



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA BORTHOLAZZI VENTURELLI

**MAPEAMENTO DOS GENES RIBOSSÔMICOS E  
CROMOSSOMOS MARCADORES EM NOVE ESPÉCIES DE  
*Rineloricaria* (SILURIFORME, LORICARIIDAE,  
LORICARIINAE) DE DISTINTAS BACIAS HIDROGRÁFICAS**

---

Londrina  
2014

NATÁLIA BORTHOLAZZI VENTURELLI

**MAPEAMENTO DOS GENES RIBOSSÔMICOS E  
CROMOSSOMOS MARCADORES EM NOVE ESPÉCIES DE  
*Rineloricaria* (SILURIFORME, LORICARIIDAE,  
LORICARIINAE) DE DISTINTAS BACIAS HIDROGRÁFICAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia G. Caetano

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

V468m Venturelli, Natália Bortholazzi.  
Mapeamento dos genes ribossômicos e cromossomos marcadores em nove espécies de *Rineloricaria* (Siluriforme, Loricariidae, Loricariinae) de distintas bacias hidrográficas / Natália Bortholazzi Venturelli. – Londrina, 2014.  
78 f. : il.

Orientador: Lucia Giuliano-Caetano.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Rineloricaria – Teses. 3. Marcadores biológicos – Teses. 4. Cascudo (Peixe) – Teses. 5. Peixe – Distribuição geográfica – Teses. I. Giuliano-Caetano, Lucia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.312.32:597

NATÁLIA BORTHOLAZZI VENTURELLI

**MAPEAMENTO DOS GENES RIBOSSÔMICOS E CROMOSSOMOS  
MARCADORES EM NOVE ESPÉCIES DE *Rineloricaria*  
(SILURIFORME, LORICARIIDAE, LORICARIINAE) DE DISTINTAS  
BACIAS HIDROGRÁFICAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia G. Caetano  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Dias  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 25 de fevereiro de 2014

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, meu irmão e aos meus amigos...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por todas as graças recebidas e por estar sempre me fortalecendo em todos os momentos, permitindo todas as vitórias. É a Ele que dirijo toda minha gratidão.

Sou profundamente agradecida aos meus queridos pais pelos valores morais, dedicação, incentivo, carinho, amor, compreensão. São infinitos os agradecimentos. Vocês, com certeza, são um exemplo de vida para mim, os principais responsáveis por esta conquista.

Ao meu irmão, eterno companheiro. Obrigada pela amizade, conselhos, incentivo e apoio durante todos esses anos de estudo. Sou muito grata por ter você em minha vida.

Ao curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral por terem dado condições para desenvolver este trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano, minha mãe científica. Obrigada por esses anos de dedicação, amizade, pelo exemplo de ser humano e principalmente por todos os ensinamentos.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Dias pela amizade, ensinamentos e por ser tão dedicada.

À professora Renata da Rosa por sempre estar disposta a nos ajudar, pela amizade e conselhos.

A todos os professores da pós-graduação pelos ensinamentos, amizade e pelo incentivo.

Aos membros da comissão examinadora da qualificação pelas críticas e sugestões.

Aos professores Dr. Cláudio Henrique Zawadzki, da Universidade Estadual de Maringá, e Dr<sup>a</sup> Mônica Sônia Rodrigues, da Universidade Federal de Viçosa, pela identificação dos peixes.

À técnica administrativa da pós-graduação, Sueli Miranda, pela alegria, incentivo e ajuda.

Aos técnicos de laboratório, Dário e Melissa, por serem tão prestativos, nos socorrer, pela amizade e incentivo.

Ao meu namorado Paulo, pelo imenso amor, paciência, incentivo e companheirismo. Está longe dos olhos, mas perto do coração.

Aos amigos de outros laboratórios: Josiane, Vanessa, Lilian, Glaucia, Eliane, Wilson, Diego, Sara, Karen e Katia.

E, finalmente, um agradecimento cheio de carinho aos meus amigos do laboratório de Citogenética Animal (LACA). Vocês fizeram parte da minha vida durante a graduação e pós-graduação e contribuíram para minha formação. Vocês foram minha família durante esses anos e tornaram o laboratório um lugar único. Vou sentir muita, muita, muita falta de vocês. Meus inesquecíveis amigos: Fábio, Angélica (Téia), Larissa, Tatiane, Marceléia, Mari Ussó, Angélica, Juceli, Raquel, Mari Pine, Poliana, Matheus, Ana Beatriz e Viviam.

