

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

Alain Victor de Barros Barboza

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM LORICARIIDAE (ACTINOPTERYGII,
SILURIFORMES): TENDÊNCIAS DE DIVERSIFICAÇÃO E AGRUPAMENTOS
BASEADOS EM REARRANJOS CROMOSSÔMICOS**

Ponta Grossa

Fev/2013

ALAIN VICTOR DE BARROS BARBOZA

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM LORICARIIDAE (ACTINOPTERYGII,
SILURIFORMES): TENDÊNCIAS DE DIVERSIFICAÇÃO E AGRUPAMENTOS
BASEADOS EM REARRANJOS CROMOSSÔMICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, para a obtenção título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello

Ponta Grossa

Fev/2013

Ao maior e mais importante órgão
de ensino, incentivo e fomento de
todos: Mãe.

*“Existe duas maneiras de ser feliz
nesta vida, uma é fazer-se de
idiota e a outra sê-lo.”*

Sigmund Freud

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda a sorte que eu tenho na minha vida.

Ao meu protetor São Jorge, por abrir os meus caminhos e não me deixar fraquejar nunca. Salve Jorge!

Mãe, Isa e Mi por me apoiarem em (quase) tudo, pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado e principalmente por me aguentarem, o que eu sei que não é fácil. Amo vocês minhas meninas.

Ao meu pai, que mesmo 3.500 km longe tá sempre do meu lado em qualquer uma das minhas escolhas. Te amo meu velho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari por literalmente não ter me dado o peixe, mas ter me ensinado a pescar. Valeu chefe, você sempre foi um grande amigo e eu tenho muita sorte de poder ter aprendido e continuar aprendendo tanta coisa com você. Brincadeiras a parte você é realmente “The Best” em qualquer coisa que você faz, tanto no pessoal quanto no profissional.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Mara Cristina de Almeida por ser uma mãezona pra mim. Obrigado professora, por sempre me ajudar de forma tão carinhosa e elegante, além de me fazer andar na linha várias vezes. Você por vezes acreditou em mim quando nem eu acreditava, e por isso eu serei eternamente grato.

A Prof^a. Dr^a. Viviane Nogaroto por sempre me ajudar de sorriso no rosto e não se importar de me explicar a mesma coisa trezentas vezes. Valeu Vivi!

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, que sempre foi como um paizão. Valeu Robertão por sempre me ouvir de coração aberto e me ajudar, tanto no laboratório quanto fora dele.

Aos meus grandes *Winterfellas*: Paulo, Rafa e Léo. Vocês sempre me ajudaram e me apoiaram em tudo, principalmente quando eu achava que nada mais ia dar certo. Valeu galera, pelas noites de quarta-feira e pelas “grandes” discussões científicas, fossem elas ébrias ou não. *Brace yourselves, doutorado is coming.*

Especialmente a Thaís Saad Sczepanski e Alex Silveira Pavlak que além de serem grandes amigos e companheiros, me ajudaram muito nesse trabalho. Valeu galera.

Ao meu grande amigo e companheiro de todas as horas Miguel Ailton Carvalho. Muito obrigado Miguelito por toda a ajuda, no campo e no laboratório, ter me ensinado a passar café, além de tantos momentos de alegria indo e voltando do R.U. Valeu parceiro.

Aos amigos e colegas de laboratório: Karina, Kaline, Kamila, Jordana, Michelle, Bárbara, Diana, Marcela, Patricia, Johnatan, Luís, Felipe e Tajiana.

E finalmente a CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

“Nunca esqueça quem você é. O resto do mundo não esquecerá. Use isto como uma armadura, assim nunca poderá ser usado para feri-lo”

Tyrion Lannister

RESUMO

A ordem dos siluriformes compõe o maior e mais diverso grupo dentro de Ostariophysi, predominantemente dulcícolas, representam uma grande porção da ictiofauna neotropical. A família Loricariidae, cujos representantes são popularmente conhecidos como “cascudos”, constitui o maior grupo dentro dos siluriformes, agrupando aproximadamente 100 gêneros e um número superior a 850 espécies. Apesar do grande número de espécies e de sua ampla distribuição, análises evolutivas ainda são escassas e, por vezes, contraditórias, o que levou esse grupo a sofrer repetidas reformulações sistemáticas e de agrupamento nas últimas décadas. Um caráter cromossômico plesiomórfico observado em Loricariidae é o $2n = 54$, como apresentado pelas subfamílias Neoplecostominae e Hypoptopomatinae. Porém, subfamílias como Hypostominae e Loricariinae demonstram extensivos rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais, com algumas tendências de diversificação bem definidas. Neste estudo, foram estudadas citogeneticamente quatro espécies de Loricariidae: *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* – Neoplecostominae (rio Charqueada, bacia do rio Tibagi, Imbaú-PR); *Otothyropsis biamnicus* – Hypoptopomatinae (rio Barreiro, bacia do rio Tibagi, Tibagi-PR); *Rineloricaria pentamaculata* – Loricariinae (rio Barra Grande, Prudentópolis-Pr e rio dos Patos, Ivaí-PR, ambos da bacia do rio Ivaí) e; *Ancistrus* sp. – Hypostominae (rios dos Patos e Lageado, Ivaí-Pr, bacia do rio Ivaí). O objetivo do estudo foi avaliar o possível envolvimento dos DNAs repetitivos nos rearranjos cromossômicos de Loricariidae e estabelecer inferências de agrupamentos com base nos dados citogenéticos ancorados as análises morfológicas e moleculares. As espécies *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* e *Otothyropsis biamnicus* mantiveram a condição de $2n = 54$ cromossomos, além disso, uma inversão paracêntrica adjacente aos rDNAs foi diagnosticada em *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* com a manutenção dos sítios teloméricos intersticiais (ITS). Em *Rineloricaria pentamaculata*, dois cariomorfos foram observados em duas diferentes populações da bacia do Tibagi: Cariomorfo A - $2n = 54$ cromossomos e o cariomorfo B - $2n = 56$ cromossomos. A presença de ITS na região centromérica de um grande par metacêntrico exclusivo do cariomorfo A sugere o evento de fusão cêntrica na origem desta variação. Em *Ancistrus* sp., $2n = 50$ cromossomos regiões ITS também foram diagnosticadas comprovando a hipótese que os peixes da tribo Ancistrinii tendem a sofrer redução numérica a partir do $2n = 54$ cromossomos por fusão cêntrica. Ainda, o retroelemento Rex 3 não pôde ser associado aos rearranjos cromossômicos identificados neste estudo. Deste modo, os resultados aqui apresentados confirmam a condição de conservação do $2n = 54$ cromossomos entre os Neoplecostominae e grande maioria dos Hypoptopomatinae, embora a ocorrência de rearranjos estruturais, como demonstrado em *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* com a utilização de sonda telomérica possam acarretar em alterações nas fórmulas cariotípicas. Por fim, os resultados citogenéticos já descritos para peixes Ancistrinii e Hypostominiini demonstram uma dicotomia em relação ao número cromossômico, com tendências a redução numérica a partir do $2n = 54$ em Ancistrinii e aumento do $2n$ em Hypostominiini. Com base nestes dados, a citogenética corrobora a filogenia proposta por Isbrücker, com manutenção de Ancistrinae ao nível de subfamília.

Palavras chave: Cascudos; DNAs repetitivos; evolução cariotípica; filogenia; morfologia.

ABSTRACT

The order of Siluriformes composes the largest and most diverse group within Ostariophysi, they are predominantly freshwater, representing a large portion of the Neotropical ichthyofauna. The family Loricariidae, popularly known as "armored catfish", is the largest group within the siluriformes, comprising approximately 100 genera and a number greater than 850 species. Despite the large number of species and their wide distribution, evolutionary analyzes are still scarce and sometimes contradictory, which led this group to suffer repeated systematic reformulations in the last decades. A chromosomal plesiomorphic character observed in Loricariidae is $2n = 54$, as shown by subfamilies Neoplecostominae Hypoptopomatinae. But as subfamilies Hypostominae and Loricariinae demonstrate extensive numerical and structural chromosomal rearrangements, with some well-defined trends of diversification. In this study, four Loricariidae species were cytogenetically studied *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* - Neoplecostominae (Charqueada river, Tibagi river basin, Imbaú-PR); *Otothyropsis biamnicus* - Hypoptopomatinae (Barreiro river, Tibagi river basin, Tibagi-PR); *Rineloricaria pentamaculata*-Loricariinae (Barra Grande river, Prudentópolis-Pr and Rio dos Patos, Ivaí-PR, both Ivaí river basin) and *Ancistrus* sp. - Hypostominae (Rio dos Patos and Lageado, Ivaí-Pr, Ivaí river basin). The aim of the study was to evaluate the possible involvement of repetitive DNA in chromosome rearrangements of Loricariidae and make inferences based on groupings of cytogenetic data anchored the morphological and molecular analyzes. The species *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* and *Otothyropsis biamnicus* maintained condition of $2n = 54$ chromosomes, addition, inversion paracentric adjacent to rDNAs was diagnosed in *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* with the maintenance of interstitial telomeric sites (ITS). In *Rineloricaria pentamaculata* two karyomorphs were observed: The Karyomorph - $2n = 54$ chromosomes and Karyomorph B - $2n = 56$ chromosomes. The presence of ITS in the centromeric region of a large metacentric exclusive karyomorph suggests centric fusion events at the origin of this variation. In *Ancistrus* sp., $2n = 50$ chromosomes ITS regions were also diagnosed proving the hypothesis that fish tribe Ancistrinii tend to suffer reduction number of $2n = 54$ chromosomes by centric fusion. Still, the retroelement Rex 3 could not be associated with chromosomal rearrangements identified in this study. Thus, the results presented here confirm the condition of preservation of $2n = 54$ chromosomes between Neoplecostominae and the vast majority of Hypoptopomatinae, although the occurrence of structural rearrangements as shown in *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* using telomeric probes may result in changes in the karyotypic formulas. Finally, the cytogenetic results already described for Ancistrinii fish and Hypostominii show a dichotomy in relation to chromosome number, tending to reduce number from $2n = 54$ in Ancistrinii and increase the $2n$ in Hypostominii. Based on these data, confirms the cytogenetic phylogeny proposed by Isbrücker, maintaining the level of Ancistrinae subfamily.

Keywords: Armored catfishes, repetitive DNAs, karyotype evolution; chromosomal rearrangements.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Mapa hidrográfico do estado do Paraná, em destaque a região de divisão das bacias do rio Tibagi e Ivaí na região dos Campos Gerais. Em (A) Rio Charqueada – Imbaú; (B) Rio Barreiro – Tibagi; (C) Rio dos Patos – Ivaí; (D) Rio Lageado – Ivaí e (E) Rio Barra Grande - Prudentópolis. (Fonte: <http://www.meioambiente.pr.gov.br/> - Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - SEMA).....41
- Figura 2.** Cariótipos de *Isbrueckerichtys cf. calvus*, *Otothyropsis biamnicus*, *Rineloricaria pentamaculata* – Cariomorfo A, *R. pentamaculata* – Cariomorfo B e *Ancistrus* sp. em coloração convencional por Giemsa (A, C, E, G, I) e Bandamento C (B, D, F, H, J) respectivamente.....42
- Figura 3.** Metáfases mitóticas de *Isbrueckerichthys cf. calvus* submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Destaque para a presença de ITS no maior par submetacêntrico.....43
- Figura 4.** Metáfases mitóticas de *Otothyropsis biamnicus* submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica.....44

Figura 5. Metáfases mitóticas de *Rineloricaria pentamaculata* – Cariomorfo A, submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Destaque para a presença de ITS no maior par metacêntrico.....45

Figura 6. Metáfases mitóticas de *Rineloricaria pentamaculata* – Cariomorfo B, submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica.....46

Figura 7. Metáfases mitóticas de *Ancistrus* sp. submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Destaque para a presença de ITS no par submetacêntrico (setas).....47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Diversidade de peixes</i>	1
1.2 <i>Bacias hidrográficas dos rios Tibagi e Ivaí</i>	3
1.3 <i>Os Siluriformes e a família Loricariidae</i>	5
1.4 <i>As subfamílias do grupo Loricariidae</i>	9
1.5 <i>DNAs repetitivos</i>	14
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 <i>Material biológico e locais de coleta</i>	20
3.2 <i>Metodologias</i>	21
4. RESULTADOS	23
4.1 <i>DNAs repetitivos evidenciam rearranjos cromossômicos em Loricariidae (Actinopterygii, Siluriformes): propostas de diversificação e agrupamento filogenético</i>	23
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	30
Discussão	33
Agradecimentos	40
Referências bibliográficas	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. ANEXOS	71
<i>Anexo 1. Licença permanente para a coleta de material zoológico</i>	71
<i>Anexo 2. Protocolo CEUA</i>	73
<i>Anexo 3. Preparações Diretas (BERTOLLO et al., 1978)</i>	74
<i>Anexo 4. Bandamento-C (SUMNER, 1972, com modificações)</i>	75
<i>Anexo 5. Marcação de sonda de rDNA 18S</i>	76
<i>Anexo 6. Marcação de sonda de rDNA 5S</i>	77
<i>Anexo 7. Obtenção da sequência telomérica geral dos vertebrados TTAGGGn (IJDO et al., 1991)</i>	78
<i>Anexo 8. Obtenção e marcação de sonda do retroelemento Rex 3</i>	79
<i>Anexo 9. Publicação científica paralela ao mestrado</i>	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade de peixes

Dentre todos os grupos de vertebrados, nenhum é tão diversificado e numeroso quanto os peixes (NELSON, 2006). É um importante grupo e um dos mais interessantes para estudos de variabilidade genética e evolução (NELSON, 2006). De acordo com Eschmeyer e Fong (2013), 32.184 espécies de peixes são consideradas válidas o que corresponde a mais da metade das formas vivas de vertebrados. Pelo fato de a grande maioria das espécies ser cariotipicamente única, estudos citogenéticos podem auxiliar na compreensão de diversos fatores genéticos/evolutivos e resolver várias questões, tais como: estabelecimento de relações filogenéticas, citotaxonomia de grupos críticos e compreensão da dispersão e biogeografia das espécies, permitindo assim, inferências evolutivas e sobre diversificação cariotípica nos mais diversos grupos (ARTONI et al., 2009).

