braço longo do par de cromossomos sm 10 em *N. yapo* (Fig. 1A, em destaque); na região intersticial do braço longo do par st 23 em *K. lacerta* (Fig. 1C, em destaque), na região subterminal do braço longo do par sm 11 em *I. duseni* (Fig. 2B, em destaque) e, e na região intersticial do braço longo do par cromossômico sm 12 em *P. maculicauda* (Figura 3 A, em destaque).

A dupla FISH com sondas de rDNA 18S e rDNA 5S mostrou sítios cromossomo independente em *N. yapo*, onde o rDNA 18S foi localizado na região intersticial do braço longo do par de cromossomos sm 10 e os sítios de rDNA 5S foram localizados em região intersticial do braço longo do par 24 (Fig. 4A). Nas

espécies *K. lacerta*, *I. duseni* e *P. maculicauda* os rDNAs 18S e 5S foram localizados sintênicos e adjacentes. *Kronichthys lacerta* apresentou os rDNAs no par st 23, com o rDNA 18S intersticial e o rDNA 5S distal no braço longo (Fig. 4B). Em *I. duseni* os rDNAs foram localizados no par sm 11, com sítio de rDNA 18S subterminal e sítio de rDNA 5S intersticial no braço longo (Fig. 5). Já *P. maculicauda* apresentou a sintonia dos rDNAs no par cromossômico sm 12, onde foram localizados sítios rDNA 18S intersticiais e sítios rDNA 5S distais ao braço longo (Fig. 6). Ainda, nesta espécie pode ser observado um heteromorfismo de tamanho no par sm 12 devido a presença do rDNA 18S no braço longo deste par cromossômico em apenas um dos homólogos (Fig. 6B).

## Discussão

Os dados cariotípicos já descritos para Loricariidae demonstram uma enorme diversidade de caracteres cromossômicos; no entanto, algumas tendências evolutivas bem caracterizadas entre as distintas subfamílias (Tabela II). Artoni e Bertollo (2001) consideraram  $2n=54$  cromossomos como um provável carácter plesiomórfico em Loricariidae, visto que este número se encontra presente em gêneros basais da família e no grupo irmão da superfamília Loricarioidea, com dados citogenéticos descritos para Trichomycteridae. As quatro espécies analisadas neste estudo (*N. yapo*, *K. lacerta*, *I. duseni* – Neoplecostominae e; *P. maculicauda* – Hypoptopomatinae) apresentaram  $2n=54$  cromossomos. Entre os membros basais putativos de Loricariidae (*Delturus*, *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhina* e *Ursilodus*) (ARMBRUSTER, 2004), os gêneros com dados cariotípicos relatados (*Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhina* e também *Neoplecostomus*) conservam esse número diplóide (ALVES *et al.*, 2005; KAVALCO *et al.*, 2005; presente estudo). A excessão é a espécie *Ursilodus* sp., do rio Paraitinga-SP (KAVALCO *et al.*, 2005), na qual  $2n=96$  cromossomos corresponderia então a um carácter apomórfico. Em outro extremo, grupos como Loricariinae e Hypostominae apresentam uma ampla diversidade de marcadores cromossômicos (Tabela II), com características muito diferentes das consideradas primitivas em

Loricariidae (ARTONI e BERTOLLO, 1996; 2001; MARIOTTO *et al.*, 2009). Todas estas inferências de agrupamentos com dados citogenéticos estão de acordo com a proposta de filogenia morfológica da família (ARMBRUSTER, 2004; REIS *et al.*, 2006).

Para alguns grupos de Loricariidae o número diplóide tende a ser mais variável. Em Hypoptopomatinae, apesar do  $2n=54$  cromossomos ser o número mais frequente (como também visualizado neste estudo em *P. maculicauda*), números diplóides de  $2n=58$  em *Hisonotus gibbosos* (ANDREATA *et al.*, 2000) e  $2n=72$  em *Otocinclus aff. vestitus* (ANDREATA *et al.*, 1994) já foram descritos e são claramente características apomórficas dentre os Hypoptopomatinae. Entre os Hypostominae poucos são os representantes que mantêm o número de 54 cromossomos (Tabela II). A variação do número diplóide nesta subfamília é ampla. *Ancistrus cuiabae* (Ancistrini) possui  $2n=34$  cromossomos (MARIOTTO *et al.*, 2009) e todos representantes desta tribo apresentam  $2n$  menor ou igual a 54. Já *Hypostomus* sp. E (Hypostomini) apresenta  $2n=82$  cromossomos (ARTONI e BERTOLLO, 1996) e, por sua vez, todos apresentam  $2n$  maior ou igual a 54. Assim, considerando o número  $2n=54$  como basal, na tribo Hypostomini o aumento do número diplóide ocorreu por eventos de fissão cêntrica (ARTONI e BERTOLLO, 2001), enquanto que em Ancistrini pode ter ocorrido o caminho inverso, ou seja a redução do número  $2n$  por processos de fusão cêntrica (MARIOTTO *et al.*, 2009). Por sua vez, a subfamília Loricariinae apresenta variação no número diplóide de ( $2n=36$  a  $2n=74$  cromossomos, Tabela II), evidenciando que tanto eventos de fusão cêntrica para a redução numérica, quanto de fissão cêntrica para o aumento do número diplóide devem ter ocorrido na diversificação cariotípica do grupo.

A quantidade e a distribuição da heterocromatina nos cromossomos é outro marcador amplamente variável em Loricariidae. Apesar de difícil comparação devido a dificuldade no estabelecimento de homeologias cromossômicas entre os pares das diferentes espécies, este marcador também demonstra importância quando se utiliza a quantidade de heterocromatina nos cariótipos para inferências evolutiva. A ausência de grandes e numerosos blocos de heterocromatina parece ser um caráter cariotípico plesiomórfico entre os Loricariidae. O grupo irmão

Trichomycteridae apresenta pouca distribuição de heterocromatina para as espécies basais dessa família (BORIN e MARTINS-SANTOS, 1999; PRIMO *et al.*, 2009). No presente estudo, as espécies de Neoplecostominae, exceto *I. duseni* evidenciaram uma quantidade de heterocromatina C-positiva nos cromossomos menor quando comparada a espécie *P. maculicauda* (Hypoptopomatinae). No entanto, esta quantidade de heterocromatina é menor quando comparada a grupos mais derivados da família. Em gêneros considerados derivados de Loricariidae, como *Hypostomus* e *Ancistrus*, são várias as espécies apresentando abundância de bandas-C no cariótipo, inclusive caracterizadas por classes distintas de heterocromatinas (ARTONI e BERTOLLO, 1999; MARIOTTO *et al.*, 2009).

Em *Isbrueckerichthys duseni* a localização da heterocromatina demonstrou um polimorfismo de tamanho de um bloco localizado na região do braço longo do par 11, onde foram detectadas as situações homocigotas para o bloco menor, heterocigota e homocigota para o bloco maior (Fig. 2 e). Essa região heterocromática é o sítio de sintonia dos rDNAs 18S e 5S. Utilizando a FISH foi possível detectar que a variação de tamanho foi gerada por um heteromorfismo do cluster rDNA 5S (Fig. 5). Este heteromorfismo da heterocromatina/rDNA5S no par sm 11 pode ser resultado do mecanismo de crossing-over desigual ou estar associado ao acúmulo de sequências repetitivas *in cis* causado por erros no pareamento das unidades de repetição do DNA repetitivo (MANTOVANI *et al.*, 2000, VICARI *et al.*, 2008; 2010). Estes mecanismos tradicionalmente geram um aumento ou diminuição do bloco de heterocromatina (SMITH, 1976). Além disso, esta espécie possui blocos de heterocromatina equilocais e equidistantes no braço longo em alguns pares cromossômicos (Fig. 2 b, d). Mecanismos de dispersão (SCHWEIZER e LOIDL, 1987), multiplicação, amplificação, acúmulo e eliminação poderiam explicar a variação observada (JOHN, 1988). Ainda, de acordo com Schweizer e Loidl (1987) o padrão de bandas de heterocromatina em posições equidistantes em relação ao centrômero ocorrem devido à organização cromossômica na interfase nucléica que facilitaria transposições destes seguimentos. Em peixes loricariídeos, no gênero *Hypostomus*, algumas espécies apresentaram blocos heterocromáticos intersticiais

em cromossomos acrocêntricos em posição equilocal ao centrômero (ARTONI e BERTOLLO, 1999).

As RONS identificadas pela impregnação do íon prata também é um marcador utilizado em Loricariidae. Recentemente, a utilização de sondas de rDNA em procedimentos de FISH têm somado informações para o entendimento da diversificação cromossômica nestes peixes. No presente trabalho, as espécies estudadas *K. lacerta*, *I. duseni* e *P. maculicauda* apresentaram a condição sintênica dos rDNAs 18S e 5S, enquanto em *N. yapo* estes sítios de rDNAs foram cromossomo independentes. Artoni e Bertollo (2001) consideraram que a localização intersticial de um único sítio de RON no braço longo dos cromossomos é uma característica também possivelmente basal em Loricariidae. No grupo irmão Trichomycteridae os rDNAs 18S e 5S também tem localização sintênica em região intersticial de um cromossomo submetacêntrico (PRIMO, 2009). Ainda, em Trichomycteridae os sítios rDNA 5S são sintênicos ao rDNA 18S, sendo que um deles é localizado adjacente e proximal e o segundo adjacente e distal, sempre em relação a posição do rDNA 18S no braço curto do par cromossômico 2 (PRIMO, 2009). Diante destes dados, é possível inferir que a localização sintênica dos rDNAs é uma condição plesiomórfica para Loricariidae e encontrada em alguns gêneros considerados basais por Armbruster (2004). Deste modo, as espécies analisadas neste estudo *K. lacerta*, *I. duseni* e *P. maculicauda* conservam esta localização sintênica enquanto que *N. yapo* apresenta possivelmente uma situação apomórfica para este carácter.