“A persistência é o menor caminho ao êxito” (Charles Chaplin)

VENTURELLI, Natália Bortholazzi. **Mapeamento dos genes ribossômicos e cromossomos marcadores em nove espécies de *Rineloricaria* (Siluriforme, Loricariidae, Loricariinae) de distintas bacias hidrográficas.** 2014. 78 f Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

## RESUMO

A região neotropical contém uma das ictiofaunas de água doce mais diversa do mundo, dentro da ordem Siluriforme, a família Loricariidae, conhecida como cascudos é a mais especiosa. Essa família é dividida em sete subfamílias: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Ancistrinae e Delturinae. A subfamília Loricariinae engloba o gênero *Rineloricaria* que possui 65 espécies descritas e apenas 15 apresentam dados citogenéticos, sendo essas provenientes, em sua maioria, da bacia do Atlântico Sul e Sudeste, bacia do alto Paraná e bacia do São Francisco. *Rineloricaria* é conhecido por apresentar grande variabilidade cariotípica, com o menor número diploide de 36, em *Rineloricaria latirostris*, e o maior de 70, em *Rineloricaria lima*. Este gênero apresenta uma extensa variação cariotípica devido a rearranjos cromossômicos do tipo fusão, fissão e inversões, principais envolvidos na evolução cariotípica do gênero. Neste trabalho foram estudado citogeneticamente nove espécies de *Rineloricaria* provenientes de diferentes bacias. São elas: *Rineloricaria aequalicuspis*, *Rineloricaria quadrensis* e *Rineloricaria strigilata* da bacia do rio Tramandaí (RS); *Rineloricaria cadeae*., *Rineloricaria microlepidogaster* e *R. malabarbai* da bacia da Laguna dos Patos (RS); *Rineloricaria pentamaculata* da bacia do alto Paraná; *Rineloricaria parva* da bacia do rio Paraguai (MS) e *Rineloricaria* cf. *reisi*. da bacia do rio Uruguai (ARG). Foram utilizados marcadores cromossômicos convencionais (número diploide, fórmula cariotípica, bandamento C, Ag-RON e fluorocromo base específico) e marcadores moleculares (FISH com sondas de DNAr 18S e 5S) com o intuito de comparar os dados com os da literatura, mapear os genes ribossômicos e encontrar possíveis cromossomos marcadores, além de comparar os dados citogenéticos com a filogenia do grupo. As espécies estudadas apresentaram variação do número diploide: *R. aequalicuspis* apresentou  $2n=68$  st-a; *R. quadrensis* e *R. strigilata*:  $2n=70$  (8m-sm+62st-a); *R. cadeae*:  $2n=64$ st-a; *R. microlepidogaster*:  $2n=68$ st-a; *R. malabarbai*:  $2n=64$  (2m-sm+62st-a); *R. pentamaculata*:  $2n=56$  (8m-sm+48t-a); *R. parva*:  $2n=60$  (6m-sm+54st-a) e *Rineloricaria* cf. *reisi*:  $2n=60$ st-a. Constatou-se que o número diploide de 56 é exclusivo de *R. pentamaculata* e que a espécie *Rineloricaria parva* coletada no interior do continente (bacia do rio Paraguai) apresentou 60 cromossomos e o primeiro par meta-submetacêntrico portador de uma constrição secundária terminal no braço curto sendo considerada uma característica citotaxonômica importante. Foi confirmado pela FISH com sonda de DNAr 18S o padrão de RON simples em todas as espécies. Todas as RONs foram coincidentes com a constrição secundária sendo CMA<sub>3</sub> positivo e heterocromáticas, exceto *R. cadeae* que mostrou-se BC negativa. A sonda de DNAr 5S demonstrou uma variação no número de sítios sendo considerada um bom marcador para as espécies, assim como a localização da RON em *R. parva*, a constrição secundária não heterocromática em *R. cadeae*. *Rineloricaria aequalicuspis*, *R. microlepidogaster*, *R. strigilata* apresentaram

características citogenéticas semelhantes apesar de estarem em bacias distintas. Este fato é uma evidência de que as bacias do Paraná, Paraguai e Atlântico Sul tiveram uma mesma origem, e o isolamento e os rearranjos possibilitaram a diversificação encontrada no gênero *Rineloricaria*.