Nos estudos de diferenciação populacional e citogenética de peixes é de extrema importância o conhecimento de seu habitat, bem como, a qual bacia hidrográfica pertencem devido ao isolamento populacional que esta proporciona. O dinamismo das bacias hidrográficas decorrente de eventos geomorfológicos pretéritos também é de grande importância para o entendimento das misturas de faunas entre sistemas adjacentes (ARTONI et al., 2009; RIBEIRO, 2006; VICARI et al., 2005). O termo riacho é utilizado para aquelas porções de um sistema fluvial de primeira e segunda ordem, geralmente pouco ou não alterado pela ação antrópica, com produção primária autotrófica local baixa, devido a presença de vegetação ripária que bloqueia parcial ou totalmente a incidência direta de luz, sendo a comunidade lótica

dominantemente heterotrófica e dependendo em grande parte da importação de material orgânico alóctone para subsistir (CASTRO, 1999). 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 (CASTRO, 1999). O ponto onde um riacho muda de heterotrófico para autotrófico depende principalmente do nível de sombreamento e, portanto, da presença, densidade e posição da mata ciliar, que por sua vez dependem do tipo de vegetação dominante na área, latitude, altitude e estrutura física do riacho (CASTRO, 1999). Espera-se que a composição da ictiofauna dos tributários de primeira ordem seja diferente daquela dos riachos de maior ordem (JUNK, 1993).

Os peixes de pequeno porte encontrados principalmente nas cabeceiras de riachos representam aproximadamente 50 % do total de espécies em uma bacia hidrográfica, porém são pouco estudadas quando comparadas as de maior porte (CASTRO et al., 2003). O alto grau de endemismo da maioria das espécies se deve principalmente a eventos de vicariância que geram um isolamento geográfico entre as populações/espécies, ou ao pequeno potencial de dispersão entre as espécies residentes em cabeceiras de rios (MENEZES, 1996). Estas espécies isoladas ou residentes em cabeceiras de rios tendem a divergir geneticamente das demais com maior rapidez em relação às típicas de grandes rios (ARTONI et al., 2009; VICARI et al., 2008; WEITZMAN; MENEZES; WEITZMAN, 1988). A maioria das espécies de peixes que vivem em cabeceiras de riachos são de pequeno porte e pouco se conhece sobre sua diversidade genética. Peixes Loricariidae de pequeno porte são comuns em

pequenos riachos, habitando principalmente a vegetação ripária ou o fundo de córregos pedregosos. Nesta abordagem, amostrar áreas de cabeceiras de rios pode ser uma eficiente alternativa para desvendar a diversidade biológica destas áreas pouco exploradas.

1.2 *Bacias hidrográficas dos rios Tibagi e Ivaí*

O sistema hidrográfico do Alto Rio Paraná é uma das cinco divisões existentes do rio Paraná e compreende o trecho de Guaíra até a cabeceira dos rios Grande e Paranaíba, com 619 km de extensão em território brasileiro (SALLUN; SUGUIO; STEVAUX, 2007). Entre estas drenagens ocorrem importantes bacias hidrográficas menores, cada uma com um conjunto peculiar de organismos. O Alto Paraná abriga cerca de 310 espécies de peixes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (LANGEANI et al., 2007). Apesar da ictiofauna do Alto Paraná ser uma das melhor conhecidas e mais estudadas, o número de espécies descritas ou referidas para a área tem crescido exponencialmente, o que indica que a riqueza apresentada está longe de representar a realidade (LANGEANI et al., 2007).

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 km², o que corresponde a cerca de 13 % da área do estado do Paraná. Percorre o primeiro, o segundo e o terceiro planaltos Paranaenses, 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 (MAACK, 1981). 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), do qual é o principal afluente, o qual por sua vez deságua no rio Paraná em seu trecho superior, acima de Sete Quedas, pertencendo à sub-região zoogeográfica do Alto Paraná. A bacia do rio Tibagi apresenta uma grande diversidade de peixes e esta tende a aumentar da nascente em direção a foz (SHIBATTA et al., 2002). Todas as espécies registradas para a bacia pertencem à subclasse Actinopterygii e, principalmente, à superordem Ostariophysi (SHIBATTA et al., 2002). Para esta bacia foram descritas 151 espécies, entre estas foram representadas as ordens Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes (RAIO; BENNEMANN, 2010; SHIBATTA et al., 2002; SHIBATTA; GEALH; BENNEMANN, 2007).

A bacia hidrográfica do rio Ivaí abrange uma área de 35.914km², sendo a segunda maior bacia do estado do Paraná (MAACK, 1981). Essas dimensões levam-na a ocupar cerca de 23 % do território paranaense, constituindo a principal bacia hidrográfica do Terceiro Planalto desse estado. O rio Ivaí estende-se por cerca de 685 km, desde suas nascentes, na confluência do rio São João com o rio dos Patos, sendo este o principal curso de origem do rio Ivaí, na divisa entre os municípios de Prudentópolis e Ivaí, no Terceiro Planalto paranaense (MAACK, 1981). A bacia desenvolve-se no sentido geral noroeste, orientando-se para oeste no baixo curso, até sua foz no rio Paraná (MAACK, 1981). O rio Ivaí deságua em um braço do rio Paraná abaixo da foz do rio Paranapanema. O povoado de Pontal do Tigre no município de Icaraíma é situado à margem sul da foz do Ivaí, e o município de Querência do Norte à margem norte (MAACK, 1981). Nesta bacia hidrográfica, as principais ordens de peixes

representadas são Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes (DA GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

1.3 Os Siluriformes e a família Loricariidae

Os representantes da ordem Siluriformes são os mais diversos e amplamente distribuídos dentro do grupo Ostariophysi (REIS et al., 2003). Sua distribuição abrange toda a região Neotropical, além da América do Norte, África e Eurásia, e registros fósseis foram encontrados na Antártida (DE PINNA, 1998). Possui mais de 3100 espécies, distribuídas em 36 famílias (FERRARIS, 2007) sendo popularmente conhecidos por bagres ou *catfishes*, constituem cerca de 10% de todas as espécies de peixes existentes. Com exceção das famílias Plotosidae e Ariidae que ocupam o ambiente marinho, e que se distribuíram mundialmente, a exemplo da Austrália, Madagascar e Índia Ocidental (BERRA, 2001), os Siluriformes são predominantemente dulcícolas (REIS et al., 2003). A maior diversidade dos Siluriformes ocorre na América do Sul, sendo encontrados representantes de 14 famílias e 64% das espécies do grupo (MOYLE; CECH, 2000; RODILES-HERNÁNDEZ et al., 2005). Os Siluriformes podem ser facilmente identificados por possuírem características morfológicas distintas: corpo nu envolto por uma pele espessa ou coberto por placas ósseas; nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e da dorsal portador de um acúleo rígido, o qual, muitas vezes produz toxina associada à glândula de veneno; presença de nadadeira adiposa geralmente bem desenvolvida e nadadeira caudal assumindo formatos variáveis e de um a quatro pares de barbilhões sensitivos (BRITSKI et al., 1988; TEUGELS, 1996). Possuem uma grande variação de tamanho,

desde poucos milímetros (cerca de 10 mm em alguns representantes da família Trichomycteridae) até 5 m na espécie *Silurus glanis* Linnaeus, 1758 (BRITSKI et al., 1988; TEUGELS, 1996). Apresentam hábitos predominantemente crepusculares ou noturnos, quando utilizando-se de seus sentidos químicos, saem à procura de alimento, o qual é constituído principalmente por vermes e insetos, ou no caso da família Loricariidae, utilizam sua boca em forma de ventosa para sugar detritos do substrato ao qual está preso (BRITSKI et al., 1988; TEUGELS, 1996).

A família Loricariidae, cujos componentes são comumente chamados de cascudos ou *armored catfishes*, é a maior família da ordem Siluriformes, agrupa aproximadamente 100 gêneros e um número superior a 850 espécies são reconhecidas atualmente (ESCHMEYER; FONG, 2013). Estes peixes são recobertos por placas dérmicas, motivo pelo qual ganharam a alcunha “cascudos”, além disso, possuem a boca em forma de ventosa na região ventral do corpo (SCHAEFER; LAUDER, 1986). Vivem na região bentônica, alimentando-se de algas do perifíton e de detritos (SCHAEFER, 1990). Alguns exemplares desta família são apreciados como alimento em certas regiões do país, sendo as espécies menores utilizadas para fins ornamentais e popularmente conhecidas como limpa-vidro por se alimentarem do lodo que se acumula nas paredes dos aquários (SCHAEFER; LAUDER, 1986). Podem ficar fora da água por longos períodos, pois além de respirarem pelas brânquias também o fazem pela parede vascularizada do estômago (SCHAEFER, 1990). Os cascudos da família Loricariidae são endêmicos da América do Sul e Central, abrangendo toda a região Neotropical, mas há registros da sua introdução na América do Norte e Ásia, onde estão se proliferando rapidamente (SCHAEFER, 1990). Pelo fato dos loricariídeos ocuparem todos os tipos de habitats, desde pequenos e gélidos córregos

montanhosos, até grandes rios de ampla extensão, eles formam um importante componente da biodiversidade aquática (SCHAEFER; LAUDER, 1986).

Em conjunto com outras cinco famílias muito próximas filogeneticamente, a família Loricariidae está incluída na superfamília Loricarioidea, juntamente com Astroblepidae, Scoloplacidae, Callichthyidae, Trichomycteridae e Nematogenyidae (BASKIN, 1973; DE PINNA, 1992; SCHAEFER, 1987). Dentro de Loricariidae a classificação das subfamílias e a relação entre seus gêneros vêm sendo alvo de repetidas reformulações (ARMBRUSTER, 2004; ISBRUCKER, 1980; REIS et al., 2006). Armbruster (2004) considerou as subfamílias Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae como grupos válidos dentro de Loricariidae. Nesta revisão, a família Ancistrinae foi considerada sinônima de Hypostominae, a qual compreende cinco tribos, sendo elas: Corymbophanini, Rhinelipini, 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.

Os dados cariotípicos pertencentes à família Loricariidae revelam uma alta diversidade de números diploides ($2n$) e características cromossômicas, a qual pode ter de $2n = 34$ cromossomos em *Ancistrus* sp. 1 e *Ancistrus* sp. 2 (MARIOTTO et al., 2011; OLIVEIRA, 2006) a $2n = 96$ cromossomos em *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2004). Apesar desta ampla variação, tendências da evolução cariotípica são bem definidas dentro de cada uma das subfamílias de Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ZIEMNICZAK et al., 2012). Artoni e Bertollo (2001) propuseram que o número

diploide $2n = 54$ cromossomos seria um caráter plesiomórfico em Loricariidae, uma vez que é observado em gêneros mais basais e no grupo irmão Trichomycteridae, também pertencente à superfamília Loricarioidea. Além disto, este número diploide é observado em alguns representantes de todas as subfamílias de Loricariidae, sendo o $2n$ mais comum em subfamílias consideradas basais, a exemplo de Neoplecostominae (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Por sua vez, a maioria dos representantes das subfamílias Loricariinae e Hypostominae possuem uma gama muito grande de $2n$ e marcadores cromossômicos, revelando características altamente diferenciadas em relação a características primitivas de Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012; MARIOTTO et al., 2009, 2011). Embora os dados de morfologia (ARMBRUSTER, 2004; LEHMANN, 2006; PEREIRA, 2008) e citogenética (ZIEMNICZAK et al., 2012) demonstrem alguns agrupamentos consistentes, a monofilia de no mínimo duas subfamílias e duas tribos: Neoplecostominae e Hypoptopomatinae; Ancistrini e Hypostomini, respectivamente, foram rejeitadas por estudos moleculares (CRAMER et al., 2008; HARDMAN, 2005; MONTOYA-BURGOS et al., 1998, 2002). Baseado em caracteres morfológicos, Schaefer (1997, 1998), considerou Hypoptopomatinae sendo monofilético, consistindo de duas tribos monofiléticas: Hypoptopomatini e Otothyriini. Utilizando dados moleculares, Montoya-Burgos et al. (1998) foi o primeiro a encontrar uma estreita relação entre Neoplecostominae e Hypoptopomatinae, com *Pseudotocinclus* sendo grupo irmão de *Pareiorhina*. Por outro lado, Armbruster (2004), por meio de análises morfológicas, sugeriu que Hypoptopomatinae seria um grupo monofilético dentro de Neoplecostominae. Cramer et al. (2008) obtiveram dados similares à Montoya-Burgos e colaboradores, com Neoplecostominae sendo um grupo

parafilético dentro de Hypoptopomatinae. Já Chiachio et al. (2008) tentaram resolver estes problemas, incluindo *Pseudotocinclus* dentro de Neoplecostominae e elevando Otothyriini a subfamília. Porém, este ainda pode ser um problema a ser resolvido devido aos estudos morfológicos (LEHMANN, 2006), e também moleculares (CRAMER et al., 2008, 2011) não corroborar a subfamília Otothyriini.

1.4 As subfamílias do grupo Loricariidae

Os dados cariotípicos disponíveis para Loricariidae demonstram uma enorme diversidade de caracteres cromossômicos, no entanto, com algumas tendências evolutivas bem caracterizadas entre as distintas subfamílias (ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre as espécies pertencentes a subfamília Hypostominae, poucas mantêm o número diploide $2n = 54$ cromossomos. Todos os representantes da tribo Ancistrini possuem $2n \leq 54$, indicando que fusões cêntricas contribuíram para a evolução cariotípica deste grupo (MARIOTTO et al., 2011).

A tribo Ancistrini é composta por 29 gêneros onde se agrupam um total de 217 espécies reconhecidas, sendo quatro destes gêneros representados por espécies monotípicas (FISCH-MULLER, 2003). Considerando apenas o sistema hidrográfico brasileiro, esta tribo compreende 21 gêneros e 78 espécies, encontradas principalmente na bacia Amazônica (SARMAMENTO-SOARES; INGENITO, 2007). *Ancistrus* corresponde ao mais diversificado gênero do grupo, apresentando 63 espécies descritas (BIFI et al., 2009). Esse grupo é caracterizado por seu focinho de

formas arredondadas, e podem apresentar dimorfismo sexual em muitas espécies, com numerosos e longos barbilhões bifurcados nos machos e curtos em fêmeas.