Todas as espécies aqui estudadas detêm a localização da RON intersticial em um possível par homeólogo. No entanto, os cromossomos portadores apresentaram variações em morfologias cromossômicas geradas possivelmente por acúmulo de heterocromatina adjacente (VICARI *et al.*, 2008; KANTEK *et al.*, 2009) e/ou variações nos tamanhos dos sítios de rDNA resultado de crossing-over desigual. Este mesmo mecanismo de crossing-over desigual pode ser utilizado para explicar o polimorfismo da presença do rDNA 18S no braço longo em apenas um dos homólogos do par portador da RON em *P. maculicauda* (Fig.6c). Nas espécies *K.*

*lacerta* e *P. maculicauda* o rDNA 18S foi localizado em região proximal e o rDNA 5S distal (Fig. 4b e 6). Já em *I. duseni* o rDNA 18S é encontrado distal e o rDNA 5S proximal. Trichomycteridae apresenta dois sítios do rDNA 5S, tanto proximal quanto distal no cromossomo portador da RON (PRIMO, 2009). Assim, possivelmente um destes sítios 5S presentes em Trichomycteridae tenha sido perdido nos Loricariidae basais portadores da sintenia dos rDNA.

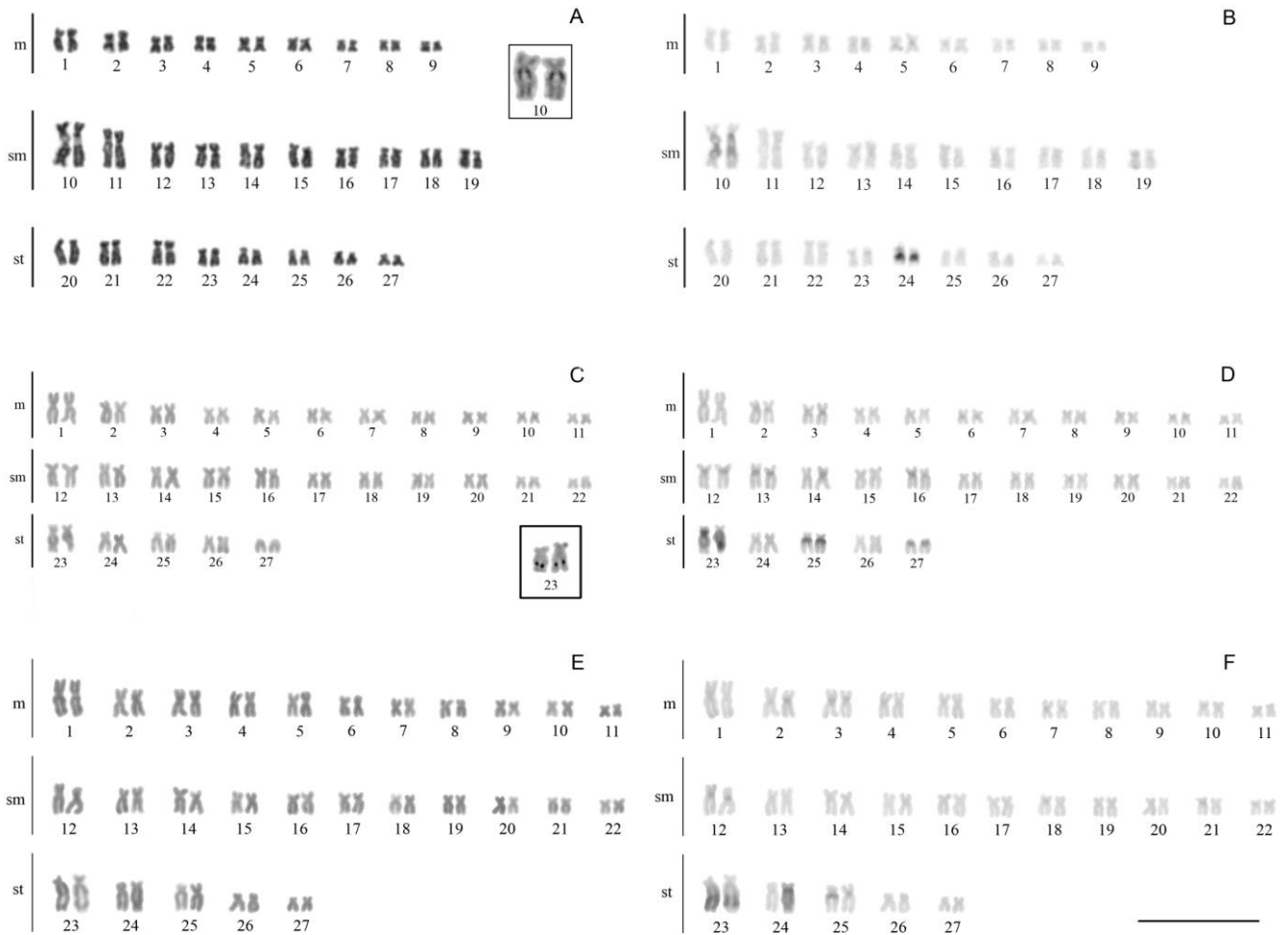
Armbruster (2004) alocou os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* na subfamília Neoplecostominae até que suas relações filogenéticas pudessem ser bem resolvidas. Recentemente o gênero *Hemipsilichthys* foi agrupado na subfamília Delturinae (CRAMER, 2009). De fato, os dados cariotípicos já obtidos também indicam uma alta proximidade dos gêneros Neoplecostominae e Delturinae (Lithogeneinae – sem dados cariotípicos), do que em relação a qualquer outro grupo citogeneticamente já estudado de Loricariidae (Tabela II). As três espécies de Neoplecostominae estudadas (*N. yapo*, *K. lacerta*, *I. duseni*) apresentam características cromossômicas comparáveis a outras espécies de *Neoplecostomus*, *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys* e *Kronichthys*. Por sua vez, *P. maculicauda* (Hypoptopomatinae) também apresenta características cromossômicas comparáveis aos Neoplecostominae. Deste modo, essa espécie reúne um conjunto de caracteres cromossômicos que podem ser considerados basais para a subfamília. Em outro extremo, as subfamílias Loricariinae e Hypostominae apresentam uma ampla diversificação cariotípica, com uma série de caracteres apomórficos (Tabela II) e são as mais especiosas dos Loricariidae, com mais de 75% das 785 espécies da família. Assim, é possível inferir que a diferenciação cariotípica do grupo acompanha a ampla diversificação de formas destas duas subfamílias e pode ter sido importante para o isolamento genético/reprodutivo das espécies.

Este estudo analisou três espécies de Neoplecostominae (*N. yapo*, *K. lacerta*, *I. duseni*) consideradas de grupos basais em Loricariidae e comparou com *P. maculicauda* (Hypoptopomatinae) e dados da literatura (Tabela II). Os resultados demonstraram que o  $2n=54$  cromossomos, pouca quantidade de heterocromatina e a sintenia dos rDNAs 18S e 5S podem ser consideradas características primitivas

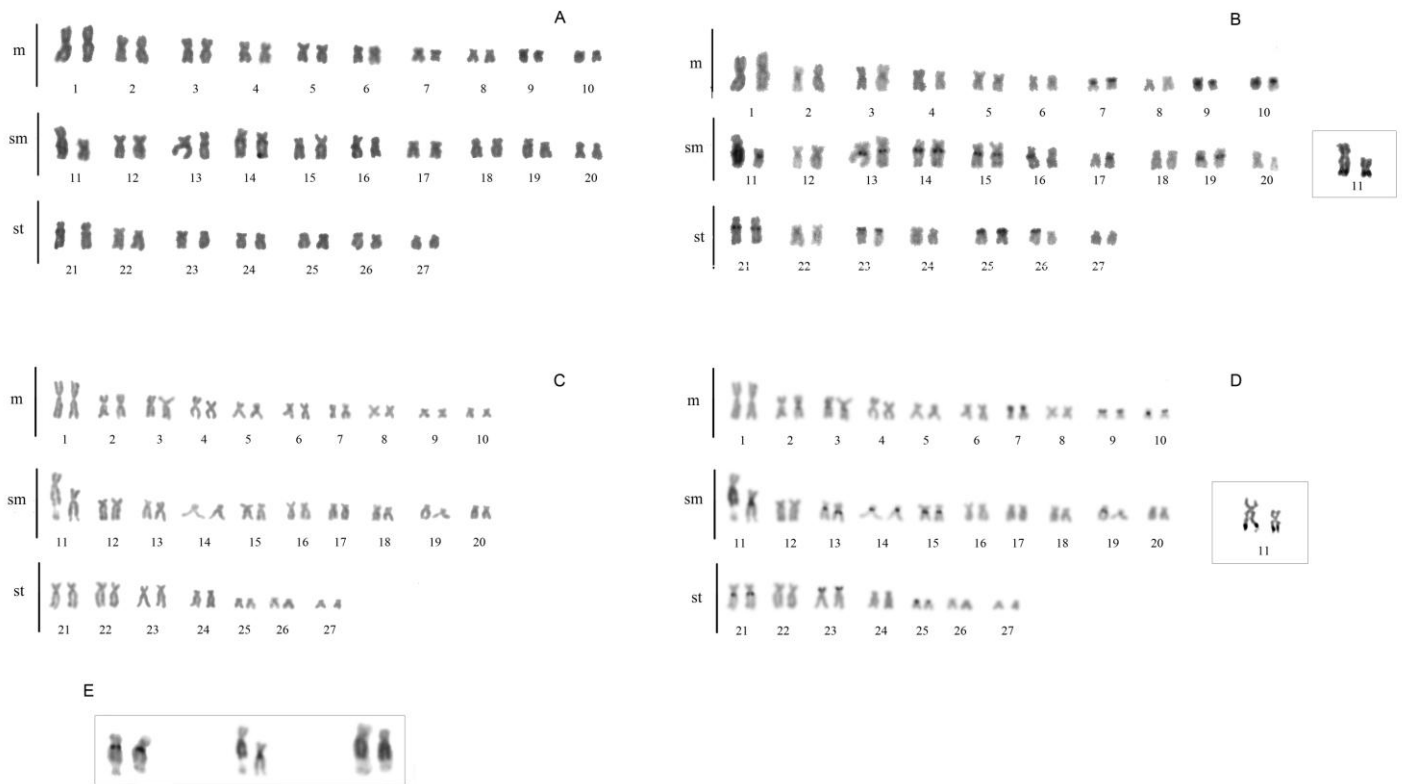
em Loricariidae por estarem presentes no grupo irmão Trichomycteridae e nas subfamílias consideradas basais Delturinae e Neoplecostominae (Lithogeneinae - outro grupo basal sem dados cariotípicos). Assim, esta análise cromossômica entre os Loricariidae propicia um melhor entendimento dos processos de evolução cromossômica e das relações filogenéticas nesse grupo de constantes reformulações cladísticas.