**Palavras-chave:** *Rineloricaria*. Marcadores cromossômicos. Distribuição biogeográfica

VENTURELLI, Natália Bortholazzi Venturelli. **Mapping of ribosomal genes and chromosome markers in nine species of *Rineloricaria* (Siluriforme, Loricariidae, Loricariinae) distinct watersheds**. 2014. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

## ABSTRACT

The neotropical region contains one of the freshwater ichthyofauna most diverse in the world, within the order Siluriforme the Loricariidae family, known as catfish is the most specious. This family is divided into seven subfamilies: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Ancistrinae and Delturinae. The Loricariinae subfamily includes the genus *Rineloricaria* that has 65 species described and only 15 had cytogenetic data, and from these, mostly in South and Southeast Atlantic basin, the Upper Paraná and São Francisco basin. *Rineloricaria* is known to have extensive karyotypic variability, with the lowest diploid number of 36 in *Rineloricaria latirostris*, and greater than 70 in *Rineloricaria lima*. This genus has an extensive karyotype variation due to chromosomal rearrangements type fusion, fission and inversions, key stakeholders in the karyotype evolution of the genus. In this work cytogenetically nine species of *Rineloricaria* from different basins were studied. They are: *Rineloricaria aequalicuspis*, *Rineloricaria quadrensis* and *Rineloricaria strigilata* the Tramandaí river basin (Rio Grande do Sul); *Rineloricaria cadeae*, *Rineloricaria microlepidogaster* and *Rineloricaria malabarbai* basin of Patos lagunn (Rio Grande do Sul). *Rineloricaria pentamaculata* of the Upper Paraná basin; *Rineloricaria parva* of Paraguay basin (Mato Grosso do Sul) and *Rineloricaria* cf. *reisi* the river Uruguay (Argentina) basin. Conventional chromosomal markers (diploid number, karyotype formula, C-banding, Ag-NOR and specific fluorochrome base) and molecular markers (FISH with 18S and 5S rDNA probes) in order to compare the data with the literature, were used to map the ribosomal genes and chromosomes find possible markers and to compare the cytogenetic data with the phylogeny of the group. Species had a diploid number variation: *R. aequalicuspis* presented  $2n = 68$  st-a; *R. quadrensis* and *R. strigilata*:  $2n = 70$  (8m-sm+62st-a); *R. cadeae*:  $2n = 64$ st-a; *R. microlepidogaster*:  $2n = 68$ st-a; *R. malabarbai*:  $2n = 64$  (2m-sm+62st-a); *R. pentamaculata*:  $2n = 56$  (8m-sm+48st-a); *R. parva*:  $2n = 60$  (6m-sm+54st-a) and *Rineloricaria* cf. *reisi*:  $2n = 60$ s-at. It was found that the diploid number of 56 is exclusive *R. pentamaculata* and the specie *Rineloricaria parva* collected within the continent (Paraguay basin) had 60 chromosomes and the first meta-submetacentric pair bears a terminal secondary constriction on the short arm is considered an important feature citotaxonômica. Was confirmed by FISH with 18S rDNA probe the pattern of NOR simple in all species. All NORs were coincident with the secondary constriction CMA3 being positive and heterochromatic except *R. cadeae* that was negative BC. The 5S rDNA probe showed a variation in the number of sites being considered a good marker for the species, as well as the location of NOR in *R. parva*, the secondary constriction in *R. cadeae* not heterochromatic. *Rineloricaria aequalicuspis*, *R. microlepidogaster*, *R. strigilata* had similar cytogenetic features although in different basins. This fact is evidence that the basins of the Paraná, Paraguay and South Atlantic had the same origin, and isolation and rearrangements allowed the diversification found in *Rineloricaria*.

**Keywords:** *Rineloricaria*. Chromosomal markers. Biogeographical distribution.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Áreas ictiogeográficas da América do Sul .....	28
<b>Figura 2</b> – Divisão hidrográfica nacional (CONEJO et al.,2005).....	28
<b>Figura 3</b> – Locais onde foram feitas as coletas .....	40
<b>Figura4</b> – Exemplares das espécies estudadas do gênero <i>Rineloricaria</i> .....	41

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1</b> – Cariótipos das espécies estudadas .....	54
<b>Figura 2</b> – Localização dos números diploides das espécies estudadas no presente trabalho e das que se encontram na literatura .....	55

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1</b> – Bandamentos cromossômicos: fluorocromos CMA <sub>3</sub> positivo/DAPI negativo, banda C e região organizadora de nucléolo (RON) .....	70
<b>Figura 2</b> – Localização do genes ribossômicos com sondas de DNAr 18S e DNAr 5S .....	71

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados cromossômicos de espécies de *Rineloricaria* disponíveis na literatura e seus respectivos locais de coleta .....29
- Tabela 2** – Lista de espécies analisadas, com dados de locais de coleta e coordenadas geográficas .....33