A citogenética, tanto clássica quanto molecular, vem sendo usadas como poderosas ferramentas para esclarecer dúvidas acerca da identificação de algumas espécies, e também propor filogenias para alguns grupos de peixes (BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR, 1986; SCHWARTZ; MADDOCK, 2002; VALENTE et al., 2009). Em Ancistrini, essas análises revelaram uma grande diversidade de número cromossômico, desde $2n = 34$ em *Ancistrus* sp. 1, *Ancistrus* sp. 2 e *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (DE OLIVEIRA, 2006; MARIOTTO et al., 2011) até $2n = 54$ em *Ancistrus claro* Knaack, 1999 (MARIOTTO et al., 2011).

Por sua vez, a tribo Hypostomini reune poucos representantes com estudos cariotípicos evidenciando número diploide de 52 ou 54 cromossomos (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012). Nesta tribo, o gênero *Hypostomus*, com cerca de 120 espécies (ZAWADZKI et al., 2010) é o mais numeroso e em relação à citogenética apresenta tendência de aumento do $2n$ a partir dos 54 cromossomos considerados basais (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012). Os estudos citogenéticos em *Hypostomus* indicam grande variabilidade em diversos aspectos cariotípicos, o que confere ao grupo uma enorme complexidade (ARTONI; BERTOLLO, 1996). As variações cromossômicas inter-populacionais são recorrentes, especialmente em relação à fórmula cariotípica (ALVES et al., 2006; ARTONI; BERTOLLO, 1996; BUENO et al., 2012; MICHELLE et al., 1977), distribuição de heterocromatina (ARTONI; BERTOLLO, 1999; RUBERT et al., 2008; TRALDI et al., 2012) e regiões organizadoras de nucléolo (ARTONI; BERTOLLO, 2001; RUBERT et al., 2008). Por sua vez, polimorfismos populacionais são raros e se referem a variações na fórmula

cariotípica e de blocos heterocromáticos (ARTONI; BERTOLLO, 1999; TRALDI et al., 2012).

A subfamília Loricariinae é a segunda mais numerosa da família Loricariidae atrás apenas da subfamília Hypostominae, apresentando uma grande diversidade no que diz respeito a número de cromossomos e a fórmula cariotípica (ROSA et al., 2012). *Rineloricaria* Bleeker, 1862, é o gênero mais rico em espécies de Loricariinae, com cerca de 60 espécies (GHAZZI, 2008; RODRIGUEZ; REIS, 2008), das quais, cerca de 25 % apresentam resultados citogenéticos (ZIEMNICZAK, 2011). Este gênero possui uma ampla variação cariotípica, desde *Rineloricaria latirostris* (Boulenger, 1900) apresentando o menor número diploide: $2n = 36$ cromossomos, até *Rineloricaria* sp. e *Rineloricaria* cf. *lima* (Kner, 1853) com um número diploide de 70 cromossomos (ALVES et al., 2003; GIULIANO-CAETANO, 1998; RODRIGUES; ALMEIDA-TOLEDO, 2008; ROSA et al., 2012).

Nesta subfamília Rosa et al. (2012) relataram que tanto fissões quanto fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações gaméticas poderiam explicar a variação do $2n$. Rosa et al. (2012) analisaram duas populações da espécie *Rineloricaria* cf. *lima* de afluentes do rio Ribeira, as quais apresentaram uma variação de número cromossômico de 66 a 70 cromossomos, além de diferentes fórmulas cariotípicas, apresentando um total de oito citótipos. A variação cromossômica encontrada nesta espécie foi decorrente de rearranjos do tipo fusão cêntrica e inversões, visualizadas com a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) e rDNA 5S em pontos de fusão (ROSA et al., 2012). Além disto, foi proposta a ocorrência de diferentes combinações gaméticas para explicar a ampla variação do $2n$ observado em *Rineloricaria* cf. *lima* (ROSA et al., 2012).

A subfamília Hypoptopomatinae possui inúmeros questionamentos a cerca de suas relações de parentesco e agrupamento de gêneros, no entanto, foi considerado um grupo monofilético dentro de Loricariidae, composto por aproximadamente 80 espécies distribuídas em 18 gêneros (CARVALHO et al., 2008). Esta subfamília tende a ser conservativa em relação ao $2n = 54$ cromossomos, a exceções de *Hisonotus gibbosus* ($2n = 58$) e *Otocinclus* aff. *vestitus* Cope, 1872 ($2n = 72$) e com a presença de heteromorfismos de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Hisonotus leucofrenatus* (Miranda Ribeiro, 1908) e XX/XY em *Pseudotocinclus tietensis* (Ihering, 1907) (Para uma revisão ver ZIEMNICZAK et al., 2012). Os gêneros *Microlepidogaster* e *Hisonotus* foram considerados sinônimos e reconhecidos como táxons válidos separados por Schaefer, 1998. A informação citogenética sobre o gênero *Hisonotus* está restrita a poucas espécies nas quais a heterocromatina aparentemente desempenhou um papel fundamental na diversificação cariotípica (FERREIRA, 2011). Embora as espécies da subfamília Hypoptopomatinae apresentem uma macroestrutura cariotípica similar, o padrão de bandamento-C tem sido uma útil ferramenta na distinção de espécies (ANDREATA et al., 1993). Além do bandamento C, variações na fórmula cariotípica também mostraram ser marcadores úteis para a diferenciação populacional (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Neoplecostominae é outra subfamília que sofreu uma série de reformulações quanto a inclusão de novos gêneros (ARMBRUSTER, 2004). Os gêneros *Isbrueckerichthys*, *Hemipsilichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram agrupados entre os Neoplecostominae por manter homologias morfológicas de osteologia e anatomia externa (ARMBRUSTER, 2004). A citogenética de Neoplecostominae tem demonstrado um número diplóide estável, além de sítios de rDNA 5S e 18S sintênicos,

características compartilhadas com o grupo irmão Trichomycteridae e considerados como primitivos para o grupo (ZIEMNICZAK et al., 2012). *Isbrueckerichthys* foi proposto por Derijst (1996) para incluir a espécie *Pareiorhaphis duseni* (Miranda Ribeiro, 1907) e *Pareiorhaphis alipionis* (Gosline, 1947). Este gênero é composto de espécies de porte pequeno a médio, geralmente encontradas em córregos de fundo de pedra e areia, em áreas de alta oxigenação da água (PEREIRA; REIS, 2002). As três espécies descritas de *Isbrueckerichthys* eram reconhecidas como sendo endêmicas da bacia do rio Ribeira de Iguape, sendo *I.duseni* (MIRANDA RIBEIRO,1907) encontrada na porção superior da bacia, no Estado do Paraná, *I. alipionis* (GOSLINE, 1947) no rio Betari, um tributário do rio Ribeira de Iguape e *I. epakmos* Pereira & Oyakawa, 2003 de um afluente do rio Juquiá, no Estado de São Paulo (JEREP et al., 2006). Jerep et al. (2006) descreveram ainda, duas novas espécies de *Isbrueckerichthys*, *I. saxicola* Jerep, Shibatta, Pereira & Oyakawa, 2006 e *I. calvus* Jerep, Shibatta, Pereira & Oyakawa, 2006, ambas coletadas em riachos de cabeceira do rio Tibagi, bacia do rio Paranapanema, no Estado do Paraná. Essas foram as primeiras descrições para o gênero fora da bacia do rio Ribeira de Iguape, demonstrando um aumento na faixa de distribuição geográfica.

Dados citogenéticos para este gênero são encontrados no trabalho de Alves (2000) para *Isbrueckerichthys alipionis*, do Rio Betari, com $2n = 54$ e cariótipo composto de 38 cromossomos meta/submetacêntricos e 16 subtelo/acrocêntricos. Alves et al., (2005) analisaram o cariótipo de *Isbrueckerichthys duseni* do Rio Betari, Iporanga (SP), o qual apresentou $2n = 54$, com cariótipo composto de 20 cromossomos metacêntricos, 20 submetacêntricos e 14 subtlocêntricos. Os dados cariotípicos descritos por Alves et al. (2005) para *I. duseni* são similares aos de Ziemniczak et al.

(2012) para a população do rio Açungui, Ponta Grossa-PR, com divergência quanto a distribuição de heterocromatina, fórmula cariotípica e um polimorfismo no par 11 decorrente de acúmulo *in cis* de sequências de rDNA 5S. Por sua vez, as subfamílias Delturinae e Lithogeneinae apresentam poucos e confusos estudos citogenéticos devido as constantes reformulações de subfamílias e gêneros. Estudos citogenéticos em representantes destas duas subfamílias podem ser importantes para identificação de marcadores cromossômicos primitivos, uma vez que Reis et al. (2006) descreve Delturinae como grupo basal em Loricariidae.

1.5 DNAs repetitivos

Uma das principais características do genoma dos eucariotos é a presença de um grande número de sequências de DNA repetitivo não codificante (SUMNER, 2003). Essas sequências são geralmente classificadas em duas diferentes classes, sequências repetitivas em tandem: microssatélites, minissatélites e satélites, e elementos dispersos conhecidos como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH, 1994). DNAs satélites (satDNA), microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas representam classes de DNAs compostos por sequências repetitivas organizadas em tandem que, têm se mostrado como fundamentais e promissoras em estudos relacionados à evolução cromossômica (CHARLESWORTH et al., 1994; HADJIOLOV, 1985; MAXON et al., 1983; VICARI et al., 2010).

Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por heterocromatina constitutiva, a qual na maioria das vezes, é composta por satDNA

(CHAVES et al., 2004; JOHN, 1988). O estudo de DNAs satélites em peixes neotropicais têm se tornado frequente, uma vez que essas sequências podem gerar informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-específicas e/ou cromossomo-específicas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002; VICARI et al., 2010), assim como em estudos filogenéticos (KANTEK et al., 2009; PONS et al., 2002; PONS; GILLESPIE, 2003; SCHEMBERGER et al., 2011).

A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n constitui outra fração repetitiva em tandem importante no estudo de evolução cromossômica de peixes neotropicais. Sua análise permite a verificação de rearranjos cromossômicos, principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas, nos quais há a possibilidade de detecção de ITS (BLANCO et al., 2012; ROSA et al., 2012; SLIJEPCEVIC, 1998).

Os minisatélites, apesar de não apresentarem uma definição padronizada, têm se mostrado importantes ferramentas em estudos genéticos devido a sua dinâmica evolutiva (MARTINS, 2007). Estas sequências foram descritas para inúmeras espécies de peixes (GOODIER; DAVIDSON, 1998), contudo o mapeamento cromossômico de minisatélites foi realizado apenas para algumas espécies (PÉREZ et al., 1999; CROLLIUS et al., 2000). Da mesma forma, poucos são os peixes neotropicais com mapeamento físico de microsatélites (HATANAKA et al., 2002).

Os genes ribossomais compreendem duas distintas famílias gênicas, compostas por repetições organizadas em tandem. O maior rDNA (45S), região responsável pela organização do nucléolo, engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são separados por espaçadores internos e externos e rodeados por espaçadores não-transcritos (LONG; DAWID, 1980). Já o menor rDNA é composto pela

família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S (LONG; DAWID, 1980). Em função da aparente conservação molecular dos sítios ribossomais entre grupos de organismos relacionados, tais sequências representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos. Numerosos trabalhos realizados com sondas de rDNA 18S e 5S têm mapeado a localização cromossômica destes sítios com hibridização *in situ* fluorescente em peixes neotropicais; contudo em espécies pertencentes a Loricariidae tais estudos ainda estão em seu início (BITENCOURT et al., 2012; KAVALCO et al., 2004; 2005; MARIOTTO et al., 2009; 2011; MENDES-NETO et al., 2011; ROSA et al., 2012; RUBERT et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2012) frente a enorme diversidade de peixes existente.

A segunda classe de sequências repetitivas identificadas como elementos transponíveis também tem sido estudada em peixes, especialmente em relação a organização estrutural e mapeamento físico dos cromossomos (BOUNEAU et al., 2003; DA SILVA et al., 2002; FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2010; FISCHER et al., 2004; MAZZUCHELLI E MARTINS, 2009; OZOUF-COSTAZ et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2009). O elemento transponível pode ser identificado de acordo com sua organização estrutural e seu mecanismo de transposição. Retrotransposons, conhecidos como elementos transponíveis de primeira classe, se movimentam no genoma via transcriptase reversa, enquanto os elementos de segunda classe, identificados como transposons, apresentam sequências que se propagam pelo genoma como fragmentos de DNA (BÖHNE, 2008).

Nos últimos anos os DNAs repetitivos dispersos têm sido mais amplamente mapeados em peixes Neotropicais. Em *Leporinus elongatus* Parise-Maltempo et al. (2007) prospectaram o elemento repetitivo disperso LeSpel, o qual foi posteriormente

mapeado em híbridos de *Leporinus macrocephalus* e *L. elongatus* por Hashimoto et al. (2010). Gross et al. (2009) analisaram a distribuição do retroelemento Rex 3 (retroelemento isolado de *Xiphophorus*) em *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904, *Symphysodon discus* Heckel, 1840 e *Symphysodon haraldi*. Mazzucheli e Martins (2009) estudaram a distribuição de Rex1, Rex3 e Rex6 em *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831). Teixeira et al. 2009 isolaram o retrotransposon RCk a partir do genoma de *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira, 2006, e analisaram a distribuição dos retrotransposons Rex1, Rex3, Rex6 e Tc1-like em *C. kelberi*. Ferreira et al. (2011a) estudaram a distribuição dos retrotransposons Rex1 e Rex3 em três espécies da subfamília Hypoptopomatinae e Ferreira et al. (2011b) prospectaram o transposon HLBam de *Hisonotus leucofrenatus*. Por sua vez, Valente et al. (2011) analisaram a distribuição de Rex1, Rex3 e Rex6 em *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840). De modo geral, todos os estudos de localização *in situ* dos elementos transponíveis em peixes Neotropicais tem demonstrado a localização dispersa, com acúmulo preferencial em regiões de heterocromatinas, sendo algumas vezes utilizados para explicar a origem de alguns rearranjos cromossômicos (VALENTE et al., 2011). Por sua vez, o retroelemento Rex tem sido mapeado também na RON de inúmeras espécies (MAZZUCHELI; MARTINS, 2009; VALENTE et al., 2011), porém o exato papel funcional destas sequências ainda são desconhecidos.