## **Referências**

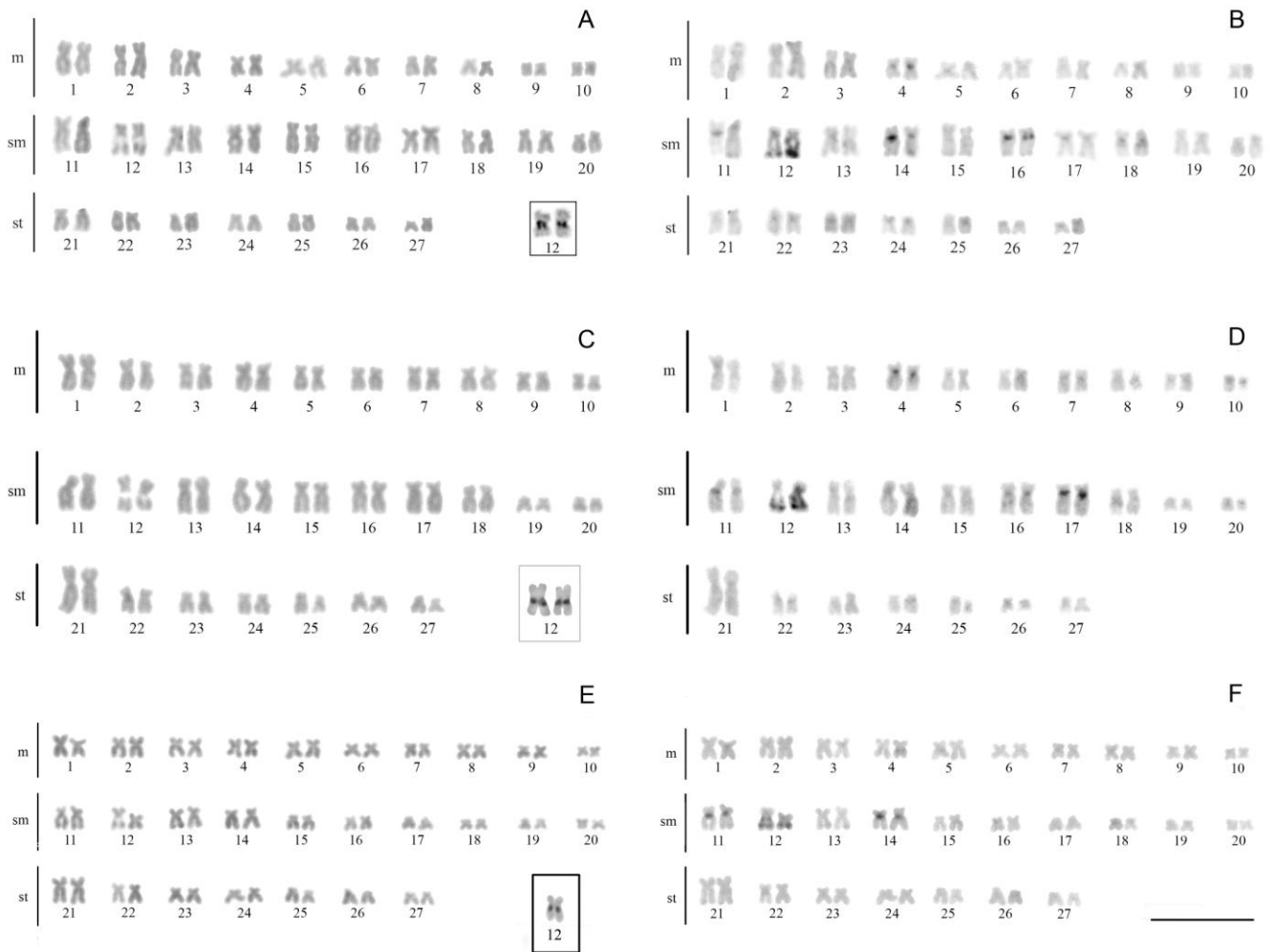
As referências bibliográficas deste capítulo estão reunidas no final deste trabalho.



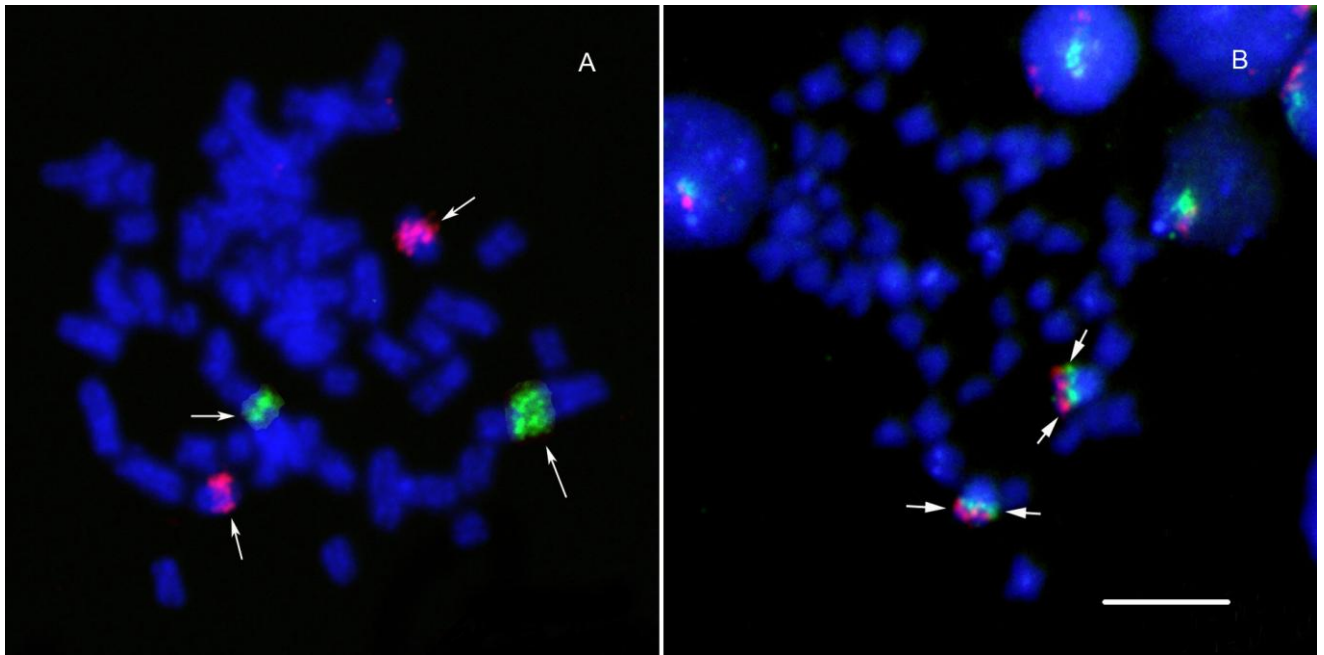
**Figura 1.** Cariótipos de *Neoplecostomus yapo* e *Kronichthys lacerta* com coloração convencional por Giemsa: (a) espécime macho de *N. yapo*; (c) *K. lacerta* macho; (e) *K. lacerta* fêmea; e análise sequencial da heterocromatina (b, d, f), respectivamente. Nos destaques, o par cromossômico portador do sítio Ag-RON positivo. Barra = 10  $\mu$ m.



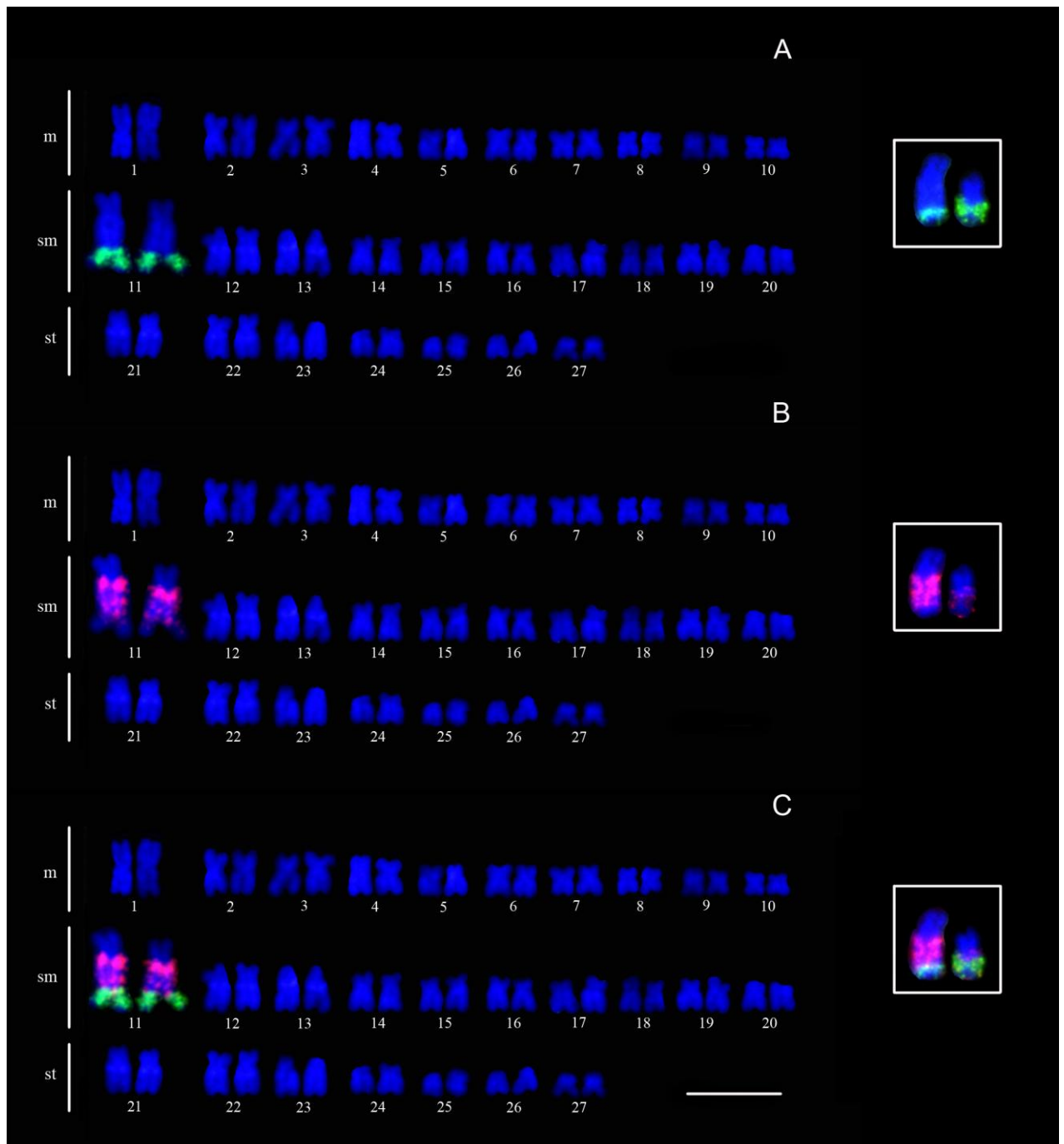
**Figura 2.** Cariótipos de *Isbrueckerichthys duseni* em coloração convencional por Giemsa: (a) população córrego da Areia; (c) população rio Açungui; (b, d) bandamento C sequencial, respectivamente. No destaque, o par cromossômico portador do sítio Ag-RON positivo. Em (e) heteromorfismo de tamanho para o par 11 mostrando a situação homocigota menor, heterocigota e homocigota maior. Barra = 10 µm.