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Dados de número diploide de *Rineloricaria* disponíveis na literatura e presente estudo .....56

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Dados cromossômicos das espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho e seus respectivos locais de origem .....69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	ASPECTOS GERAIS DOS GÊNEROS RINELORICARIA .....	14
1.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACIAS DO ALTO PARANÁ, ATLÂNTICO SUL, URUGUAI E ALTO PARAGUAI .....	17
1.3	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DO GÊNERO RINELORICARIA .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
2.1	OBJETIVO GERAL .....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.1	MATERIAL E LOCAIS DE COLETA .....	32
3.2	MÉTODOS .....	34
3.2.1	Obtenção de Cromossomos Mitóticos .....	34
3.2.2	Classificação Cromossômica .....	35
3.2.3	Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs).....	35
3.2.4	Detecção da Região de Heterocromatina (Banda C).....	36
3.2.5	Dupla Coloração CMA3/DAPI .....	36
3.2.6	Hibridação in situ por Fluorescência – FISH.....	37
3.2.7	Preparações de Lâminas .....	37
3.2.7.1	Tratamento com RNase .....	37
3.2.7.2	Hibridação.....	38
3.2.7.3	Lavagens pós-hibridação:.....	38
3.2.7.4	Detecção e amplificação do sinal.....	38
3.2.7.5	Caso deseje amplificar o sinal .....	39
3.2.7.6	Montagem das lâminas .....	39
	<b>CAPÍTULO 1- ASPECTOS BIOGEOGRÁFICOS ASSOCIADOS A DADOS CROMOSSÔMICOS DE Rineloricaria (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIIDAE)</b> .....	42
	RESUMO .....	43
	INTRODUÇÃO .....	44

MATERIAL E MÉTODOS .....	46
RESULTADOS .....	47
DISCUSSÃO .....	48
CONCLUSÃO .....	51
REFERÊNCIAS.....	51

<b>CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM NOVE ESPÉCIES DE Rineloricaria (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIIDAE) .....</b>	<b>58</b>
RESUMO .....	59
INTRODUÇÃO .....	60
MATERIAL E MÉTODOS .....	61
RESULTADOS .....	62
DISCUSSÃO .....	64
CONCLUSÃO .....	66
REFERÊNCIAS.....	67
<b>4 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DOS GÊNEROS *RINELORICARIA*

A região neotropical contém uma das ictiofaunas de água doce mais diversa do mundo, com cerca de 7.000 espécies de peixes conhecidas (ESCHMEYER, 2013). Na América Central e do Sul, os Ostariophysi são, sem dúvida, o maior grupo representado e, entre eles, a ordem Siluriformes apresenta a maior diversidade, com 3.601 espécies válidas (revisado por ESCHMEYER, 2013), distribuídas em 37 famílias. Entre os Siluriformes, a família Loricariidae, cujos espécimes são conhecidos como cascudos é a família mais especiosa e compreende 870 espécies (ESCHMEYER, 2013).

Existem trabalhos de revisão de Loricariidae, iniciados com Eigenmann e Eigenmann (1890), que dividiram a família em três subfamílias (Loricariinae, Hypoptopominae e Plecostominae). A partir daí, houve uma ampla análise em Loricariidae. Reis, Pereira e Armbruster (2006) publicaram uma versão amplamente aceita de que a família Loricariidae é composta por seis subfamílias: Lithogeneinae (EIGENMANN, 1909), Delturinae (REIS; PEREIRA; ARMBRUSTER, 2006), Neoplecostominae (REGAN, 1904), Hypoptopomatinae (EIGENMANN; EIGENMANN, 1890), Hypostominae (KNER, 1853) e Loricariinae (BONAPARTE, 1831). Em um trabalho realizado a partir de análise de dados de origem molecular foi proposta a elevação da categoria da tribo Otothyriini a subfamília por Chiachio, Oliveira e Montoya-Burgos (2008) com isso totalizando sete subfamílias: Delturinae, Lithogeneinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Neoplecostominae e Otothyriinae. Segundo Chiachio, Oliveira e Montoya-Burgos (2008), Hypoptopomatinae, Otothyriinae e Neoplecostominae mostram uma tendência incomum de ficar nos limites do intervalo de distribuição ancestral.

Em recente revisão, Eschmeyer (2013) adotou a classificação de sete subfamílias: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Ancistrinae e Delturinae. Diante disso, a validade da composição das tribos e gêneros dentro dessas subfamílias ainda necessita de estudos detalhados.