Embora as sequências repetitivas dispersas entre os peixes Neotropicais apresentem um crescente no número de descrições, a informação ainda é escassa levando-se em conta o grande número de espécies desse grupo. Ainda, mesmo considerando os estudos já realizados no grupo a informação encontrada sobre a localização e a organização genômica destas sequências é limitada.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos citogenéticos são amplamente utilizados e tem gerado resultados e informações importantes auxiliando na compreensão das relações de parentescos entre diferentes ordens, famílias e gêneros de peixes, tornando esse grupo um excelente modelo para o estudo evolutivo. 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 pequeno porte ainda não descritas. Os afluentes das bacias dos rios Ivaí e Tibagi, na região dos Campos Gerais, PR e suas proximidades foram pouco estudadas no que se refere a identificação de espécies de peixes da família Loricariidae, 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 aqueles da literatura, buscando contribuir com a citotaxonomia, biogeografia de espécies e no entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica para a família.

Assim, foi objetivo geral do presente trabalho:

Estudar diferenciação cariotípica em Loricariidae utilizando os DNAs repetitivos como modelo para entender os possíveis rearranjos cromossômicos nesse grupo. Além disso, correlacionar a biogeografia local e contrapor os dados de agrupamentos citogenéticos aos dados filogenéticos morfológicos e moleculares.

As metas do estudo foram:

- a) Caracterizar, cariotipicamente, diferentes populações de espécies de Loricariidae, residentes nas cabeceiras dos rios Ivaí e Tibagi, região dos Campos Gerais (PR) e suas proximidades;
- b) Identificar marcadores cromossômicos que sejam informativos para análises comparativas entre as espécies e populações em estudo;
- c) Utilizar os dados obtidos e a literatura, para o entendimento da evolução cariotípica, biodiversidade e distribuição de grupos da ictiofauna, em relação a áreas ecologicamente diversificadas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Material biológico e locais de coleta*

Os exemplares da família Loricariidae foram coletados em duas importantes bacias hidrográficas paranaenses do sistema Alto Rio Paraná: bacia do rio Tibagi (*Isbrueckerichthys* cf. *calvus* - Rio Charqueada, Imbaú-PR e *Otothyropsis biamnicus* (Ihering, 1928) - Rio Barreiro, Tibagi-PR) (Fig. 1A;B) e bacia do rio Ivaí (*Rineloricaria pentamaculata* Langeani & de Araujo, 1994 - Rio Barra Grande, Prudentópolis-PR (Fig. 1E); *Rineloricaria pentamaculata* e *Ancistrus* sp. do Rio dos Patos e Rio Lageado, Ivaí-PR (Fig. 1C;D). As populações foram submetidas à identificação do número diploide modal e realização dos demais procedimentos citogenéticos.

O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1 – ANEXO 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. Exemplares testemunho foram identificados pelo Dr. Cláudio Henrique Zawadzki no do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia), Universidade Estadual de Maringá, Brasil. Todos os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo CEUA: 07/2011; Anexo 2). Os exemplares foram coletados com auxílio de peneiras, 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 anestesiados e posteriormente sacrificados para retirada de tecido para preparações citogenéticas (porção anterior do rim). O material obtido foi analisado no Laboratório de Citogenética e Evolução, do Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.2 Metodologias

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada segundo a técnica de Bertollo; Takahashi e Moreira-Filho (1978) (ANEXO 3). Para a detecção de heterocromatina constitutiva, a técnica de bandamento-C foi realizada segundo a técnica de Sumner (1972) (ANEXO 4). Para a localização física nos cromossomos foram utilizadas as sondas de rDNA 18S, rDNA 5S, sequência geral do telômero de vertebrados (TTAGGG)_n e a sonda do retroelemento Rex 3.

A sonda de rDNA 18S foi isolada a partir do DNA total de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JÚNIOR, 2004). A sonda do rDNA 5S foi obtida a partir do genoma de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI JÚNIOR, 1999). A sequência telomérica geral dos vertebrados foi obtida segundo Ijdo et al. (1991). Por sua vez, o retroelemento Rex 3 foi obtido a partir do DNA genômico de *Ancistrus* sp, deste estudo, seguindo o descrito por Volf et al. (1999). Para a marcação das sondas foi utilizado a *polymerase chain reaction* – PCR. A sonda de rDNA 18S foi marcada com biotina 16 dUTP (Roche Applied Science) com concentrações adequadas de dNTPs (ANEXO 5). Já a sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science) com concentrações adequadas de dNTPs (ANEXO 6). A

sonda (TTAGGG)_n foi marcada por PCR utilizando digoxigenina 11 dUTP (ANEXO 7). Por último, a sonda Rex 3 foi marcada por PCR utilizando digoxigenina 11 dUTP (ANEXO 8).

Lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à hibridação *in situ* fluorescente (FISH), de acordo com o procedimento geral descrito por Pinkel; Straume e Gray (1986) – (ANEXO 9).

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, subtelocêntrico e acrocêntrico), com a utilização do Programa Adobe Photoshop CS4 Extended: STONEHANGE.

A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan; Fredga e Sandberg (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor obedece o estabelecido:

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, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos.

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo I

4.1 DNAs repetitivos evidenciam rearranjos cromossômicos em Loricariidae (Actinopterygii, Siluriformes): propostas de diversificação e agrupamento filogenético

DNAs repetitivos evidenciam rearranjos cromossômicos em Loricariidae (Actinopterygii, Siluriformes): propostas de diversificação e agrupamento filogenético

Resumo

A família Loricariidae agrupa os peixes popularmente conhecidos como cascudos. A sistemática e os agrupamentos de subfamílias e gêneros desta família têm sofrido intensas reformulações nas últimas décadas. A citogenética tem demonstrado subfamílias com um padrão conservativo em relação ao $2n = 54$ cromossomos considerados primitivos para Loricariidae, a exemplo de Neoplecostominae e Hypoptopomatinae. No entanto, Loricariinae e Hypostominae demonstram extensivos rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais, com algumas tendências de diversificação bem definidas nos grupos. Neste estudo, as espécies *Otothyropsis biamnicus* e *Isbrueckerichthys cf. calvus* mantiveram a condição de 54 cromossomos, porém uma inversão paracêntrica adjacente aos rDNAs foi diagnosticada em *Isbrueckerichthys cf. calvus* com a manutenção dos ITS. Esta espécie não apresentou diferenças citogenéticas em relação a espécie *Isbrueckerichthys duseni*. Foram observados também dois cariomorfos para *Rineloricaria pentamaculata* (cariomorfo A - $2n = 54$ cromossomos e o cariomorfo B - $2n = 56$ cromossomos). A presença de ITS na região centromérica de um grande par metacêntrico exclusivo do cariomorfo A comprova o evento de fusão cêntrica na origem desta variação. Em *Ancistrus sp.*, $2n = 50$ cromossomos e regiões ITS também foram diagnosticadas comprovando a hipóteses que os peixes da tribo Ancistrinii tendem a sofrer redução numérica a partir do $2n = 54$ cromossomos por fusão cêntrica. Ainda, o mapeamento do retroelemento

denominado Rex 3 não foi associado aos rearranjos cromossômicos identificados neste estudo. Estes resultados demonstram uma grande proximidade citogenética entre as espécies *I. duseni* e *I. calvus*, sugerindo uma estreita relação filogenética ou um provável caso de sinonímia. Ainda, os dados citogenéticos para Ancistrinii e Hypostominii mostram uma clara dicotomia em relação ao número cromossômico, corroborando a manutenção de Ancistrinae ao nível de subfamília.

Palavras chave: Cascudos; citogenética; evolução cariotípica; filogenia; morfologia

Introdução

A ordem Siluriformes tem ampla distribuição mundial e conta aproximadamente com 3500 espécies divididas em 36 famílias (ESCHMEYER; FONG, 2013). Este grupo conhecido como bagres ou 'catfishes' é fortemente representado na América do Sul com 14 famílias e quase 70 % das espécies (MOYLE; CECH, 2000; RODÍLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005). Entre estas, seis famílias, Astroblepidae, Callichthyidae, Loricariidae, Nematogenyidae, Scoloplacidae e Trichomycteridae agrupam a superfamília Loricarioidea (SCHAEFER, 1990). Os peixes Loricariidae, conhecidos como cascudos ou 'armored catfishes' contam mais de 850 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2013) organizadas em seis subfamílias: Delturinae, Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae (REIS et al., 2006). Esta família sofreu intensas modificações sistemáticas nas últimas décadas. Entre as mais importantes, Ancistrinae foi rebaixada à tribo e inclusa em Hypostominae (ARMBRUSTER, 2004). Contudo, a monofilia de no mínimo duas subfamílias e duas tribos: Neoplecostominae e Hypoptopomatinae; Ancistrini e Hypostomini, respectivamente, foram rejeitadas por estudos moleculares (CRAMER et al., 2008; HARDMAN, 2005; MONTOYA-BURGOS et al., 1998, 2002).

Loricariidae é endêmica da região Neotropical e seus representantes ocupam quase todos os tipos de habitat aquáticos (SCHAEFER, 1990). A região de estudo, limítrofe entre as cabeceiras dos rios Tibagi e Ivaí também são adjacentes as bacias do rio Ribeira à leste e rio Iguaçu ao sul. Esta região esteve envolvida em movimentos tectônicos pretéritos e complexos sistemas de falhas no relevo proporcionaram captura de cabeceiras de rios e intercâmbio de faunas (ARTONI et al., 2009; RIBEIRO, 2006; VICARI et al., 2006, 2008 b).

Os estudos citogenéticos em Loricariidae demonstram uma enorme diversidade de números diploides, marcadores cromossômicos e genômicos (BLANCO et al., 2012,b; BUENO et al., 2012; FERREIRA et al., 2011 a,b; ZIEMNICZAK et al., 2012). A variação do número diploide nos representantes estudados da família é de $2n = 34$ em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2011) a $2n = 96$ em *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2005). No entanto, o $2n = 54$ cromossomos foi considerado basal na família (ARTONI; BERTOLLO, 2001), com tendências citogenéticas evolutivas bem definidas em cada subfamília, possibilitando inferências de agrupamentos (ALVES et al., 2005; BLANCO et al., 2012 a; ZIEMNICZAK et al., 2012). Deste modo, além do número diplóide, da pequena quantidade de heterocromatina quase sempre centromérica, a região organizadora de nucléolo (RON) simples em sintenia com o rDNA 5S foram consideradas características basais por estarem presentes em subfamílias conservadas de Loricariidae e no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Outros marcadores cromossômicos, entre eles os de unidades de DNA repetitivas *in tandem* ou dispersas tem sido utilizados na citogenética com interesse especial em estudos de estrutura e função cromossômica, evolução, identificação de rearranjos cromossômicos, cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (FERREIRA et al., 2011 a,b; KIDWELL, 2002; KIDWELL; LISCH, 1997; MACHADO et al., 2011; ROSA et al., 2012; SCHEMBERGER et al., 2011; VALENTE et al., 2011; VICARI et al., 2011). Nos peixes loricarídeos os DNAs repetitivos tem auxiliado na citotaxonomia e citossistemática (TRALDI et al., 2012; ZIEMNICZAK et al., 2012), na identificação dos extensivos rearranjos cromossômicos em alguns gêneros (BLANCO et al., 2012a; BUENO et al., 2012; MENDES-NETO et al., 2011; ROSA et al., 2012),

nos estudos de ocorrência de cromossomos B e sistemas de cromossomos sexuais (BLANCO et al., 2012 a,b) e na distribuição dos elementos retrotransponíveis pelos genomas (FERREIRA et al., 2011).

Desta forma, neste estudo foram utilizados de forma comparativa marcadores cromossômicos clássicos e de citogenética molecular entre algumas espécies de diferentes subfamílias de Loricariidae com o objetivo de estudar os eventos e classes de DNAs envolvidos nos rearranjos cromossômicos e na diferenciação cariotípica deste grupo de peixes Neotropical. Além disso, a literatura disponível em citogenética de Loricariidae foi utilizada para correlacioná-la à biogeografia e contrapor os dados cromossômicos aos filogenéticos morfológicos e moleculares.

Material e Métodos

Os exemplares da família Loricariidae foram coletados nos rios Charqueada, Imbaú-PR e Barreiro, Tibagi-PR, ambos afluentes do rio Tibagi; e rios Barra Grande, Prudentópolis-PR, rio dos Patos e Lageado, Ivaí-PR, afluentes do rio Ivaí. As populações de *Isbrueckerichthys* cf. *calvus*; *Otothyropsis biamnicus*; *Rineloricaria pentamaculata* e *Ancistrus* sp. foram submetidas à identificação do número diploide modal e realização dos procedimentos de citogenética molecular. Exemplares testemunho foram depositados no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia), da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica de “air drying”, descrita por Bertollo et al. (1978). Os procedimentos de manuseio de exemplares

coletados na natureza estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira (Protocolo CEUA: 07/2011). As regiões heterocromáticas foram evidenciadas pelo bandamento C, descrita por Sumner (1972). A Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi desenvolvida conforme Pinkel et al. (1986), utilizando sondas de rDNA 18S (HATANAKA; GALETTI Jr., 2004), rDNA 5S (MARTINS; GALETTI Jr., 1999), sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n obtida segundo Ijdo et al. (1991) e do retroelemento Rex 3 obtido a partir do DNA genômico de *Ancistrus* sp. pelo procedimento descrito por Volf et al. (1999). As sondas foram marcadas pela técnica de PCR, utilizando biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science). As reações de PCR com *primers* específicos para cada sequência foi realizada com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de digoxigenina 11- dUTP ou biotina 16 dUTP, 1 μM de cada primer e 2 U de *Taq* DNA polimerase). As sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e Rex 3 foram amplificadas de acordo com as seguintes condições: 5 min a 94 °C; 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 amplificação da sequência telomérica foram utilizadas duas condições de amplificação, a primeira é realizada com baixa estringência: 4 min a 94 °C; 12 ciclos de (1 min a 94 °C, 45 s a 52 °C e 1 min e 30 s 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). Todas as misturas de hibridação tiveram uma estringência de 77 % (1 μg de cada sonda, 50 % formamida deionizada, 10 % sulfato dextrano, 2 x SSC, 37 °C por 16 horas). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41. Para a captura das imagens foi utilizada a câmera CCD DP71 (Olympus) com auxílio do 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), acrocêntricos (a). Para confirmação da localização de cada sonda de DNA repetitivo cerca de 30 metáfases foram analisadas.