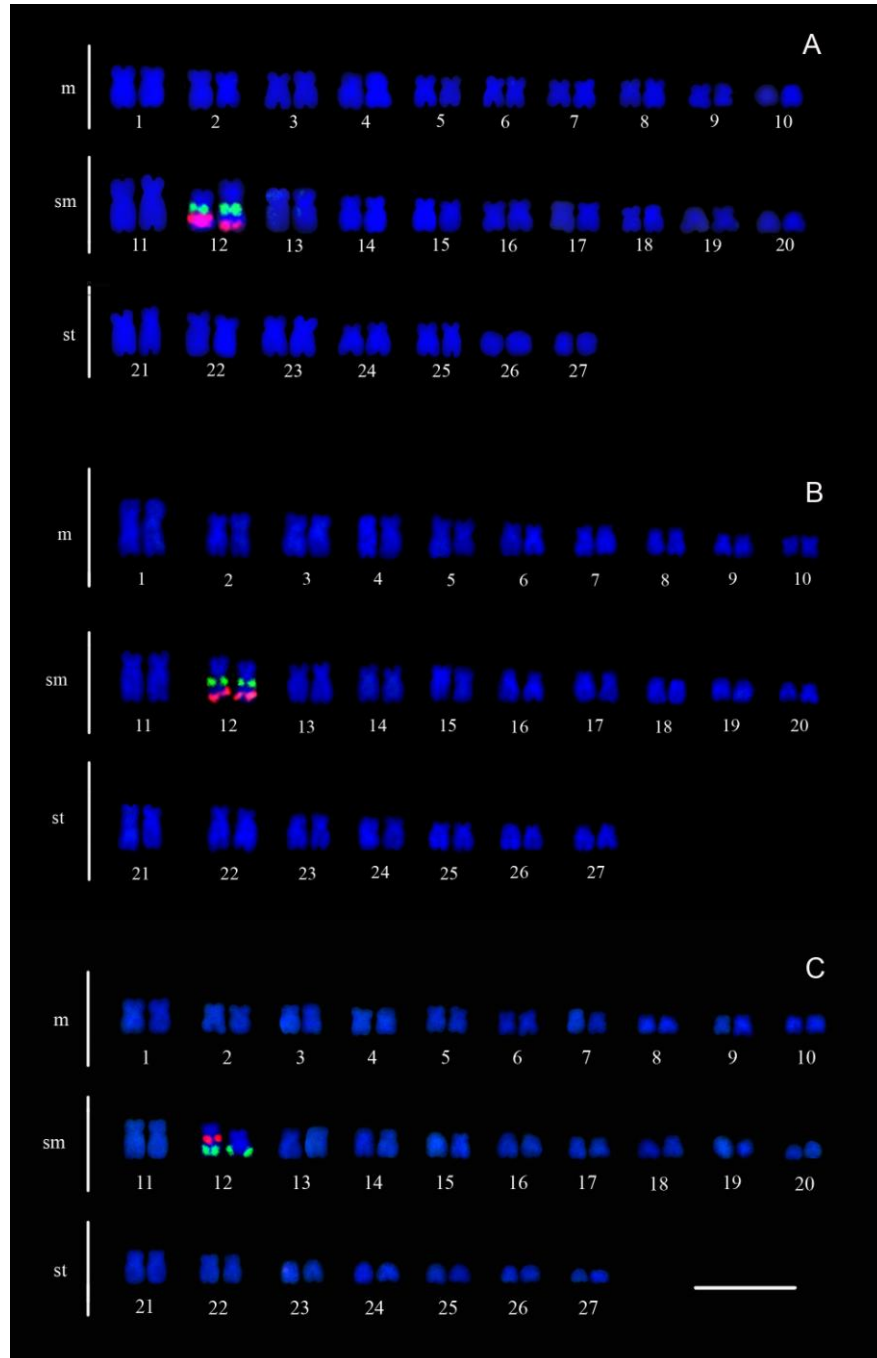
**Figura 3.** Cariótipos de *Paratocinclus maculicauda* em coloração convencional por Giemsa: (a) exemplar macho; (c) exemplar fêmea; (e) exemplar fêmea evidenciando o heteromorfismo de tamanho do par 12; (b, d, f) bandamento C sequencial, respectivamente. No destaques, o par cromossômico portador do sítio Ag-RON positivo. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 4.** Metáfases de *Neoplecostomus yapo* (a) e *Kronichthys lacerta* (b) submetidas a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho) e contracoradas com DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 5.** Cariótipos de *Isbrueckerichthys duseni* submetidos a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI. Em (a) localização dos sítios rDNA 18S; em (b) localização dos sítios rDNA 5S e; (c) sobreposição das duas sondas. Nos destaques, o par cromossômico heteromórfico demonstrando a variação de tamanho do sítio de rDNA 5S. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 6.** Cariótipos de *Paratocinclus maculicauda* submetidos a dupla FISH com sondas de rDNA 18S e rDNA 5S contracolorados com DAPI. Em (a) localização dos sítios rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) em exemplar macho; em (b) localização dos sítios rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) em exemplar fêmea com situação homozigota e; (c) localização dos sítios rDNA 18S (vermelho) e 5S (verde) em exemplar fêmea com heteromorfismo de tamanho para o par 12. Barra = 10  $\mu$ m.

**Tabela I.** Espécies estudadas, respectiva localidade, bacia hidrográfica, número de fêmeas e machos.

Espécies	Localidade	Bacia Hidrográfica	F	M	Total
<i>Neoplecostomus yapo</i>	Rio Verde (PR)	Rio Tibagi	7	10	17
<i>Kronichthys lacerta</i>	Rio Açungui (PR)	Rio Ribeira	18	17	35
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Riacho do Areia (PR)	Rio Ribeira	12	9	21
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Rio Açungui (PR)	Rio Ribeira	11	11	22
<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Riacho do Areia (PR)	Rio Ribeira	16	22	38
<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Rio Açungui (PR)	Rio Ribeira	10	7	17

**Tabela II:** Dados citogenéticos para Loricariidae.

<b>Subfamília/Espécies</b>	<b>Localidade</b>	<b>2n</b>	<b>Bs</b>	<b>C S</b>	<b>Fórmula cromossômica</b>						<b>Ref.</b>
					m	m/sm	sm	st	st/a	a	
<b>Delturinae</b>											
<i>Upsilodus sp.</i>	Rio Paraitinga (SP)	96			16		8			72	1
<i>Hemipsilichthys splendens</i>	Rio São João (SC)	54				50			4		3
<i>Hemipsilichthys steindachner</i>	Córrego Cavallo (SC)	54				40			14		3
<b>Neoplecostominae</b>											
<i>Neoplecostomus microps</i>	Córrego Grande (SP)	54				42			12		2
<i>Neoplecostomus microps</i>	Pindamonhangaba Córrego Grande (SP)	54				42			12		2
<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio Paraitinga (SP)	54			24		20	10			1
<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Córrego Hortelã (SP)	54				36			18		3
<i>Neoplecostomus yapo</i>	Rio Verde, bacia do Rio Tibagi (PR)	54			18		20	16			49

<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	Rio Betari (SP)	54				38			16		3
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Riacho do Areia, Ponta Grossa (PR)	54			20		20	14			49
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Rio Açungui, Campo Largo (PR)	54			20		20	14			49
<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio Betari (SP)	54				54			4		3
<i>Kronichthys lacerta</i>	Rio Açungui, Campo Largo (PR)	54			22		22	10			49
<i>Pareiorhina rudolphi</i>	Córrego Grande (SP)	54				48			6		3
<i>Pseudotocinclus maculicauda</i>	Rio Poço Grande (SP)	54			20		32	2			10
<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	Rio Grande (SP)	54		XX/XY	26		20	6			11
<i>Pseudotothis obtusa</i>	Rio Itanhaém (SP)	54			26		18	4		6	6
<b>Hypoptopomatinae</b>											
<i>Hisonotus gibbosus</i>	Rio Betari (SP)	58									4
<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Rio Marumbi, Morretes (PR)	55	1		11		12	2		2	5
<i>Microlepidogaster depressicauda</i>	Rio Santo Inácio (SP)	54			14		28	22		10	6
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	Rio Poço Grande (SP)	54	1 a 2	ZZ/ZW	48		8				7