A subfamília Loricariinae é a segunda mais numerosa dentro de Loricariidae, com 45 gêneros descritos (ESCHMEYER, 2013), onde se encontra o gênero *Rineloricaria*. O monofiletismo da subfamília Loricariinae possui alto suporte

estatístico e já foi apresentado por Py-Daniel (1997), Montoya-Burgos et al. (1998), Armbruster (2004) e Chiachio *et al.* (2008).

Covain e Fish-Muller (2007) propuseram um dendograma para a subfamília Loricariinae. No primeiro grupo, os mais basais são os pertencentes à tribo *Hartiini* (*Harttia*, *Farlowella* e *Sturisoma*) e os dois últimos pertencentes à tribo *Loricariini*, os quais são subdivididos em subgrupos morfológicos (*Loricariichthys*, *Rineloricaria*, *Loricaria* e *Pseudohemiodon*). No dendograma, os *Loricariichthys* são os mais basais dentro da tribo e, portanto, intermediários entre *Hartiini* e *Loricariini*.

É importante notar que, as análises filogenéticas desse grupo, realizadas a partir de dados moleculares presentes na literatura, também apontaram para a posição basal do gênero *Harttia* (MONTROYA-BURGOS et al., 1998; COVAIN et al., 2008), enquanto que, as filogenias baseadas em dados morfológicos sustentam a validade da tribo *Hartiini*, abrangendo *Sturisoma*, *Sturisomatichthys*, *Farlowella*, *Lamontichthys*, *Harttiella*, *Cteniloricaria* e *Pterosturisoma*. Entretanto, em nenhuma das análises morfológicas, as posições desses gêneros são congruentes, o que pode indicar, entre outras coisas, uma falta de caracteres que elucidem tais relações.

O monofiletismo de *Rineloricaria* havia sido colocado em questão apenas por Py-Daniel (1997). As relações entre *Hartiini* e *Loricariini* apresentados por Fichberg (2008) corroboram os resultados de Py-Daniel (1997) em que estas tribos aparecem como grupos-irmãos e confirmam o monofiletismo de *Rineloricaria*.

O gênero *Rineloricaria* é o mais rico em espécies da subfamília Loricariinae, apresentando 65 espécies nominais (REIS, KULLANDER, FERRARIS JUNIOR, 2003; FERRARIS JUNIOR, 2007; GHAZZI, 2008; FICHBERG; CHAMON, 2008; INGENITO et al., 2008; RODRIGUEZ; REIS, 2008).

Os loricariines e possuem como sinapomorfias o pedúnculo caudal longo e bastante deprimido e a ausência da nadadeira adiposa (COVAIN, 2005), além das demais simplesiomorfias que definem os Loricariidae. Por serem bastante achatados, são popularmente chamados de “acari” e “cascudo chinelo”. Possuem o hábito de ficar sobre o substrato inorgânico (rocha, cascalho, areia, silte etc.) ou orgânico (madeira morta, resíduos vegetais, etc.), ocupando desde ambientes lóticos (como exemplo *Harttia*) a lênticos (como exemplo *Loricariichthys*). Sua distribuição é bastante ampla, da Costa Rica até a Argentina. O hábito alimentar é bastante variado, sendo detritívoro, carnívoro ou herbívoro. Apresentam hábitos reprodutivos

comportamentais, por exemplo, cuidado parental: os machos encubam os ovos sob o abdômen.

*Rineloricaria* é o maior gênero da subfamília Loricariinae e, é o gênero que apresenta confusões taxonômicas dentro da subfamília. *Rineloricaria* foi descrito em 1862 por Bleeker para acomodar *Loricaria lima* (Kner, 1853), porém não há informações concretas da localidade tipo (COVAIN; FISH-MULLER, 2007; FICHBERG; CHAMON, 2008). Em 1980, Isbrücker (1980) tratou *Hemiloricaria* como sinônimo de *Rineloricaria*. Mais tarde, em 2001, o mesmo autor revalidou *Hemiloricaria* e 24 espécies foram incluídas nesse gênero, 18 em *Rineloricaria*.

Ferraris et al. (2003) listou todas as espécies de Isbrücker et al. (2001) como sinônimos de *Rineloricaria*, porém Ferraris et al. (2007) acatou a divisão de *Rineloricaria* em três gêneros novamente, revalidando *Hemiloricaria*, porém as explicações taxonômicas não apoiaram tal decisão. Somente Rodriguez e Reis (2008) sugeriram uma explicação para apoiar que tanto *Hemiloricaria* e *Rineloricaria* são válidos, com base nos caracteres morfológicos e distribuição das espécies.