Resultados

Isbrueckerichthys cf. *calvus*

Isbrueckerichthys cf. *calvus* foi caracterizada com $2n = 54$ cromossomos, $NF = 108$ e fórmula cariotípica: $14 m + 28 sm + 12 st$ (Fig. 2A). A heterocromatina foi localizada em região centromérica de todos os pares cromossômicos e em blocos proximais e equidistantes nos pares 8, 9, 10, 11 e 12 (Fig. 2B). A dupla hibridação *in situ* das sondas de DNA ribossomal 5S e 18S apresentou sinais sintênicos no maior par submetacêntrico, com o 5S localizado praticamente em toda a porção intersticial do braço maior, adjacente ao 18S localizado na região subterminal do cromossomo (Fig. 3A). O mapeamento físico do retroelemento *Rex3* evidenciou sinais dispersos por todo o genoma e pequenos acúmulos em região centromérica e terminal de poucos cromossomos (Fig. 3B). A localização da sequência telomérica detectou todos os telômeros marcados além de ITS na região subterminal do maior par submetacêntrico, adjacente ao rDNA 18S (Fig. 3C).

Otothyropsis biamnicus

Otothyropsis biamnicus foi caracterizada com $2n = 54$, $NF = 108$ e fórmula cariotípica: $20 m + 18 sm + 16 st$ (Fig. 2C). Possui blocos heterocromáticos na região terminal do braço curto dos pares 2 e 15 e na região centromérica dos pares 23 e 27 (Fig. 2D). A hibridação com a sonda *Rex3* evidenciou sinais na maioria dos cromossomos, com pequenos acúmulos localizados principalmente nas regiões pericentroméricas e terminais (Fig. 4A). O mapeamento físico das sequências teloméricas não detectou nenhum ITS (Fig. 4B).

Rineloricaria pentamaculata

Foi analisada citogeneticamente *Rineloricaria pentamaculata* de duas localidades da bacia do rio Ivaí. A população do rio Barra Grande com $2n = 54$ cromossomos e foi denominada cariomorfo A enquanto a população do rio Lageado possui $2n = 56$ cromossomos (cariomorfo B).

- Cariomorfo A

Para a população do rio Barra Grande foi observado $2n = 54$, $NF = 84$ e fórmula cariotípica: $8 m + 22 sm + 24 a$ (Fig. 2E). A heterocromatina foi evidenciada em blocos na região centromérica dos pares 1, 2 e 16 e na região distal do braço curto dos pares 5, 6 e 9 (Fig. 2F). A dupla FISH com as sondas de DNA ribossomal evidenciou múltiplos sítios de rDNA 5S, presentes em quatro pares do complemento, enquanto a maior família de rDNA 45S foi localizada no braço curto do maior par submetacêntrico

(Fig. 5A). O mapeamento físico com a sequência do retroelemento *Rex3* apresentou marcações dispersas pelos cromossomos, com pequenos e poucos blocos localizados nas porções intersticiais de alguns cromossomos (Fig. 5B). Ainda, a hibridação com a sequência telomérica evidenciou regiões de ITS na região centromérica do maior par de cromossomos metacêntricos (Fig. 5C).

- Cariomorfo B

A população do rio Lageado foi caracterizada com $2n = 56$, $NF = 66$ e fórmula cariotípica: $4m + 6 sm + 2 st + 44 a$ (Fig. 2G). A heterocromatina foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos com blocos mais evidentes na região centromérica dos pares 6, 9 e 22; e na região terminal de um cromossomo do par 2 (Fig. 2H). A dupla FISH com as sondas de DNA ribossomal também evidenciou múltiplos sítios de rDNA 5S, enquanto o rDNA 18S foi localizado no braço menor do maior par submetacêntrico (Fig. 6A). A detecção das sequências do retroelemento *Rex3* apresentou um padrão de distribuição disperso semelhante ao encontrado no cariomorfo A, com pequenos e poucos acúmulos localizados em alguns cromossomos (Fig. 6B). No cariomorfo B a hibridação com a sequência $(TTAGGG)_n$ evidenciou apenas marcações teloméricas (Fig. 6C).

Ancistrus sp.

Ancistrus sp. foi caracterizada com $2n = 50$, $NF = 88$ e fórmula cariotípica: $20 m + 12 sm + 6 st + 12 a$ (Fig. 2I). Foram observados pequenos blocos heterocromáticos na região centromérica da maioria dos cromossomos, além do braço curto do par 12 ser totalmente heterocromático (Fig. 2J). A dupla hibridação com sondas de DNA ribossomal 5S e 18S apresentou sinais sintênicos no par submetacêntrico 12, com o 5S na porção intersticial do braço curto, adjacente ao 18S localizado na região subterminal (Fig. 7A). O mapeamento físico do retroelemento *Rex3* evidenciou pequenos acúmulos distribuídos em quase todos os cromossomos (Fig. 7B). A FISH da sequência telomérica detectou regiões de ITS em um grande par submetacêntrico (Fig. 7C).

Discussão

Cerca de 130 espécies de Loricariidae foram estudadas citogeneticamente com dados mais representativos nas subfamílias Hypostominae, Loricariinae, Hypoptopomatinae e Neoplescotominae; enquanto que entre Delturinae e Lithogeninae os estudos cromossômicos são praticamente inexistentes (ZIEMNICZAK et al., 2012). Os dados cromossômicos mostram que a maior parte dos Neoplescotominae e Hypoptopomatinae reúnem características consideradas primitivas para a família, uma vez que estas são compartilhadas pelo grupo irmão Trichomycteridae, a exemplo do $2n = 54$ cromossomos propostos por Artoni e Bertollo (2001), pouca heterocromatina de localização centromérica e rDNA 45s e 5s sintênicos em um único par cromossômico

(ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre as quatro espécies analisadas neste estudo, duas possuem $2n = 54$ cromossomos, os quais são considerados plesiomórficos para o grupo (*Isbrueckerichthys* cf. *calvus* – Neoplecostominae e *Otothyropsis biamnicus* – Hypoptopomatinae). Em Neoplecostominae e Hypoptopomatinae os caracteres cromossômicos se sobrepõem entre as subfamílias (ZIEMNICZAK et al., 2012; presente estudo), tornando difícil a separação os clados de forma consistente. Embora pouco resolutivo, estes dados citogenéticos corroboram estudos de filogenia molecular e morfológica que apontam discordâncias na monofilia destas duas subfamílias (CRAMER et al., 2011).

Por sua vez, as duas populações de *Rineloricaria pentamaculata* evidenciaram número diploide e fórmula cariotípica diferentes, sendo $2n = 54$ cromossomos (8 m + 22 sm + 24 a) para o cariomorfo A e $2n = 56$ cromossomos (4m + 6 sm + 2 st + 44 a) para o cariomorfo B. O gênero *Rineloricaria* pertencente a subfamília Loricariinae, agrupa representantes com ampla variação no número diploide, $2n = 36$ em *Rineloricaria latirostris* a $2n = 70$ em *Rineloricaria* sp. e *R. lima*, bem como uma considerável variação cromossômica inter e intra-populacional (ALVES et al., 2003; KAVALCO et al., 2005; ROSA et al., 2012). Duas tendências de diferenciação cariotípica foram observadas em Loricariinae, sendo a primeira: redução do $2n$ por meio de fusões cêntricas e a segunda: o aumento do $2n$ atribuída a fissões Robertsonianas (ALVES et al, 2003; KAVALCO et al, 2005). Errero-Porto, Portela-Castro e Martins-Santos (2010, 2011) encontraram em *R. pentamaculata* do rio Paraná um número diploide constante com 56 cromossomos, mas duas fórmulas cariotípicas diferentes, além da presença de cromossomos B.

No presente estudo, dois cariomorfos foram encontrados para *R. pentamaculada*. O cariomorfo A com $2n = 54$ cromossomos, no entanto, a ocorrência de sítios ITS no maior par metacêntrico revela que este par cromossômico foi oriundo de fusão cêntrica. O cariomorfo B, por sua vez, com $2n = 56$ cromossomos sem evidências da ocorrência de fusão cêntrica corroborando o $2n = 56$ cromossomos para outras populações da espécie (ERRERO-PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2010, 2011; MAIA et al., 2010). Embora pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ivaí, as populações de *R. pentamaculata* deste trabalho são isoladas reprodutivamente por enormes cachoeiras na região da Escarpa da Esperança, dicisão entre o 2º e 3º planaltos paranaense, em Prudentópolis e Ivaí – PR, mantendo o isolamento do fluxo gênico entre os cariomorfos A e B.

Entre os Loricariinae a ampla variação do $2n$ observada e a presença de ITS em espécies com $2n = 54$ cromossomos evidencia que algumas espécies ou gêneros têm números diploides enraizando seus clados muito divergentes do $2n$ primitivo de Loricariidae. *Rineloricaria lima*, por exemplo, é caracterizada por um polimorfismo numérico de 70 – 66 cromossomos com indicativos de fusão cêntrica evidenciadas por marcações ITS e rDNA 5S (ROSA et al., 2012). Para o gênero filogeneticamente próximo *Harttia*, Blanco et al. (2012a) evidenciaram uma redução numérica de 58 até 52/53 cromossomos e ITS evidenciando que realmente ocorreram fusões cêtricas em espécies de Loricariinae com $2n$ menor do que 54 cromossomos. Da mesma forma, o $2n = 54$ cromossomos de *R. pentamaculata* do cariomorfo A do presente estudo pode ser considerado um carácter homoplásico.

A antiga subfamília Ancistrinae foi incluída entre os Hypostominae por Armbruster (2004), sendo que esta última ficou constituída por cinco tribos:

Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. As tribos mais especiosas desta subfamília, Hypostomini e Ancistrini, demonstram características cromossômicas divergentes, sustentando a monofilia dos clados. Poucos são os Hypostomini que apresentam $2n = 52$ ou 54 cromossomos, e a tendência evolutiva desta subfamília é o aumento do número diploide por fissões Robertsonianas (ARTONI; BERTOLLO, 2001), até o 84 cromossomos evidenciado para *Hypostomus* sp. 2 (CEREALI et al., 2008), além de variações na fórmula cromossômica por inversões e duplicações (BUENO et al., 2012). Por sua vez, entre os Ancistrini apenas *Ancistrus claro* possui $2n = 54$ cromossomos e a maioria dos representantes desta tribo evidenciam $2n$ entre 52 e 34 cromossomos oriundos de fusão centríca (MARIOTTO et al., 2011). A espécie do presente trabalho, *Ancistrus* sp., possui $2n = 50$ cromossomos e ITS na região centromérica de um par sm grande, comprovando sua origem por fusão centríca na diversificação cariotípica do gênero.

Estes dados citogenéticos aliados aos estudos de revisão da diversificação cariotípica em Hypostomini (BUENO et al., 2012 a,b) e Ancistrini (MARIOTTO et al., 2011) demonstram que estes grupos reúnem características cromossômicas divergentes, corroborando os estudos moleculares (MONTROYA-BURGOS et al., 1997) que agrupam os Ancistrinae ao nível de subfamília.

Outro marcador altamente variável em Loricariidae é a distribuição e quantidade de heterocromatina constitutiva. Para este parâmetro, a comparação cariotípica entre as espécies é prejudicada devido a dificuldade de se estabelecer homeologias cromossômicas. No presente estudo, todas as espécies, a exceção de *Ancistrus* sp. que evidenciou um acúmulo no braço curto do par 12, apresentaram pequena quantidade de heterocromatina, caracter este associado a uma provável condição

primitiva de cada umas das subfamílias estudadas. Em gêneros mais derivados de Loricariidae, como *Hypostomus* e *Ancistrus*, são várias as espécies apresentando abundância de bandas C-positivas no cariótipo, inclusive caracterizadas por classes distintas de heterocromatinas (ARTONI; BERTOLLO, 1999; MARIOTTO et al., 2009, 2011). Por sua vez, a espécie *Isbrueckerichthys* cf. *calvus* possui pequenos blocos proximais e equidistantes semelhantes a distribuição heterocromática observada em *I. duseni* do rio Ribeira (ZIEMNICZAK et al., 2012), além do 2n, fórmula cariotípica e a localização dos rDNAs são idênticos para àquela espécie. Na morfologia o comprimento do espinho da peitoral separa *I. duseni* de *I. calvus* e *Isbrueckerichthys saxicola* (JEREP et al., 2006). Ainda, *I. calvus* possui plaquetas abdominais diminutas, no máximo seis odontódios; área nua sob as três primeiras placas da linha lateral; cleitro não exposto, ou quando expostos, limitado apenas a porção superior da abertura opercular; a superfície exposta da supraoccipital é fortemente convexa, com um espaço sem odontódeos no centro (JEREP et al., 2006). A alta similaridade citogenética de *I. duseni* com *I. calvus* sugere uma alta proximidade filogenética entre os taxa, ou devido as fracas diferenças morfológicas, pode se tratar de um caso de sinonímia. A sinonímia pode ser justificada devido as bacias hidrográficas do Ribeira e Tibagi apresentarem eventos pretéritos de captura de cabeceiras e intercâmbio de faunas (ARTONI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2006)

A detecção dos sítios de DNA ribossomal 5S e 18S sintênicos em *Isbrueckerichthys* cf. *calvus*, além de idêntica para *I. duseni* do rio Ribeira, apresenta posição invertida em relação a outros Loricariidae basais e ao grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012). O posicionamento em região invertida dos rDNA 5S (intersticial) e rDNA 18S (subterminal) foi comprovada neste estudo pela

detecção de ITS adjacente aos rDNAs. Entre os cariomorfos de *Rineloricaria* estudados, a condição sintênica dos rDNAs não foi observada, com rDNA 18S localizado no braço curto do maior par sm, situação já observada em outras populações da espécie (ERRERO-PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2010, 2011; MAIA et al., 2010). Por sua vez, foram evidenciados múltiplos sítios de rDNA 5S, (quatro pares em *R. pentamaculata* – cariomorfo A, e cinco no cariomorfo B). Tradicionalmente, sítios de rDNA 5S e seus pseudogenes são conhecidos pela ampla movimentação nos genomas de peixes (MARTINS et al., 2006; SILVA et al., 2011). Além disso, com os resultados observados em *Rineloricaria lima*, Rosa et al. (2012) demonstraram que este DNA repetitivo gênico propiciou pontos de fusão cromossômica gerando um polimorfismo de diminuição do número diploide. A espécie *Ancistrus* sp. possui sítios sintênicos de rDNA 5S e 18S como provável manutenção da condição primitiva no gênero. Além do par cromossômico com rDNAs sintênico, esta espécie apresentou outros oito sítios de rDNA 5S, demonstrando que o acúmulo e distribuição do rDNA 5S tem auxiliado na diversificação cariotípica de *Ancistrus*, situação também verificada em outras espécies do gênero (MARIOTTO et al., 2011).