<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	Rio Marumbi (PR)	54	1 a 2	ZZ/ZW	22		24	4		2	6
<i>Microlepidogaster</i> sp. 1	Rio Alambari (SP)	54			30		20	4			6
<i>Microlepidogaster</i> sp. 2	Córrego Moia (SP)	54			22		28	4			6
<i>Microlepidogaster</i> sp.	Córrego Jacutinga (SP)	54									8
<i>Microlepidogaster</i> sp.	Córrego Quinta (SP)	54									9
<i>Otocinclus</i> aff. <i>Vestitus</i>	Rio Livramento (PA)	72			22		12	4		34	6
<i>Otocinclus affinis</i>	Rio Biguá (SP)	54			46		8				6
<i>Otocinclus affinis</i>	Rio Bonito (RJ)	54			40		12	2			6
<i>Corumbataia cuestae</i>	Lago Lapa, tributário do Rio Passa Cinco (SP)	54			14		10		3		12
<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Córrego da Areia, Ponta Grossa (PR)	54			20		20	14			49
<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Rio Açungui, Campo Largo (PR)	54			20		20	14			49
<b>Loricariinae</b>											
<i>Harttia kronei</i>	Rio Betari (SP)	58				42			16		3
<i>Harttia loricariformis</i>	Córrego Grande (SP)	52				32			20		3
<i>Harttia loricariformis</i>	Rio Paraitinga (SP)	56			16		22	10		8	1

<i>Harttia carvalhoi</i>	Rio Paraíba do Sul (SP)	52♀		XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	18		18	8		8	14
		53♂		XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	17		18	8		10	14
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Solimões (AM)	62									2
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Paraná (PR)	64	1 a 5		10		6	4		44	15
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Guaíba (RS)	66			2		2			62	3
<i>Loricaria macrodon</i>		58			18		2		38		16
<i>Loricaria parva</i>		48									17
<i>Loricaria prolixa</i>	Rio Paraná (PR)	62			20		4			38	15
<i>Loricariichthys</i> sp	Rio Paraná (ARG)	54			6		26	4		18	18
<i>Loricariichthys platymetopom</i>	Rio Paraná (PR)	54		ZZ/ZW	6		20	4		24	19,2 0
<i>Rineloricaria cadeae</i>	Lago Guaíba (RS)	64				2			62		13
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Jacucaca e Água dos Oito Córregos – Tributários do Rio Tibagi (PR)	56				8			48		13
<i>Rineloricaria strigilata</i>	Rio Forquetinha (RS)	68				6			62		13
<i>Rineloricaria</i> sp.	Rio Betari (SP)	70				2			68		3

<i>Rineloricaria kronei</i>	Córrego Cavallo (RS)	64				6			58		3
<i>Rineloricaria kronei</i>	Rio Itapocu (SC)	64				6		58			3
<i>Rineloricaria cf. latirostris</i>	Foz do rio Piumhi no rio São Francisco (MG)	48				16			32		48
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Passa Cinco (SP)	44			12		4			28	21
		44			10		4			30	21
		44			13		2			29	21
		44			13		4			27	21
		44			13		1			30	21
		44			10		4			30	21
		44			10		3			31	21
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Passa Cinco (SP)	46			10		3			3	21
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	36				24			12		21
		37				23			14		21
		38				22			16		21

		39				21			18		21
		40				20			20		21
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Ribeirão Três Bocas (PR)	43				17			26		21
		44				16			28		21
		46				14			32		21
		47				13			34		21
		48				12			36		21
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Passa Cinco (SP)	44				16			28		21
		45				15			30		21
		46				14			32		21
		47				13			34		21
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Ribeirão Kelle (PR)	56				8			48		22
<i>Sturisoma cf. nigrirostrum</i>	Rio Araguaia (MT)	74			20		18		36		23
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	Rio Açungui, Campo Largo (PR)	66				3			63		49

<i>Rineloricaria cf. lima</i>	ribeirão da Areia, Ponta Grossa (PR) e rio Açungui, Campo Largo (PR)	68				4			64		49
		68				2			66		49
		69				2			67		49
		69				1			68		49
		70				2			68		49
<b>Hypostominae</b>											
Tribos:											
<b>Ancistrini</b>											
<i>Baryancistrus aff. Niveatus</i>	Rio Xingu Altamira (PA)	52			16		32	4			24
<i>Ancistrus n sp. 1</i>	Rio Vermelho (GO)	40♀		XX	34		6				25
		39♂		XO	33		6				25
<i>Ancistrus n sp. 2</i>	Rio Garuva (SC)	52			10		16	12		14	25
<i>Ancistrus cuiabae (citótipo A)</i>	Baía Arrombado Pantanal (MT)	34			20		8	6			28
<i>Ancistrus cuiabae (citótipo B)</i>	Baía Arrombado Pantanal (MT)	34			19		8	6		1	28

<i>Ancistrus cuiabae</i> (citótipo C)	Baía Arrombado Pantanal (MT)	34			18		8	6		2	28
<i>Ancistrus</i> sp. "Piagaçu"	Lago Aiapuá, Rio Purus (AM)	52♀		ZZ/ZW	16		9	2		25	29
		52♂		ZZ/ZW	16		8	2		26	29
<i>Ancistrus</i> sp.	Rio Purus/AM	34♂		XX/XY	21		11	2			30
		34♀		XX/XY	20		12	2			30
<i>Ancistrus</i> sp.	Rio Trombetas/PA	38			22		8	5		3	30
<i>Ancistrus</i> n. sp.	Rio São Francisco/AC	38				30		8			31
<i>Ancistrus ranunculus</i>	Rio Xingu Amazonia (PA)	48♀		ZZ/ZW	19		9	6		14	29
		48♂		ZZ/ZW	20		8	6		14	29
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Bacia Rio Paraguai (MT)	44		ZZ/ZW	18		10		16		36
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal/ MT	42			24		10	8			33
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	Pantanal/ MT	42		XX/XY	24		10	8			33
<i>Ancistrus</i> sp.	Rio Paraná (PR)	48			18		12	12		4	34
<i>Ancistrus</i> sp	Rio Betari (SP)	52				32			20		3
<i>Ancistrus</i> sp.	Rio Itapocu (SC)	52				28			24		3
<i>Ancistrus</i> sp	Córrego São Francisco (AC)	38				30			8		3
<i>Ancistrus</i> sp. 1	Lago Barretinho, afluente do Rio Uatumã (AM)	39♂			27		10	2			37
		38♀		XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	26		10	2			37

<i>Ancistrus sp. 2</i>	Rio Demeni, bacia do Rio Negro (AM)	52♂		Z <sub>1</sub> Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> Z <sub>2</sub>	12		12	4		24	37
		52♀		Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> W <sub>1</sub> W <sub>2</sub>	11		12	4		25	37
<i>Ancistrus sp. Vermelho</i>	Rio Demeni/AM	42			26		6	4		6	30
<i>Ancistrus sp. Macoari</i>	Rio Branco/RR	46♂		XX/XY	18		11	6		11	30
		46♀		XX/XY	18		12	6		10	30
<i>Ancistrus sp. Dimona</i>	Rio Dimona/AM	52			16		8	2		26	30
<i>Ancistrus multispinnis</i>	Rio Itapocu/SC	52				28			24		31
<i>Hemiancistrus spilomma</i>	Rio Araguaia/MT	52♀		ZZ/ZW	25		21	6			32
		52♂		ZZ/ZW	24		22	6			32
<i>Hemiancistrus spinosissimus</i>	Rio Araguaia/MT	52			26		22	4			32
<i>Hemiancistrus sp</i>	Rio Araguaia (MT)	52			20		20		12		23
<i>Megalancistrus aculeatus</i>	Rio Paraná (PR)	52			26		26				34

<i>Panaque cf. nigrolineatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52			26		20		6		23
<i>Peckoltia sp. 1</i>	Rio Jari, região Amazonica	53	1			44		6		2	35
<i>Peckoltia sp. 2</i>	Rio Jari, região Amazonica	52				32		18		2	35
<i>Peckoltia vittata</i>	Rio Xingu, região Amazonica	52			16		20	14		2	35
<b>Pterygoplichthini</b>											
<i>Glyptoperichthys Gibbiceps</i>	Rio Orinoco, Venezuela	52			20		24	8			25
<i>Liposarcus anisitsi</i>	Rio Tiete Botucatu, (SP)	52			28		12	8		4	25
<i>Liposarcus anisitsi</i>	Rio Miranda (MS)	52			8		14	14		16	25
<i>Liposarcus multiradiatus</i>	Rio Orinoco, Venezuela	52			22		18	12			25
<i>Liposarcus anisitsi</i>	Rio Preto (SP)	52			16		24	8		4	25
<i>Pterygoplichthys multiradiatus</i>	Rio Solimões (AM)	52			20		36	4			23
<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	Rio Preto (SP)	76									9
<i>Pterygoplichthys sp.</i>	Rio Tietê (SP)	52			16		24	8		4	38
<i>Pterygoplichthys joselimaianus</i>	Lago Quatro Bocas (MT)	52			28		16		8		39

<b>Hypostomini</b>											
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	76			8		20		48		40
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	Rio Tibagi (PR)	76			6		20		50		40
<i>Hypostomus affinis</i>	Córrego Jacuí (SP)	66			14		14	12		26	1
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Córrego Monjolinho (SP)	68			16		18		32		41
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	74			10		20		44		41
<i>Hypostomus</i> aff. <i>Auroguttatus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	76			8		30		38		41
<i>Hypostomus emarginatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52			16		30	6			23
<i>Hypostomus macrops</i>		68		XX/XY	10		14		44		16
<i>Hypostomus paulinus</i>		74			10		20		44		16
<i>Hypostomus plecostomus</i>		54				36			18		42
<i>Hypostomus plecostomus</i>		54				24		12		18	26
<i>Hypostomus</i> sp.3 NUP 4247	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	82	1a2		6		14		62		43
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72			10		20		42		41