Em resumo, *Hemiloricaria* corresponde à mais ampla distribuição dos gêneros *Rineloricaria* e *Hemiloricaria*, encontrado em toda a América do Sul, exceto na Bacia do alto Paraná e drenagens costeiras do Atlântico. Rodriguez e Reis (2008) afirmam que *Rineloricaria* encontram-se distribuído apenas ao longo da bacia do rio Paraná e drenagens costeiras do Atlântico desde o Uruguai até o Nordeste do Brasil. Os gêneros distinguem-se basicamente pela largura do corpo, raios da nadadeira caudal não ramificados, sem filamento (exceto *R. catamarcensis*, *R. kronei*, *R. pentamaculata* e *R. strigilata*) e região abdominal coberta por placas, cor castanho-claro dentre outros caracteres. Essa classificação parece contribuir para a compreensão da taxonomia do grupo, especialmente nas bacias do Leste, porém não parece útil para as espécies amazônicas, já que Fichberg e Chamon (2008) descreveram a espécie *Rineloricaria osvaldoi*, do rio Vermelho, bacia do rio Araguaia e Py-Daniel e Fichberg (2008) descreveram *R. daraha*, do rio Daraá, bacia do rio Amazonas. Estas espécies residem na área geográfica de *Hemiloricaria*, no entanto, pertencem ao grupo *Rineloricaria* pela presença do conjunto de caracteres morfológicos: largura do corpo, características dimórficas e padrão de cor. Os autores afirmam serem necessárias análises filogenéticas para apoiar tal identificação.

Recentemente, Vera-Alcaraz, Pavanelli e Zawadzki (2012) realizaram uma revisão taxonômica e propuseram uma chave de identificação de espécies de *Rineloricaria* da bacia do rio Paraguai, sendo encontradas nesta bacia cinco espécies: *R. aurata*, *R. cacerensis*, *R. hoehnei*, *R. parva*, e *R. lanceolata*. Como não há um consenso com relação à divisão de *Rineloricaria*, os autores optaram por usar o arranjo proposto por Ferraris et al. (2007) até que seja publicada formalmente para este gênero uma classificação baseada em abordagens cladísticas.

As falhas na descrição do gênero permitem discussões quanto às espécies que o compõem, levando à ocorrência de espécies sinônimas, complexo de espécie, demonstrando a necessidade de revisões taxonômicas, filogenéticas e biogeográficas a fim de esclarecer as relações do gênero *Rineloricaria*.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACIAS DO ALTO PARANÁ, ATLÂNTICO SUL, URUGUAI E ALTO PARAGUAI

Segundo Ribeiro, Lima e Menezes (2011), os eventos geológicos antigos podem ter relevância no entendimento da biogeografia dos peixes, pois, durante este período (aproximadamente 500 milhões de anos atrás), os continentes se reuniam e originavam a maior parte das províncias estruturais presentes hoje no continente sul-americano. Estas diferentes províncias constituem-se na maioria dos Escudos Cristalinos, ou seja, a maior porção do atual continente sul-americano. Ainda, segundo estes autores muitos dos eventos tectônicos que se desenrolaram posteriormente, muitos deles ativos, originaram importantes elementos da paisagem sul-americana, tais como bacias tectônicas modernas como o Pantanal e a depressão do Araguaí-Tocantins, entre outras. Essas mudanças são responsáveis pela distribuição das espécies de peixes que se encontram amplamente distribuídas ou isoladas.

As bacias hidrográficas brasileiras refletem o complexo quadro natural que engloba o país que possui uma variedade de aspectos. Por essa razão, a reunião das bacias fluviais passou por modificações, ao longo do tempo, formando diferentes agrupamentos (CUNHA; GUERRA, 2006). A Política Nacional de Recursos Hídricos adotou a Divisão Hidrográfica Nacional estabelecida por CONEJO et al. (2005) que são: bacia hidrográfica Amazônica, Paraguai, Tocantins/Araguaia, Parnaíba, Atlântico Nordeste Ocidental, Atlântico Nordeste Oriental, São Francisco, Atlântico

Leste, Atlântico Sudeste, Paraná, Uruguai e Atlântico Sul (Figura1). A extensão do território, associada a uma rede de coleta de dados hidrológicos/sedimentométrico ainda insuficiente, tem dificultado conhecer o comportamento das bacias hidrográficas (CUNHA; GUERRA, 2006). Existem ainda regiões onde não há postos de coleta de dados, sendo rios ainda totalmente desconhecidos.