Em peixes, os elementos repetitivos dispersos com melhor caracterização pertencem ao grupo *Rex* – retroelementos de *Xiphophorus* - (elementos retrotransponíveis – RTEs – sem longas repetições terminais - não-LTRs - caracterizados pela primeira vez no genoma do peixe *Xiphophorus*). Membros da família *Rex* são encontrados abundantemente com diferentes padrões de organização, mostrando-se ativos durante a evolução de diferentes linhagens de peixes (FERREIRA et al., 2011a; MALIK et al., 1999; VOLFF et al., 1999, 2000, 2001a, 2001b). Geralmente, os retroelementos *Rex* encontram-se acumulados em regiões de

heterocromatina (BOUNEAU et al., 2003; DA SILVA et al., 2002; FISHER et al., 2004; OZOUF-COSTAZ et al., 2004). Porém, em Loricariidae, a distribuição dessas sequências são observadas também em porções eucromáticas de alguns Hypoptopomatinae (FERREIRA et al., 2011b) e com um intenso acúmulo por todo o genoma em espécies de *Harttia* – Loricariinae e *Hypostomus* – Hypostominae (BLANCO, 2012; TRALDI, 2012, respectivamente).

Os pequenos acúmulos dispersos do retroelemento *Rex3* encontrados nas quatro espécies analisadas neste estudo apresentam distribuição similar àqueles encontrados em espécies da subfamília Hypoptopomatinae: *Hisonotus leucofrenatus*, *Pseudotocinclus tietensis* e *Parotocinclus maculicauda* (Steindachner, 1877) (FERREIRA et al., 2011b). Os RTEs já foram considerados *hot spots* para rearranjos cromossômicos (KIDWELL; LISCH, 1997; KIDWELL, 2002; VALENTE et al., 2011). Contudo, neste estudo não há evidência que a sequência *Rex 3* possa estar relacionada aos rearranjos cromossômicos evidenciados em *Isbrueckerichthys cf. calvus.*, *Rineloricaria pentamaculata* e *Ancistrus* sp., como já proposto para outras espécies de peixes neotropicais.

Os peixes Loricariidae apresentam extensivos rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais, os quais foram corroborados neste estudo pela localização física dos DNAs repetitivos. Foi observado que as espécies das subfamílias Neoplecostominae e Hypoptopomatinae tendem a manter o $2n = 54$ cromossomos, com sobreposição de caracteres cromossômicos, corroborando os dados de filogenias morfológicas e moleculares que discordam da monofilia destas subfamílias. Já os Loricariinae são caracterizados por ampla diversificação cromossômica, com números diploides enraizando tribos ou gêneros muito divergentes do $2n = 54$ cromossomos

considerado plesiomórfico para Loricariidae. Por fim, a problemática sobre a monofilia de Ancistrinae ainda não está resolvida, pois apesar de alguns estudos moleculares indicarem que Ancistrinae é polifilético outros estudos sugerem sua monofilia, até o momento os dados citogenéticos apontam para a manutenção de Ancistrinae ao nível de subfamília.

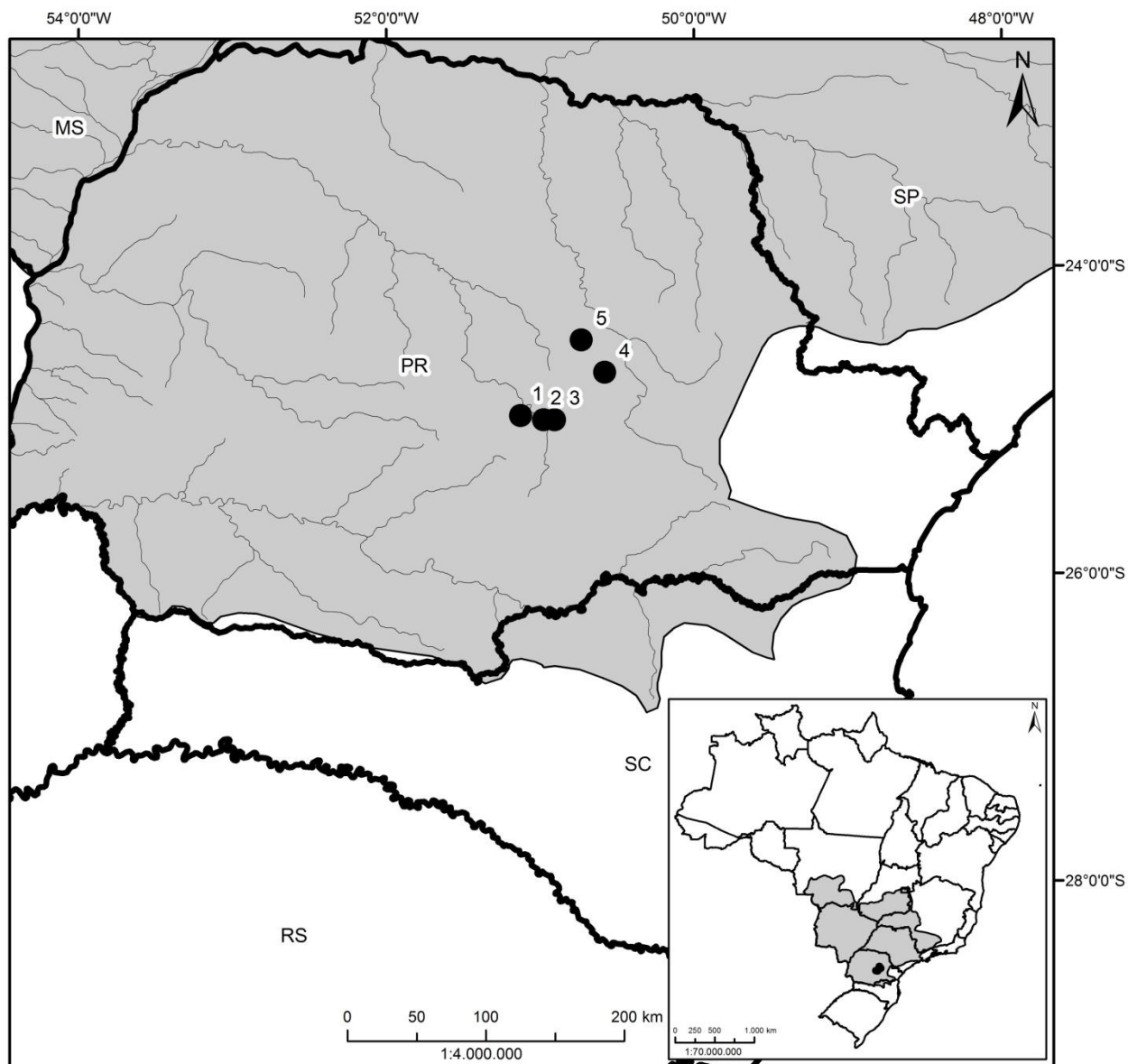
Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas deste artigo estão reunidas ao final da dissertação.

Figura 1. Mapa hidrográfico do estado do Paraná, em destaque a região de divisão das bacias do rio Tibagi e Ivaí na região dos Campos Gerais. Em (1) Rio Barra Grande – Prudentópolis; (2) Rio Lageado – Ivaí; (3) Rio dos Patos – Ivaí; (4) Rio Barreiro – Tibagi e (5) Rio Charqueada – Imbaú. (Fonte: <http://www.meioambiente.pr.gov.br/> - Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - SEMA).



Legenda

- Estados (fonte: IBGE)
- Bacia do Paraná
- Pontos de coleta

Figura 2. Cariótipos de *Isbrueckerichtys cf. calvus*, *Otothyropsis biamnicus*, *Rineloricaria pentamaculata*

– Cariomorfo A, *R. pentamaculata* – Cariomorfo B e *Ancistrus* sp. em coloração convencional por Giemsa (A, C, E, G, I) e Bandamento C (B, D, F, H, J) respectivamente. Barra = 10 µm.

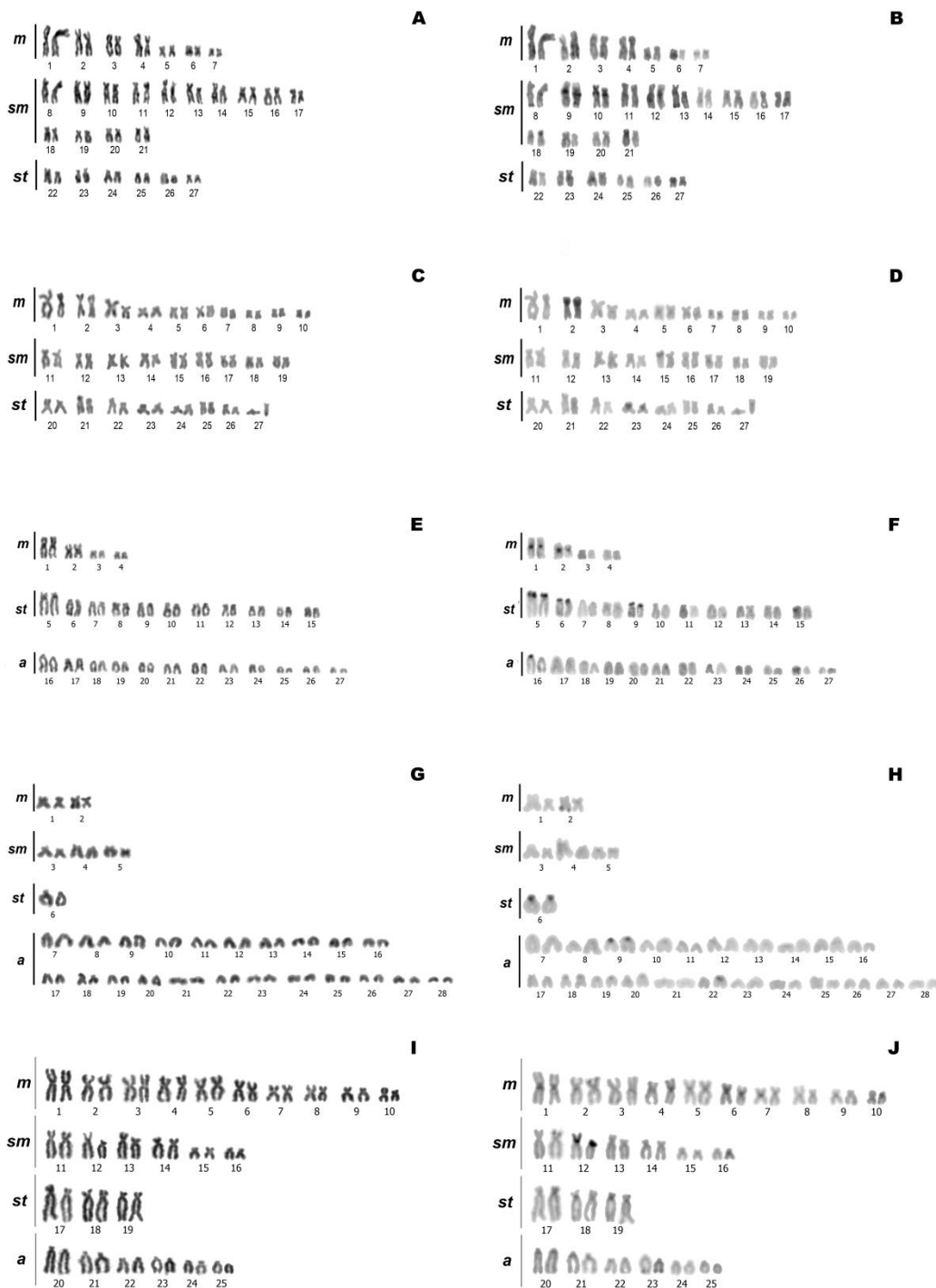


Figura 3. Metáfases mitóticas de *Isbrueckerichthys cf. calvus* submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Destaque para a presença de ITS no maior par submetacêntrico (setas). Barra = 10 μ m.

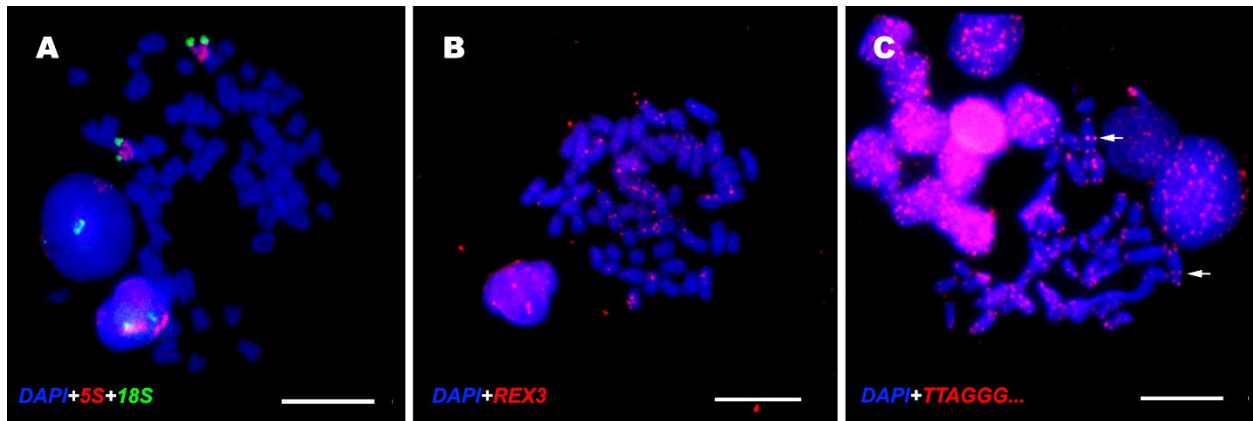


Figura 4. Metáfases mitóticas de *Otothyropsis biamnicus* submetidas a FISH com dois diferentes marcadores: (A) retroelemento Rex 3 e (B) sequência telomérica. Barra = 10 μ m.