<i>Hypostomus regani</i>	Rio Araquá (SP)	72			12		18	26		16	25
<i>Hypostomus regain</i>	Foz do rio Piumhi no rio São Francisco (MG)	72			4		9	9		14	48
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	78			8		6		60		27
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Rio Salobra e Córrego Salobrinha (MS)	64♂		XX/XY provável	16		20		28		43
		64♀		XX/XY provável	16		19		27		43
<i>Hypostomus</i> sp. 2-NUP 4249	Rio Perdido (MS)	84			6		16		62		43
<i>Hypostomus</i> sp. A	Córrego Rincão (SP)	70			18		14		38		41
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72			12		18		42		41
<i>Hypostomus</i> sp. B	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72			13		18		411		44
<i>Hypostomus</i> sp. D1	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72			10		26		36		41
<i>Hypostomus</i> sp. D2	Rio Mogi-Guaçu (SP)	72			14		20		38		41
<i>Hypostomus</i> sp. E	Rio Mogi-Guaçu (SP)	80			8		16		56		41
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	76			10		16		50		34
<i>Hypostomus</i> sp. F	Rio São Francisco (MG)	75			10		17		48		44
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64		ZZ/ZW	14		24		26		45
<i>Hypostomus</i> sp. G	Rio Araguaia (MT)	64		ZZ/ZW	15		25		25		45

<i>Hypostomus</i> sp. 1	Córrego Quinta (SP)	64									42
<i>Hypostomus</i> sp. 2	Córrego Alambari (SP)	72									9
<i>Hypostomus</i> sp. 3	Rio Paranapanema (SP)	68									9
<i>Hypostomus</i> sp. 4	Córrego Hortelã (SP)	66									9
<i>Hypostomus</i> sp. 1 <sup>a</sup>	Ribeirão dos Patos (MG)	76			6		8	16		46	48
<i>Hypostomus</i> sp. 1b	Ribeirão das Araras (MG)	76			4		10	16		46	48
<i>Hypostomus</i> sp. 2	Ribeirão das Araras (MG)	74			10		6	16		42	48
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Araquá (SP)	68			18		10	12		28	25
<i>Hypostomus Goyazensis</i>	Rio Vermelho (GO)	72			10		16	10		36	25
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu 1	Rio Xingu, região da Amazonia	64				32			32		46
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu 2	Rio Xingu, região da Amazonia	66				32			34		46
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu 3	Rio Xingu, região da Amazonia	65	1			38			26		46
<i>Panaque</i> cf. <i>nigrolineatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52			26		20		6		23
<b>Rhinelepini</b>											
<i>Rhnieleipsis aspera</i>	Rio Paraná (PR)	52									9
<i>Rhnieleipsis aspera</i>	Rio Paraná (PR)	54			20		26	8			47
<i>Pogonopoma wertheimeri</i>	Rio Macuri (BA)	54			20		26	8			23

Bs = Cromossomos Extras; CS = cromossomos sexuais; Ref = referência; m = metacêntrico; m/sm= quando não houve distinção entre meta e submetacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtlocêntrico; st/a=quando não houve distinção entre subtlocêntrico e acrocêntrico; a= acrocêntrico. O agrupamento está de acordo com as últimas revisões morfológicas da família.

**Referências:** 1 - Kavalco *et al.*, (2005); 2 – Della-Rosa *et al.*, (1980) *in* Artoni e Bertollo (2001); 3 – Alves (2000); 4 – Andreatta *et al.*, (2000) *in* Kavalco *et al.*, (2005); 5 - Andreatta *et al.*, (2010); 6 – Andreatta *et al.*, (1994); 7 – Andreatta *et al.*, (1993); 8 – Carvalho *et al.*, (1998); 9 – Fenerich (1998) *in* Kavalco *et al.*, (2005); 10 – Andreatta (1991) *in* Kavalco *et al.*, (2005); 11 – Andreatta *et al.*, (1992); 12 – Camilo e Moreira Filho (2005); 13 – Maia *et al.*, (2010); 14 – Centofante *et al.*, (2006); 15 – Scavone e Júlio Jr (1994); 16 – Michelle *et al.*, (1977); 17 – Gyldenholm e Scheel (1971) *in* Kavalco *et al.*, (2005); 18 – Fenocchio (1993); 19 – Scavone (1993); 20 – Scavone e Júlio Jr (1995); 21 – Giuliano-Caetano (1998); 22 – Giuliano-Caetano *et al.*, (1999); 23 – Artoni e Bertollo (2001); 24 – Souza Paes de *et al.*, (2004); 25 – Alves *et al.*, (2006); 26 – Muramoto *et al.*, (1968) *in* Alves *et al.*, (2006); 27 – Michelle *et al.*, (1977) *in* Alves *et al.*, (2006); 28 – Mariotto *et al.*, (2009); 29 – Oliveira *et al.*, (2007); 30 - de Oliveira (2009); 31 - Alves *et al.*, (2003) *in* de Oliveira (2009); 32 - de Oliveira *et al.*, (2006) *in* de Oliveira (2009); 33 - Mariotto e Myiazawa (2006) *in* de Oliveira (2009); 34 – Artoni (1996); 35 – Souza Paes de *et al.*, (2009); 36 - Mariotto *et al.*,(2004); 37- Oliveira *et al.*, (2008); 38 – Artoni *et al.*, (1999); 39 – Oliveira *et al.*, (2006); 40 – Rubert *et al.*, (2008); 41 – Artoni e Bertollo (1996); 42 –Muramoto *et al.*, (1968) *in* Artoni & Bertollo (2001); 43 – Cereali (2006); 44 – Artoni e Bertollo (1999); 45 – Artoni *et al.*, (1998); 46 –Milhomem *et al.*, (2010); 47 - Artoni e Bertollo (2001) *in* Kavalco (2005); 48 - Mendes Neto (2008); 49 – presente estudo.

## 5. CONCLUSÕES

- a) Quatro das cinco espécies estudadas apresentaram  $2n=54$  cromossomos que é considerado um caráter plesiomórfico em Loricariidae, *Neoplecostomus yapo*, *Kronichthys lacerta*, *Isbrueckerichthys duseni* e *Paratocinclus maculicauda*.
- b) *Rineloricaria* cf. *lima* apresentou um polimorfismo de  $2n=66$  a  $2n=70$  cromossomos, aqui descritos em sete citótipos. É possível hipotetizar que eventos de fissão cêntrica tem proporcionado o aumento do número diplóide em *R. cf. lima* até  $2n=70$  st/a a partir do  $2n=54$  e gerado sítios cromossomos instáveis. Esses finais instáveis dos cromossomos foram cicatrizados por fusões cêntricas e diferentes combinações gaméticas, auxiliadas por heterocromatinização facultativa manteriam essa condição em polimorfismo estável.
- c) A heterocromatina C-positiva foi pouco destacada nos cromossomos das cinco espécies estudadas. A ausência de grandes e numerosos blocos de heterocromatina parece ser um caráter cariotípico plesiomórfico entre os Loricariidae.
- d) As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram localizadas por impregnação do íon prata e FISH com sonda de rDNA 18S. A localização sintênica ao rDNA 5S de um único sítio de RON em região intersticial do braço longo de um par cromossômico é uma característica possivelmente basal em Loricariidae. Assim, a localização da RON em posição terminal em *R. cf. lima* pode ser considerado um estado apomórfico.
- e) Polimorfismo de heterocromatina e de distribuição do tamanho do sítio de RON foram observados, com destaque para a variação da heterocromatina/rDNA 5S em *I. duseni* e da RON em *P. maculicauda*.
- f) Este trabalho contribui significativamente com marcadores cromossômicos de espécies consideradas basais em Loricariidae. É possível inferir que as

espécies de Neoplecostominae e Hypoptomatinae analisadas compartilham uma série de características cromossômicas plesiomórficas para Loricariidae.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A; GOMES, L. C; PELICICE, F.M. **Ecologia e Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem. p. 501, 2007.

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

ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**. v.5, p.57-63, 2003.

ALVES, A.L; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**. v.124, p.127-136, 2005.

ALVES, L. A; OLIVEIRA, C; NIRCHIO, M; GRANADO, A; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. v. 128, p. 1-9. 2006.

ANDREATA, A. A; FERREIRA, D. C; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Molecular cytogenetic study of heterochromatin in *Hisonotu leucofrenatus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae). **Hereditas**. p. 10-17. 2010.

ANDREATA, A.A; ALMEIDA-TOLEDO, L.F; OLIVEIRA, C; TOLEDO-FILHO, A.S. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY Sex chromosome heteromorphism in *Pseudocinclus tietensis*. **Cytologia**. v.57, p.369-372, 1992.

ANDREATA, A.A; ALMEIDA-TOLEDO, L.F; OLIVEIRA, C; TOLEDO-FILHO, A.S. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosome and constitutive heterochromatin differentiation in *Microleptogaster leucofrenatus*. **Cytogenet. Cell Genet.** v.63, p. 215-220, 1993.

ANDREATA, A.A; ALMEIDA-TOLEDO, L.F; OLIVEIRA, C; TOLEDO-FILHO, A.S. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): III. Analysis of seven species. **Caryologia**. v.47, p.27-37, 1994.

ANDREATA, A.A; ALVES, A.L; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. *Hisonotus gibbosus* (Teleostei, Loricariidae) segundo Hypoptopomatíneo com número diploíde diferente de 54 cromossomos. **Genet Mol Biol**. v.23, p.57, 2000.

ARAÚJO, A. C. S; MORELLI, S. Comparações cariotípicas de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae), provenientes da bacia do rio Paranaíba. In: **SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES IX**. Maringá. *Prógramas e resumos*. Maringá: Núcleo de pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aqüicultura – NUPÉLIA, p.10, 2002.

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**. v.141, p.1-80, 2004.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**. v.106, p.209-214. 1999.

ARTONI, R. F; VICARI, M. R; ALMEIDA, M. A; MOREIRA FILHO, O ; L. A. C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from south Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v.19, p.393-401, 2009.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**. v.49, p.81–90, 1996.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). **Hereditas**. v.134, p.201–210, 2001.

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

BERIDZE, R. Satellite DNA. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1986.

BERTOLLO, L.A.C; TAKAHASHI, C.S; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. v. 1(2), p.103-120, 1978.

BLANCO, D.R; LUI, R.L; VICARI, M.R; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal dna and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenet Genome Res**. v.132, p.171-178, 2011.

BÖHLKE, J; WEITZMAN, S.H; MENEZES, N.A. Estado atual da Sistemática de peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amaz**. v.8, p.657-677, 1978.