A biogeografia estuda a distribuição de animais e plantas nas águas continentais incluindo os aspectos ecológicos recentes, a capacidade de adaptação dos respectivos grupos, a valência ecológica, e como fator muito importante, os aspectos histórico-biogeográficos (SCHÄFER, 1984). A característica da distribuição dos peixes leva a uma classificação regional em áreas ictiogeográficas (Figura 2), esse resultado reforça a interpretação de que uma região liminozoogeográfica não é determinada unicamente pelas bacias dos grandes sistemas fluviais, mas também pelos fatores histórico-ecológicos, possibilitando, ou não, a fixação de grupos de animais e plantas em regiões muito pequenas ou mais amplas (SCHÄFER, 1984).

Dentro dessa grande variedade de rios que podem ser caracterizados por intermédio de condições morfológicas, hidrológicas, climáticas e biogeográficas, os rios das regiões tropicais da América do Sul merecem destaque. Por exemplo, na bacia do Paraguai, o rio Paraguai (2.070 km) nasce no planalto central e após curto percurso penetra no Pantanal. Em certos trechos separa o Brasil da Bolívia e do Paraguai e drena terrenos dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Seus principais afluentes são: São Lourenço, Taquari e Miranda (CUNHA, GUERRA, 2006).

O pantanal forma uma das áreas de maior biodiversidade, recrutamento e produtividade (NEIFF, 1990). Esta área foi formada pela dinâmica das placas tectônicas, uma depressão tectônica desenvolvida devido a reativações tectônicas do pré-Cambriano. A bacia também engloba a extensa planície do Chaco e parte da Cordilheira dos Andes, susceptível a estiagens severas pela predominância de um clima árido. O ciclo de vazantes e cheias é responsável pela riqueza ecológica da região e por serviços ecossistêmicos de alto valor, como a fertilização dos campos (PETRY et al., 2011).

Algumas espécies de peixes estão incluídas em grupos de espécies ou gêneros amazônicos, *Leporinus octomaculatus* parece estar intimamente relacionada a um subconjunto de espécies amazônicas que inclui *Leporinus reticulatus* e *Leporinus guttatus*, entre outros exemplos (RIBEIRO et al., 2013). A

ideia da relação entre a bacia Amazônica e alto rio Paraguai não é nova, porém, somente com a discussão de Lima e Ribeiro (2011), essa relação histórica foi melhor compreendida. Segundo os autores, a distribuição de peixes de água doce, através do tempo, são muito distintas entre as porções do planalto e planície das bacias hidrográficas da América do Sul. Espécies de várzea tendem a apresentar ampla distribuição em ambos os rios do Paraguai e bacia Amazônica, e isso não foi devido à migração ou geodispersão, mas sim consequência do rearranjo paliogeográfico. A antiga continuidade topográfica do escudo cristalino brasileiro estendendo-se até o limite sul do alto rio Paraguai, esse antigo planalto foi drenado pelas cabeceiras da Amazônia.

O soerguimento dos Andes está diretamente ligado à gradual inversão da direção do fluxo da corrente das bacias hidrográficas, como a bacia Amazônica, e o atual relevo da Cordilheira do Andes está relacionado aos processos erosivos atuantes que rebaixaram as superfícies do entorno, e fornecem água e sedimentos para o pantanal. Outros fatores fundamentais que têm desempenhado um grande papel na riqueza ictiológica do continente, são histórias tectônicas da margem costeira do Atlântico e as oscilações do nível do mar relacionadas aos vários ciclos glaciais do Plioceno e Holoceno. Processos de vicariância e fenômenos de dispersão, anteriormente separados por barreiras intransponíveis, levou a diversificação ictiofaunística como formas encontradas em ambas às placas da Guiana e Brasil e as formas separadas por grandes barreiras montanhosas como a Serra do Mar, sudeste Brasil (BRITO; MEUNIER; LEAL, 2007). A divisão atual é recente (cerca de 2,5 milhões de anos atrás) e a atual distribuição deste conjunto de espécies foi possivelmente estabelecida em conjunto com a origem tectônica do Pantanal. Há uma complexa cobertura vegetal e as produtividades sazonais dão suporte ecológico para uma fauna diversa e abundante do Pantanal: 263 espécies de peixes, 41 de anfíbios, 113 de répteis, 463 de aves e 132 de mamíferos (apud ALHO, 2008).