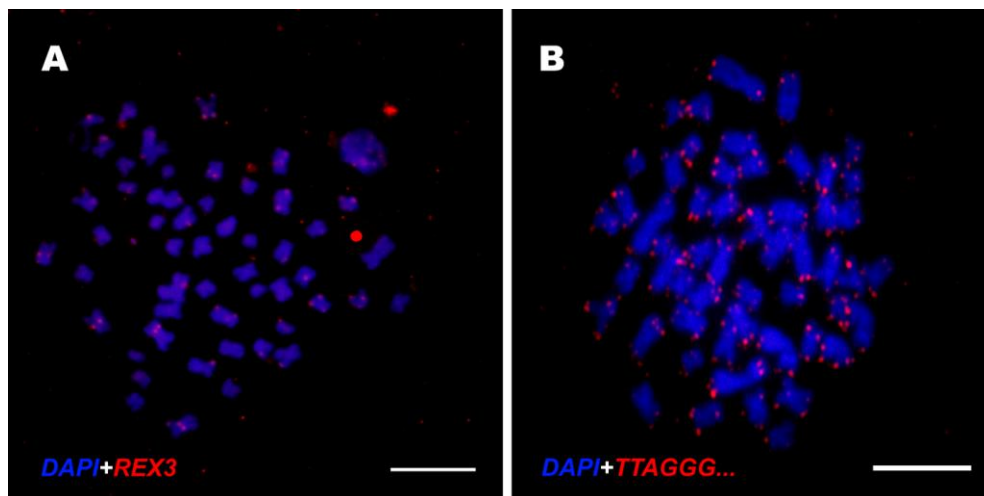


Figura 5. Metáfases mitóticas de *Rineloricaria pentamaculata* – Cariomorfo A, submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Destaque para a presença de ITS no maior par metacêntrico (setas). Barra = 10 µm.

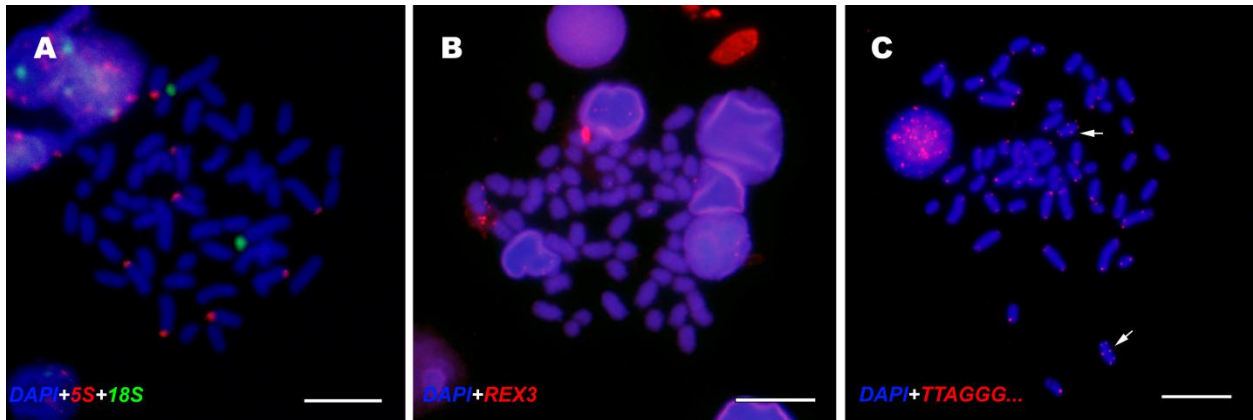


Figura 6. Metáfases mitóticas de *Rineloricaria pentamaculata* – Cariomorfo B, submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Barra = 10 μm .

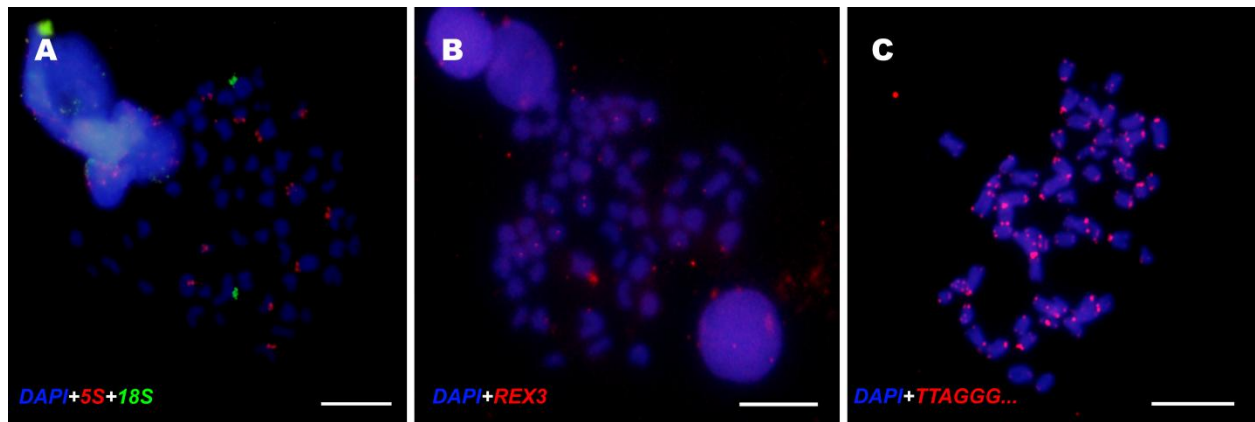
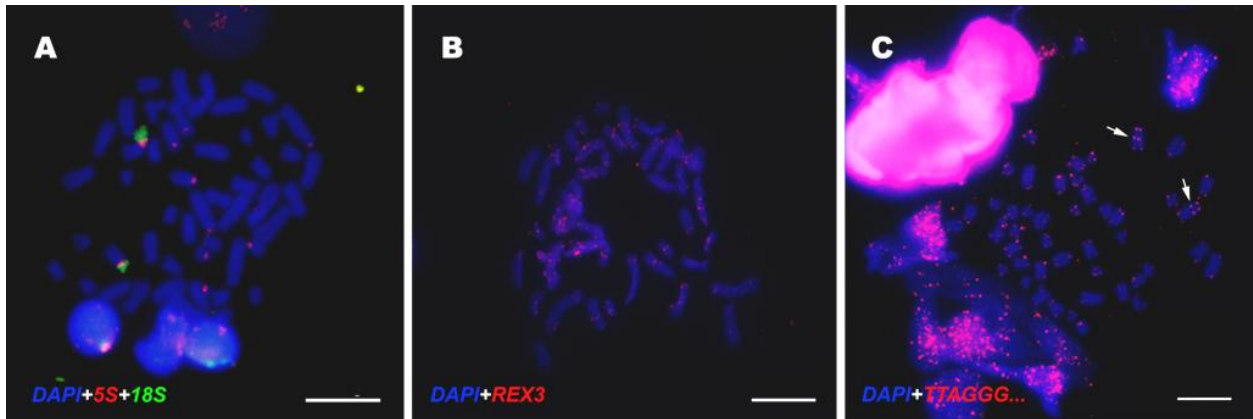


Figura 7. Metáfases mitóticas de *Ancistrus* sp. submetidas a FISH com três diferentes marcadores: (A) rDNAs, (B) retroelemento Rex 3 e (C) sequência telomérica. Destaque para a presença de ITS no par submetacêntrico (setas). Barra = 10 μ m.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As subfamílias Neoplecostominae e Hypoptopomatinae tendem a manter o $2n = 54$ cromossomos considerados plesiomórficos para Loricariidae. Ainda, estas subfamílias sobrepõem características cromossômicas e corroboram estudos de filogenia morfológica e molecular que discordam da monofilia destes clados.
- Este estudo comprovou a ocorrência de inversão paracêntrica adjacente aos rDNAs por meio da localização de ITS em *Isbrueckerichthys* cf. *calvus*.
- Entre os cariomorfos de *Rineloricaria pentamaculata* observados, a localização de ITS centromérico em um grande par metacêntrico comprova o evento de fusão e redução numérica para 54 cromossomos no cariomorfo A, que neste caso, é um carácter homoplásico para a espécie.
- A subfamília Loricariinae apresenta números diploides enraizando seus clados divergentes do $2n = 54$ cromossomos considerado plesiomórfico para Loricariidae.
- A localização de ITS em *Ancistrus* sp. corrobora a hipótese que os peixes da tribo Ancistrinii sofrem redução do $2n = 54$ cromossomos por fusão cêntrica.
- Os dados citogenéticos corroboram algumas filogenias morfológicas e moleculares e sugerem a manutenção de Ancistrinae.

- O retroelemento *Rex 3* não pode ser associado aos rearranjos cromossômicos identificados neste estudo, como já havia sido proposto para outros grupos de peixes Neotropicais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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; 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*. **Cytogenetic and Cell Genetics**. v.63, p. 215-220, 1993.

- 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; 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; 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. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). **Hereditas**. v.134, p.201–210, 2001.
- 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.
- BASKIN J.N. **Structure and relationships of the Trichomycteridae**. Unpublished DPhil Thesis, University of New York City, 1973.
- BERRA, T. M. Freshwater fish distribution. **Academic Press**. London, 2001.
- 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.

- BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI JR, P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**. v28, p.153–159, 1986.
- BIFI, A. G; PAVANELLI C. S; ZAWADZKI, C. H. Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguaçú basin, Paraná State, Brazil. **Zootaxa**. v. 2275, p. 41-59, 2009.
- BITENCOURT, J.A.; AFFONSO, P.R.A.M.; GIULIANO-CAETANO, L.; CARNEIRO, P.L.S.; DIAS, A.L. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus aff. unae* from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.11(2), p. 933-943, 2012.
- BLANCO, D.R. **Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo**. Tese de Doutorado. UFSCar, São Carlos, Brasil, 2012.
- BLANCO, D.R; VICARI, M.R; LUI, R.L; TRALDI, J.B; BERTOLLO, L.A; MOREIRA-FILHO, O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX₁XY₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 2012. DOI: 10.1007/s11160-012-9283-5
- BÖHNE A., BRUNET F., GALIANA-ARNOUX D., SCHULTHEIS C., VOLFF J.N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**. v 16, p. 203-215. 2008.

- BOUNEAU, L; FISHER, C; OZOUF-COSTAZ, C; FROSCHAUER, A; JAILLON, O; COUTANCEAU, J.P; KÖRTING, C; WEISSENBACH, J; BERNOT, A; VOLFF, J.N. An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**. v.13, p. 1686-1695, 2003.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y. e ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASF. p. 115, 1988.
- BUENO, V; VENERE, P.C; ZAWADZKI, C.H; MARGARIDO, V.P. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 2012. DOI 10.1007/s11160-012-9280-8.
- BUENO, V; ZAWADZKI, C.H; MARGARIDO, V.P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v. 22, p. 241-250, 2012.
- CARVALHO, T. P; LEHMANN; REIS, R. E.. *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. 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. Mazzoni, C.R.S.F. Bizerril, P.R. Peres-Neto, eds.). **Oecologia Brasiliensis**, v.6, p. 139-155, 1999.

CEREALI, S.S; POMINI, E; ROSA, R; ZAWADZKI, C.H; FROENLICH, O; GILUIANO-CAETANO, L. Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetic and Molecular Research**. v. 7(3), p. 583-591, 2008.

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

CHAVES, R; SANTOS, S; GUEDES-PINTO, H. Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by in situ restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**. v.121, p.315-325, 2004.

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.

CRAMER, C.A; LIEDKE, A.M.R; BONATTO, S.L; REIS, R.E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes:

Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences.

Bulletin of Fish Biology. v.9, p. 51–59, 2008.

CROLLIUS, H.R; JAILLON, O; DASILVA, C; OZOUF-COSTAZ, C; FIZAMES, C; FISCHER, C; BOUNEAU, L; BILLAULT, A; QUETIER, F; SAURIN, W; BERNOT, A; WEISSENBACH, J. Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research.** v.10, p. 939-949, 2000.

DA GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. **Eduem**, 2007.

DA SILVA, C; HADJI, H; OZOUF-COSTAZ, C; NICAUD, S; JAILLON, O; WEISSENBACH, J; CROLLIUS, H.R. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v.99, p. 1636-1641, 2002.

DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. p. 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.

DE PINNA, M.C.C. A new subfamily of Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes), lower loricarioid relationships and a discussion on the impact of additional taxa for phylogenetic analysis. **Zoological Journal of the Linnean Society.** v.106, p. 175–229, 1992.

- 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.
- ERRERO-PORTO, F; PORTELA-CASTRO, A.L.B; MARTINS-SANTOS, I.C. Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Parana River basin. **Genetics and Molecular Research**. v.9(3), p. 1654–1659, 2010.
- ESCHMEYER, W.N; FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species>ByFamily.asp>, 2013.
- 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.
- FERREIRA, D.C; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. A new dispersed element in the genome of the genome of the catfish *Hisonatus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae). **Mobile Genetic Elements**. v.1-2, p. 103-106, 2011b.
- FERREIRA, D.C; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. v.132(1-2), p. 64-70, 2011a.
- FISHER, C; BOUNEAU, L; COUTENCEAU, J.P; WEISSENBACH, J; VOLLF, J.N; OZOUF-COSTAZ, C. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**. v.336, p. 175-83, 2004.

- FISCH-MULLER, S; REIS, R. E; KULLANDER, S. O; FERRARIS JR, C. J. Subfamily Ancistrinae. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre, EDIPUCRS. p. 373-400, 2003.
- GHAZZI, M.S. Nove espécies novas do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Uruguai, do Sul do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia.** 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.
- GOODIER, J.L; DAVIDSON, W.S. Characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. **Journal of Molecular Evolution.** v.46, p. 245-255, 1998.
- GOSLINE, W. A. Contributions to the classification of the loricariid catfishes. **Arquivos do Museu Nacional.** v.41, p.79- 134, 1947.
- GROSS, M.C; SCHENEIDER, G.H; VALENTE, G.T; PORTO, J.I.R; MARTINS, C; FELDBERG, E. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. **Cytogenetic and Genome Research.** v.127, p. 43-53, 2009.
- HADJIOLOV, A.A. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. New York. **Springer-Verlag.** 1985.