BORIN, L.A; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype characterization of three species of genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguaçu river basin. **Genetica**. v.106, p.215-22, 1999.

BORN, G.G; BERTOLLO, L.A.C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res.** v.8, p.111-118, 2000.

BOUFFLER, S; SILVER, A; PAPWORTH, D; COATES, J; COX, R. Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome 2 fragile sites. **Genes Chromosomes Cancer.** v.6, p.98-106, 1993.

BRITTO, M. R. **Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysii).** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 2003.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: (Caramaschi, E. P.; Mazzoni, R; Peres-neto, P. R; eds.) **Ecologia de peixes de riachos.** Série Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro, PPGE-UFRJ. p.91-138, 1999.

BURGES, W.E. An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. In A preliminary survey of Siluriformes. T.F.H. Publications. **Neptune.** NJ, 1989.

CAMILO, M. F; MOREIRA FILHO, O. Karyotypic Description of *Corumbataia cuestae* (Pisces, Loricariidae, Hypoptomatinae). **Cytologia.** v.70 (1) p.47-51, 2005.

CARVALHO, M.L; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Nuclear content of thirty species of Neotropical fishes. **Genet Mol Biol.** v. 21, p.47-54, 1998.

CARVALHO, T. P; LEHMANN, R. E. Reis. *Gymnotocinclus anosteos*, a new uniquely-plated genus and species of loricariid catfish (Teleostei: Siluriformes) from the upper rio Tocantins basin, central Brazil. **Neotropical Ichthyology.** v.6(3), p. 329-338, 2008.

CASTRO, R. M. C; CASATTI, L; SANTOS, H. F; FERREIRA, K. M; RIBEIRO, A. C; BENINE, R. C; DARDIS, G. Z. P; MELO, A. L. A; STOPIGLIA, R; ABREU, T. X; BOCKMANN, F. A; CARVALHO, M; GIBRAN, F. Z; LIMA, F. T. C. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica.** v.3(1), p.1-31, 2003.

CASTRO, R. M. C; CASATTI, L; SANTOS, H. F; MELO, A. L. A; MARTINS, L. S. F; FERREIRA, K. M; GIBRAN, F. Z; BENINE, R. C; CARVALHO, M; RIBEIRO, A. C; ABREU, T. X; BOCKMANN, F. A; PELIÇÃO, G. Z; STOPIGLIA, R; LANGEANI, F.

Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**. v.4(1), p.1-39, 2004.

CASTRO, R. M. C; CASATTI, L; SANTOS, H. F; VARI, R. P; MELO, A. L. A; MARTINS, L. S. F; ABREU, T. X; BENINE, R. C; GIBRAN, F. Z; RIBEIRO, A. C; BOCKMANN, F. A; CARVALHO, M; PELIÇÃO, G. Z; FERREIRA, K. M; STOPIGLIA, R; AKAMA, A. The stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. v.16(3), p.193-214, 2005.

CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais. In: **Ecologia de peixes de riachos: Estado Atual e Perspectivas** (E.P. Caramashi, R. Mazzone, C.R.S.F. Bizerril, P.R. Peres-Neto, eds.). Oecologia Brasiliensis, v.6, Rio de Janeiro, p. 139-155, 1999.

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, 6: vertebrados** (R.M.C. Castro, ed.). WinnerGraph, São Paulo, p. 1-13, 1998.

CENTOFANTE, L; BERTOLLO, L.C.A; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic characterization and description of na XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish *Hartia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet and Genome Res.** v.112, p. 320-324, 2006.

CEREALI, S. S. **Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriforme) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul**. Dissertação de Mestrado. p. 20-22, 2006.

CHARLESWORTH, B; SNLEGOWSKI, P; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. v.371, p.215–220, 1994.

CHIACHIO, M.C; MONTOYA-BURGOS, J.L; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. **Relações filogenéticas em Hypoptopomatinae e Neoplecostominae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) baseadas em seqüências de DNA nuclear**. Resumos do 54 Congresso Brasileiro de Genética. 2008.

COX, C. B; MOORE, P. D. Biogeography, an ecological and evolutionary approach. **Blackwell Science**. London. 2000.

CRAMER, A. C. **Filogenia de duas subfamílias de cascudos (Siluriformes, Loricariidae), usando dados nucleares, mitocondriais e morfológicos**. Tese de Doutorado. p. 1-121, 2009.

DAY, J.P; LIMOLI, C.L; MORGAN, W.F. Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. **Carcinogenesis**. v.19, p.259-265, 1998.

DE OLIVEIRA, R. R; FELDBERG, E; DOS ANJOS, M. B; ZUANON, J. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Journal of Fish Biology**. v.75, p. 2209–2225, 2009.

de PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. Pp. 279-330. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, p.603, 1998.

DERIJST, E. Note on the type species of the mailed catfish genus *Hemipsilichthys* Miranda Ribeiro, 1918 (Pisces: Siluriformes; Loricariidae), with the introduction of *Isbrueckerichthys* nom. nov. **Aquarium Wereld**. v.49, p.62–64, 1996.

DESMAZE, C; ALBERTI, C; MARTINS, L; POTTIER, G; SPRUNG, C.N; MURNANE, J.P; SABATIER, L. The influence of interstitial telomeric sequences on chromosome instability in human cells. **Cytogenet Cell Genet**. v.86, p.288-295, 1999.

DUNHAM, M.A; NEUMANN, A.A; FASCHING, C.L; REDDEL, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. **Nat Genet**. v.26, p.447–450, 2000.

ESCHMEYER, W; FRICKE, R. **Catalog of fishes electronic version**. Acesso em: 17-11-2010. California Academy of Sciences.

FENOCCHIO, A.S. **Cromossomos supranumerários no gênero Rhamdia (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei**. Tese Phd. Universidade de São Paulo. p.122, 1993.

FENOCCHIO, A.S; VENERE, P.C; CESAR, A.C.G; DIAS, A.L; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**. v.44, p.161-166, 1991.

FERRARIS Jr., C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**. v.1418, p.1-628, 2007.

FERRARIS, C.J. Subfamily Loricariinae (Armored catfishes). In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America** (R.E. Reis, S.O. Kullander & C. J. Ferraris Jr., orgs). EDIPUCRS, Porto Alegre, p.330-350, 2003.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. O Rio Ribeira de Iguape. Disponível em: <http://www.sosribeira.org.br/institucional/regiao/rio.htm>. acesso em agosto de 2009.

GALETTI Jr P.M. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. **Ital J Zool**. v.65, p.53-56, 1998.

GARDNER, R.J.M; SUTHERLAND, G.R. Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. New York: Oxford University Press. 2004.

GAUGER, M. F. W; BUCKUP. P. A. Two new species of Hypoptopomatinae from the rio Paraíba do Sul basin, with comments on the monophyly of *Parotocinclus* and the Otothyriini (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. v.3(4), p.509-518, 2005.

GHAZZI, M.S. Nove espécies novas do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Uruguai, do Sul do Brasil. **Iheringia, Série Zoológica**. Porto Alegre, p. 1, 2008.

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertosiano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.78, 1998.

GOSLINE, W. A. Contributions to the classification of the loricariid catfishes. **Arquivos do Museu Nacional**. v.41, p.79- 134, 1947.

HATANAKA, T; GALETTI Jr. P.M. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. v.122, p.239-244, 2004.

HOLMQUIST, G.P; ASHLEY, T. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. **Cytogenet Genome Res**. v.114, p.96–125, 2006.

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

IJDO, J.W; WELLS, R.A; BALDINI, A; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. **Nucleic Acids Res**. v.19, p.17, 1991.

ISBRÜCKER, I.J.H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Verslagen en Technische Gegevens**. Universiteit van Amsterdam. v.22, p.1–181, 1980.

ISBRÜCKER, I.J.H; SEIDEL, I; MICHELS, J.P; SCHRAML, E; WERNER, A. Diagnose vierzehn neuer gattungen der familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysii). **DATZ – Sonderheft Harnischwelse**. v.2, p.17-24, 2001.

JEREP, F.C; SHIBATTA, O.A; PEREIRA, E.H.L; OYAKAWA, O.T. Two new species of *Isbrueckerichthys* Derijst, 1996 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. **Zootaxa**. v.1372, p.53-68, 2006.

JUNK, W.J. Wetlands of tropical South-America. In: (Whigham, D.F; ed.) **Wetlands of the world**. **Kluwer. Hague**. p.679-739, 1993.

KANTEK, D. L. Z; VICARI, M. R; PERES, W. A. M; CESTARI, M. M; ARTONI, R. F; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**. v.75, p.408-421, 2009.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas**. v.141, p.237-242, 2004.

KAVALCO, K.F; PAZZA, R; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**. v.94, p.180-186, 2005.

KILBURN, A.E; SHEA, M.J; SARGENT, R.G; WILSON, J.H. Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. **Mol Cell Biol**. v.21, p.126-135, 2001.

KING, M. Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge University Press, Nova Iorque, 1993.

LARA-KAMEI, M. C. **Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). p.52, 1998.

LEHMANN, P. **Anatomia e relações filogenéticas da família Loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes) com ênfase na subfamília Hypoptopomatinae**. Unpublished Ph.D. Dissertação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 420, 2006.

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

LÉVÊQUE, C; OBERDORFF, T; PAUGY, D; STIASSNY, M.L.J; TEDESCO, P.A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**. v.595(1), p.545-567, 2008.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Edusp, São Paulo. 1999.

LOWE-MECCONNELL, R. H. **Ecological studies in tropical fish communities.** New York: Cambridge University, p. 382, 1987.

MAIA, T. P. DE A.; GIULIANO-CAETANO, L.; RODRIGUEZ, S. M.; RUBERT, M.; TAKAGUI, H. F.; DIAS, L. A. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyol Res.** v.57, p. 209–213, 2010.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica.** n.109, p.161–168, 2000.

MARIOTTO S., ARTONI, R.F. & MIYAZAWA, C.S. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Caryologia.** v.57(4), p.327-331, 2004.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, S. C.; BERTOLLO, C. A. L.; MOREIRA FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology.** v.7(4), p. 595-600, 2009.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F. Polimorfismos cromossômicos e cromossomos sexuais no gênero *Ancistrus* (Loricariidae, Ancistrini): quatro novas ocorrências em populações da bacia do Paraguai e Araguaia-Tocantins. In: XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, 2009, Ponta Grossa. **XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes.** 2009.