- HARDMAN, M. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.37, p. 700–720, 2005.
- HASHIMOTO, D.T; MENDONÇA, F.F; SENHORINI, J.A; BORTOLOZZI, J; OLIVEIRA, C; FORESTI, F; PORTO-FORESTI, F. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**. v.298, p. 346-349, 2010.
- 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.
- HATANAKA, T; HENRIQUE-SILVA, F; GALETTI JR., P.M. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetic and Genome Research**. v.98, p. 308-310, 2002.
- IJDO, J.W; WELLS, R.A; BALDINI, A; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 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.
- 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.

- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. Heterochromatin. Cambridge, **Cambridge University Press**. 1988.
- 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**. 75(2):408-21,, 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.
- KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. v.115, p.49-63, 2002.
- KIDWELL, M.G.; LISCH, D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Science**. v.94, p.7704-7711, 1997.
- LANGANI, F; CASTRO, R. M. C; OYAKAWA, O. T; SHIBATTA, O. A; PAVANELLI, C. S; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, 7(3), p.1-17, 2007.

- 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.
- LONG, E.O; DAWID, I.D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry.** v.49, p. 727-764, 1980.
- MAACK, R. Os sistemas hidrográficos do Estado do Paraná. **Geografia física do Estado do Paraná.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1981.
- MACHADO, T.C; PANSONATO-ALVES, J.C; PUCCI, M.B; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; OLIVEIRA, C; FORESTI, F; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O; ARTONI, R.F; VICARI, M.R. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics.** v.12, p. 65, 2011.
- 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). **Ichthyological Research.** v.57, p. 209–213, 2010.
- MALIK, H.S.; BURKE, W.D.; EICKBUSH, T.H. The age and evolution of Non-LTR retrotransposable elements. **Molecular Biology and Evolution** v.16, p.793-805, 1999.

- 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; VICARI, M.R; ARTONI, R.F; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**. v.5, p. 289-300, 2011.
- 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 Research**. v.7, p.363-367, 1999.
- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B. G. Fish Cytogenetics. New Hampshire. **Kapoor Science Publisher**. p.421-453, 2007.
- 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.
- MAXON, R; COHN, R; KEDES, L. Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**. v.17, p. 239-277, 1983.

- MAZZUCHELLI, J; MARTINS, M. Genomic organization of repetitive DNAs in cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**. v.136, p. 461-469, 2009.
- 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. **Biodiversity in Brazil** (C.E.M. Bicudo; N.A. Menezes, eds.). CNPq, São Paulo, p. 289-295, 1996.
- 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.
- MIRADA-RIBEIRO, P. Peixes do Ribeira, resultado da excursão do Sr. Ricardo Kone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Komos**. v.5, p. 1-5, 1908.
- MONTOYA-BURGOS, JI; MULLER, S; WEBER, C; PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships between Hypostominae and Ancistrinae (Siluroidei: Loricariidae): first results from mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences. **Revue Suisse de Zoologie**. v.104, p.185–198, 1997.
- MONTOYA-BURGOS, J.I; MULLER, S; WEBER, C; PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 363–374, 1998.
- MOYLE, P.B; CECH Jr.,J.J. Fishes: An Introduction to Ichthyology. **Prentice-Hall**. 2000.

- NELSON, J. S. Fishes of the world. **John Wiley e Sons, Inc.**, New York, USA. p.162-170, 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.
- OZOUF-COSTAZ, C; BRANDT, J; KÖRTING, C; PISANO, E; BONILLO, C. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. **Antarctic Science.** v.16, p. 51-57, 2004.
- PARISE-MALTEMPI, P; MARTINS, C; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research.** v.116, p. 218-223, 2007.
- 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.
- PÉREZ, J; MÓRAN, P; GARCÍA-VÁSQUEZ, E. Physical mapping of three minisatellite sequences in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. **Animal Genetics.** v.30, p. 371-374, 1999.
- 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.
- PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Molecular Biology and Evolution**. v.19, p. 1329-1340, 2002.
- PONS, J; GILLESPIE, R.G. Common origin of the satellite DNAs of Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: Evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**. v.313, p. 169-177, 2003.
- POUGH, F.H; HEISER, J.B; JANIS, C.M. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.
- RAIO, C. B. ; BENNEMANN, S.T. A ictiofauna da bacia do rio Tibagi e o projeto de construção da UHE Mauá, Paraná, Brasil. **Semina**. v. 31, p. 15-20, 2010.
- 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*. **Zoological Journal of the Linnean Society**. v.147, p. 277–299, 2006.
- RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**. v. 4, n. 2, p. 225-246, 2006.

- RODILES-HERNÁNDEZ, R. D. A; HENDRICKSON, J. G; LUNDBERG; HUMPHRIES, J.M. *Lacantunia enigmatica* (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically puzzling freshwater fish from Mesoamerica. **Zootaxa**. v.1000, p.1–24, 2005.
- 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.
- ROSA, K.O; ZIEMNICZAK, K; BARROS, A.V; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; CESTARI, M.M; ARTONI, R.F; VICARI, M.R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v.22(3), p. 739-749, 2012.
- RUBERT, M; ZAWADZKI, H. C; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. v.6(1), p.93-100, 2008.
- SALLUN, A. E. M; SUGUIO, K; STEVAUX, J. C. Proposição formal do Alogruppo Alto Rio Paraná (SP, PR e MS). **Geologia USP, Série Científica**. p.49-70, 2007

- SARMENTO-SOARES, L. M; INGENITO, L. F. S. Ancistrinae.. In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Orgs.). **Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, p. 98-102, 2007.
- SCHAEFER S.A; LAUDER G.V. Historical transformation of functional design: evolutionary morphology of feeding mechanisms in loricarioid catfishes. **Systematic Zoology**. v.35, p. 489–508, 1986.
- SCHAEFER, S. A. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). **Contributions in Science**. v.394, p. 1-31, 1987.
- SCHAEFER, S.A. Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**. v.142, p. 167–210, 1990.
- 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 ZMS, Lucena CAS. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 375–400, 1998.
- SCHAEFER, S.A. The neotropical cascudinhos: systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**. v.148, p.1–120,1997.
- SCHEMBERGER, M.O; BELLAFRONTE, E; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; SCHULLI, G.S; ARTONI, R.F; MOREIRA-FILHO, O; VICARI, M.R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. v.139, p.1499-1508, 2011.

- SCHWARTZ, F.J; MADDOCK, M.B. Cytogenetics of the elasmobranchs: genome evolution and phylogenetic implications. **Marine & Freshwater Research**. v.53,p.491-502, 2002.
- 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.
- 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. **Chomosome**. v.107, p.136-140, 1998.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v.75, p.304-306, 1972.
- TEIXEIRA, W.G; FERREIRA, I.A; CABRAL-DE-MELLO, D.C; MAZZUCHELLI, J; VALENTE, G.T; PINHAL, D; POLETTO, A.B; VENERE, P.C; MARTINS, C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**. v.125, p. 224-234, 2009.
- TEUGELS, G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. **Aquatic Living Resources**. v. 9, p.9-34, 1996.
- TRALDI, J. B. **Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva**

do genoma para a diversidade cromossômica do grupo. Dissertação de Mestrado. UFSCar, São Carlos, Brasil, 2012.

TRALDI, J. B; VICARI, M.R; BLANCO, D.R; MARTINEZ, J.F; ARTONI, R.F; MOREIRA-FILHO, O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. **Comparative Cytogenetics.** v.6(2), p. 115-125, 2012.

UGARKOVIC, D; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO Journal.** v.21, p. 5955-5959, 2002.

VALENTE, G.T; MAZZUCHELI, J; FERREIRA, I.A; POLETO, A.B; FANTINATTI, B.E.A; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 e Rex6 among Cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and Genome Research.** v.33, p. 34-42, 2011.

VALENTE, G.T; SCHNEIDER, C.H; GROSS, M.C; FELDBERG, E; MARTINS, C. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research.** v.17, p. 791–799, 2009.

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 janaeensis*. **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. **Journal of Fish Biology.** v.76, p.1094–1116, 2010.

- VICARI, M; MELLO-PISTUNE, H. F; CASTRO, J.P; ALMEIDA, M.C; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA-FILHO, O; CAMACHO, J. P. M ; ARTONI, R. F. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**. v. 139, p. 1073-1081, 2011.
- VOLFF, J.N; KÖRTING, C; FROSCHAUER, A; SWEENEY, K; SCHARTL, M. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**. v.52, p. 351-360, 2001.
- VOLFF, J.N; KÖRTING, C; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**. v.17, p. 1673-1684, 2000.
- VOLFF, J.N; KÖRTING, C; SWEENEY, K; SCHARTL, M. The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**. v.16, p. 1427-1438, 1999.
- WEITZMAN, S. H; MENEZES, N. A; WEITZMAN, M. J. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, p. 379-427, 1988.
- ZAWADZKI, C. H; WEBER, C; PAVANELLI, C. S. A new darksaddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**. v.8, p. 719-725, 2010.
- ZIEMNICZAK, K; BARROS, A.V; ROSA, K.O; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; CESTARI, M.M; MOREIRA-FILHO, O; ARTONI, R.F; VICARI, M.R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in

Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**. v. 79, p. 492-501, 2012.

7. ANEXOS

Anexo 1. Licença permanente para a coleta de material zoológico

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1	Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
------------------------	--

Dados do titular		
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari	CPF: 952.846.480-72
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Peixes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	coleta

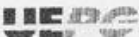
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

Anexo 2. Protocolo CEUA

 **PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

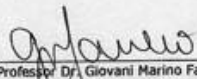
Processo CEUA – 07/2011
Protocolo UEPG – 05057/2011
Título – “Citogenética Molecular em Peixes Neotropicais”.
Interessado – Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Data de Entrada – 31/03/2011
Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
02/05/2013

Considerações
Prezado Professor,
Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:
- APROVADO, por dois anos, para a utilização 30 exemplares de cada espécie/população dos peixes em estudo.

Atenciosamente,
Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.


Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco de Reitoria – anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo 3. Preparações Diretas (BERTOLLO et al., 1978)

Os animais foram injetados intra-abdominalmente com uma solução aquosa de colchicina 0,025 %, na proporção de 1 ml / 100 g de peso. Os peixes foram mantidos em aquário durante 50 - 60 minutos. Em seguida, os exemplares foram anestesiados em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0,01 %, e posteriormente sacrificados. O rim anterior foi retirado e transferido para 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075 M). Em seguida, as células foram dissociadas com uma seringa desprovida de agulha. O material foi incubado em estufa a 37 °C durante 25-30 min., resuspendido com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrífuga. Foi acrescentado 2 mL do fixador Carnoy I (3 partes de metanol /1 parte de ácido acético glacial), recém preparado e o material resuspendido repetidas vezes. O material foi centrifugado durante 10 min., a 900 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 5-7 mL do fixador foi adicionado ao material que foi imediatamente resuspendido e centrifugado por mais 10 min. a 900 rpm. Esta última etapa de descarte de sobrenadante e centrifugação foi repetida mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1,5 mL de fixador. O material foi transferido para microtubos de 1,5 ml e armazenados em freezer a - 20 °C para posterior utilização. Com uma pipeta Pasteur foram pingadas 2-3 gotas da suspensão celular sobre uma lâmina limpa, com inclinação de 45 °, com película d'água a 60 °C. As lâminas, após secas, foram coradas com solução de Giemsa 5 %, em tampão fosfato pH 6,8, durante 12 minutos.

Anexo 4. Bandamento-C (SUMNER, 1972, com modificações)

As lâminas contendo o material celular foram tratadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, à 37 °C, durante 10 min. e lavadas com água destilada. Em seguida foram incubadas em hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) 5 %, recém preparada e filtrada, a 42 °C durante 2 min. e 40 s e imediatamente após, submergidas em solução de ácido clorídrico 0,2 N por 20 s para o bloqueio da reação de depurinação, e lavadas em água destilada. Logo após, as lâminas foram incubadas em solução salina 2 x SSC, a 60 °C, de 45 a 60 min. e novamente lavadas com água destilada e deixadas para secar ao ar. Por fim, foram coradas com iodeto de propídio 50 µg/mL diluído em 200 µL “antifade” (1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid) e cobertas com lamínula.

Anexo 5. Marcação de sonda de rDNA 18S

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 1 X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de 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 °C; 35 ciclos: 1 min. a 90 °C, 1 min. e 30 s a 52 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C.

Anexo 6. Marcação de sonda de rDNA 5S

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 1 X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de dUTP 11- digoxigenina , 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 °C; 35 ciclos: 1 min. a 90 °C, 1 min. e 30 s a 52 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C.

Anexo 7. Obtenção da sequência telomérica geral dos vertebrados TTAGGGn

(IJDO et al., 1991)

Para a marcação da sonda telomérica foi utilizada a seguinte reação (tampão *Taq* polimerase 1 X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de dUTP 11- digoxigenina, 0,2 μM primer (TTAGGG)₆, 0,2 μM primer (AATCCC)₆ 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°; 10 ciclos de (1 min. a 94 °C, 30s a 52 °C e 1 min. e 30s a 72 °C), seguidos por 30 ciclos de alta estringência (1 min. a 94 °C, 30s a 60 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C) e 5 min a 72 °C.

Anexo 8. Obtenção e marcação de sonda do retroelemento Rex 3

A reação de PCR para obtenção da sequência *Rex 3* a partir do DNA genômico foi realizada com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 2 μM dNTP, 1 μM primer *Rex 3 F*, 1 μM primer *Rex 3 R* e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 5 min. a 94 °C; 35 ciclos: 1 min. a 90 °C, 1 min. e 30 s a 57 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C. A reação de PCR de marcação das sondas foi realizada com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de dUTP 11- digoxigenina , 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 °C; 35 ciclos: 1 min. a 90 °C, 1 min. e 30 s a 52 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C.

Anexo 9. Publicação científica paralela ao mestrado