MARQUES, D. K. S. **Caracterização Genética do Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da Bacia Tocantins-Araguaia, estado do Mato Grosso.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos – UFScar, 2003.

MARTINS C; GALETTI Jr. PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.** v.7, p.363-367, 1999.

MARTINS, C; FERREIRA, I. A; OLIVEIRA, C; FORESTI, F; GALETTI Jr, P. M. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica.** v.127, p.133-141, 2006.

MENDES NETO, E. O. M. **Estudos Citogenéticos em algumas espécies de Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) da região de transposição do rio Piumhi para o rio São Francisco**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. p. 59-63, 2008.

MENEZES, N.A. Methods for assessing freshwater fish diversity. In: **Biodiversity in Brazil** (C.E.M. Bicudo; N.A. Menezes, eds.). CNPq, São Paulo, p. 289-295, 1996.

MEYNE, J; BAKER, R. J; HOBART, H. H; HSU, T. C; RYDER, O. A; WARD, O. G; WILEY J. E; WURSTER-HILL, D. H; YATES, T. L; MOYZIS, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**. v.99, p.3–10, 1990.

MICHELLE, J.L; TAKAHASHI, C.S; FERRARI, I. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**. v.42, p.539–546, 1977.

MILHOMEM, R. S. S; CASTRO, R. R; NAGAMACHI, Y. C; SOUZA PAES DE, C. A; FELDBERG, E; PIECZARKA, C. J. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comparative Cytogenetics**. v.4 (1), 2010.

MOLINA, W.F; SCHMID. M; GALETTI Jr P.M. Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**. v.94, p.141-149, 1998.

MURAMOTO, J; OHNO, S; ATKIN, N.B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**. v.24, p.59–66, 1968.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. John Wiley e Sons, Inc., New York, USA. p.162-170, 2006.

OLIVEIRA, R. R; FELDBERG, E; ANJOS, B. M; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**. v.5(3), p.301-306, 2007.

OLIVEIRA, R. R; FELDBERG, E; ANJOS, B. M; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/X<sub>1</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> and Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**. v.134, p. 243–249, 2008.

OLIVEIRA, R. R; SOUZA, L. I; VENERE, C. P. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda 2003. **Neotropical Ichthyology**. v.4(1), p. 93-97, 2006.

OLIVEIRA, R.R. **Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2006.

PEITL, P; MELLO, S. S; CAMPAROTO, M. L; PASSOS, G.A.S; HANDE, M.P; CARDOSO, R. S; SAKAMOTO-HOJO, E. T. Chromosomal rearrangements involving telomeric DNA sequences in Balb/3t3 cells transfected with the Ha-ras oncogene. **Mutagenesis.** v.17, p.67-72, 2002.

PEREIRA, E.H.L; OYAKAWA, O.T. *Isbrueckerichthys epakmos* a new species of Loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology.** v.1(1), p.3-9, 2003.

PEREIRA, E.H; REIS, R.E. Revision of the loricariid genera *Hemipsilichthys* and *Isbrueckerichthys* (Teleostei: Siluriformes), with descriptions of five new species of *Hemipsilichthys*. **Ichthyological Exploration of Freshwaters.** v.13, p.97–146, 2002.

PERRY, J. O; SLATER, H. R; CHOO, K. H. A. Centric fission - simple and complex mechanisms. **Chromosome Research.** v.12, p.627–640, 2004.

PINESE, J.P.P. Síntese geológica da bacia do rio Tibagi. In: (Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A; eds.). **A bacia do rio Tibagi.** Londrina: M.E. 2002.

PINKEL, D; STRAUME, T; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* v.83, p.2934-2938, 1986.

PRIMO, C.C. **Diversidade cromossômica em populações de *Trichomycterus* (Siluriformes; Trichomycteridae).** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Orientador: Marcelo Ricardo Vicari. 2009.

PRIMO, C.C; CENTOFANTE, L; ARTONI, R.F; ALMEIDA, M.C; VICARI, M.R. **Diversidade cromossômica em populações de *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes).** In: XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Ponta Grossa. XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Ponta Grossa. UEPG. v.1, p.22-22, 2009.

REED, K.M; PHILLIPS, R.B. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. **Chromosome Res.** v.5, p.221-227, 1997.

REIS, R. E. DOS; CARDOSO, A. R. Two new species of *Rineloricaria* from southern Santa Catarina and northeastern Rio Grande do Sul, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. v.12(4), p.319-332, 2001.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr, C. J. **Check list of the freshwater fishes of south and central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. p.742, 2003.

REIS, R.E; PEREIRA, E.H.L; ARMBRUSTER, J.A.W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zool. J. Linn. Soc**, v.147, p. 277–299, 2006.

RICHARDS, E. J; GOODMAN, H. M, AUSUBEL, F.M. The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. **Nucleic Acids Res**. v.19, p.3351–3357, 1991.

ROCHA, A. M. **Contribuição ao estudo citogenético em peixes**. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 43, Goiânia. *Programas e Resumos*. Sociedade Brasileira de Genética. p.105, 1997.

RODRIGUES, R.M; ALMEIDA – TOLEDO, L.F. **Estudo comparativo citogenético-molecular em espécies do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraíba do Sul (RJ) e Nhundiaquara (PR)**. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. 2008.

RODRIGUEZ, M. S; REIS, R. E. Taxonomic review of *Rineloricaria* (Loricariidae, Loricariinae) from the Laguna dos Patos drainage, Southern Brazil, with the descriptions of two new species and the recognition of two species groups. **Copeia**. v.2, p.333-349, 2008.

RUBERT, M; ZAWADZKI, H. C; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. v.6(1), p.93-100, 2008.

RUIZ-HERRERA, A.S.G. NERGADZE, M. SANTAGOSTINO, E E. GIULOTTO. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**. v.122, p.219-228, 2008.

SCAVONE M.D; JULIO JR. H.F. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichtys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). **Brazil. J. Genet**. v.18, p.31-35, 1995.

SCAVONE M.D; JULIO JR., H.F. Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females (Loricariidae-Siluriformes) from the Parana river basin. **Rev. Ictiol**. v.213, p.41-47, 1994.

SCAVONE, M.D.P. **Análise citogenética de espécies dos gêneros Loricaria e Loricariichthys (Loricariidae, Siluriformes) da bacia do rio Paraná.** MSc Thesis, Universidade Estadual de Maringá. p.82, 1993.

SCHAEFER, S. A. Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Siluroidei: Loricariidae), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.102, p. 1-41, 1991.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae), In: (MALABARBA, LR., REIS, RE., VARI, RP., LUCENA, ZE., LUCENA, CA. (eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes.** EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, p. 375-400, 1998.

SCHWEIZER, D; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes Today**. v.9, p.61–74, 1987.

SEMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Plano de Bacias Hidrográficas. Disponível em <http://www.sema.pr.gov.br/>. Acesso em dezembro de 2010.

SHAMPAY, J; SCHMITT, M; BASSHAM, S. A novel minisatellite at a cloned hamster telomere. **Chromosoma**. v.104, p.29-38, 1995.

SHIBATTA, O.A; ORSI, M.L; BENNEMANN, S.T; SILVA-SOUZA, A.T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: (Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A; eds.) **A bacia do rio Tibagi.** Londrina: M.E. 2002.

SHIBATTA, O.K; GEALH, A.M; BENNEMANN, S.T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**. v.7, p.1-10, 2007.

SLIJEPCEVIC, P. Telomerase and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chomosoma**. v.107, p.136-140, 1998.

SLIJEPCEVIC, P; XIAO, Y; NATARAJAN, A. T; BRYANT, P. E. Instability of CHO chromosomes containing interstitial telomeric sequences originating from Chinese hamster chromosome 10. **Cytogenet Cell Genet**. v.76, p.58 – 60, 1997.

SMITH, G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossing-over. **Science**. n.191, p.528-535, 1976.

SOUZA PAES DE, A. C; NAGAMACHI, Y. C; MILHOMEM, R. S. S; FELDBERG, E; PIECZARKA, C. J. Cytogenetic analysis in catfish species of the genus Peckoltia Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Comparative Cytogenetics**. v.3(2). 2009.

SOUZA PAES DE, C. A; NASCIMENTO, L. A; CARVALHO Jr, R. J; BARROS, S. M. R; FELDBERG, E. NAGAMACHI, Y. C; PIECZARKA, C. J. Karyotypic analysis of *Baryancistrus* aff. *niveatus* (ancistrinae, loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. **Caryologia**. v.57(3), p.219-223, 2004.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**. v.75, p.304-306, 1972.

SUMNER, A.T. Chromosomes – Organization and Function. (Blackwell Publishing, Malden 2003.

UIEDA, V.S; CASTRO, R.M.C. Coleta e fixação de peixes de riachos. In: (Caramaschi, E.P; Mazzoni, R.; P.R. Peres-Neto; eds). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VI. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. p.01-22, 1999.

VARI, R. P; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: (Malabarba, L. R; Reis, R. E; Vari, R. P; Lucena, Z. M. S; Lucena, C. A. S. eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS. p.1-11, 1998.

VICARI, M. R; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janae*. **Cytogenetic and Genome Research**. n.122, p.67-72, 2008.

VICARI, M.R; NOGAROTO, V; NOLETO, R.B; CESTARI, M.M; CIOFFI, M.B; ALMEIDA, M.C; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L.A.C; ARTONI, R.F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **J Fish Biol**. v.76, p.1094–1116, 2010.

WEBER, C. Subfamily Hypostominae (Armored Catfishes). In: REIS, RE; KULLANDER, SO; FERRARIS, CJ. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, Porto Alegre: EDIPURCS, p. 351-37, 2003.

WELCOMME, R. L. River fisheries. **FAO Fisheries Technical Paper**. p.262-330, 1985.

WHITE, M.J.D. **Modes of Speciation**. W.H.Freeman and Company, San Francisco, 1978.

ZAWADZKI, C. H; PAVANELLI, C. S; LANGEANI, F. *Neopleostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Parana basin, Brazil, with description of three new species. **Zootaxa**. p.31-48, 2008.