Outra bacia que merece destaque é a bacia do Paraná, uma ampla região sedimentar do continente sul-americano, mais antiga que a depressão do Pantanal, e incluem porções territoriais do Brasil meridional, Paraguai oriental, nordeste da Argentina e norte do Uruguai, totalizando uma área que se aproxima dos 1,5 milhão de quilômetros quadrados (MILANI et al., 2007). Segundo Maack (2002), a subdivisão em duas bacias de desagüamento dá um cunho característico ao aspecto

dos sistemas hidrográficos do estado do Paraná. Os rios de maior complexo hidrográfico correm para o interior do continente e pertencem à região de captação do grande sistema do rio Paraná e o complexo hidrográfico menor deságua diretamente no oceano Atlântico. O divisor de águas entre o oceano Atlântico e a bacia do Paraná esta situado na região das nascentes do rio Iguaçu.

Galves, Shibatta e Jerep (2009) realizaram um levantamento dos estudos relacionados à diversidade de peixes da bacia hidrográfica do alto rio Paraná, considerada a mais investigada em termos de bacias hidrográficas. Os autores verificaram que a diversidade ictiofaunística dos ambientes aquáticos não segue uma regra geral de composição e distribuição, pois houve variação na diversidade de peixes entre as diferentes bacias que compõe a bacia do alto rio Paraná, o que permitiu aos autores inferir que o estabelecimento das espécies não depende apenas de um fato em particular tal como a sua localização. O estabelecimento das espécies de peixes em um rio são reflexos dos conjuntos de fatores bióticos, abióticos, fatores como disponibilidade de locais, de alimentação, refúgio e reprodução. (BENNEMANN; SHIBATTA; GARAVELLO, 2000).

Segundo Galves, Shibatta e Jerep (2009) as pesquisas nesses ambientes foram intensificadas nos últimos anos, mas ainda são necessários novos estudos e programas de monitoramento nos locais já inventariados. Neste contexto destaca-se o trabalho de Langeani et al. (2007), sobre a diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná, os quais inventariaram a região como um todo, usando dados de coleções, literatura e realizações de novas coletas, e constataram que a diversidade de peixes já descritas em literatura foi de 310 espécies, e dezenas em fase de descrição. Dentre estes, a maior riqueza é registrada nas ordens Siluriformes e Characiformes, que respondem por cerca de 80% das espécies e compõem os grupos dominantes na maior parte dos ambientes lóticos do alto Paraná. Um resultado importante desse estudo foi o relato de que a maioria das espécies novas é proveniente de ambientes de pequeno volume de água, reforçando a ideia de que esses ambientes merecem atenção e prioridade nos estudos.

É possível verificar a concentração de estudos nas regiões de São Paulo e Paraná, mas ainda com muitas áreas não investigadas. No caso do Mato Grosso do Sul, os estudos são recentes e escassos, enquanto que em Goiás, Distrito Federal (Brasília) e Minas Gerais os estudos são praticamente inexistentes ou não foram publicados (GALVES; SHIBATTA; JEREP, 2009).

A bacia do Atlântico Sul (224.000km<sup>2</sup>) estende-se do sul do estado de São Paulo até o arroio Chuí, Rio Grande do Sul, e rios formam pequenas redes de drenagem que lança suas águas diretamente no oceano Atlântico (CUNHA; GUERRA, 2006). A bacia do rio Tramandaí representa uma pequena fração da bacia do atlântico Sul e da diversidade biológica Neotropical, com cerca de 100 espécies de peixes de água doce conhecidas. A pesar desde pequeno número comparado ao numero total de espécies encontradas na região Neotropical, a bacia do rio Tramandaí apresenta elevada diversidade biológica considerando sua pequena extensão (MALABARBA et. al., 2013).

Esta elevada riqueza de espécies em uma área geográfica tão reduzida pode ser relacionada à diversidade de ambientes disponíveis bem como à origem histórica distinta de seus componentes (MALABARBA et. al., 2013). Estes se dividem em duas sub-regiões principais, cada uma delas com uma composição de ictiofauna característica: os rios e arroios da encosta da Serra Geral e os rios e lagoas da Planície Costeira e possuem, respectivamente, 155 e 106 espécies, entre descritas e não descritas (MALABARBA, 1989; MALABARBA; ISAIA, 1992).

Os ambientes de água doce da Serra Geral ocupam vales profundos erodidos em derrames basálticos de cerca de 125 a 138 milhões de anos. Embora não haja informações precisas quanto ao período de formação dos rios Maquiné e três Forquilhas, sua origem é muito mais antiga do que os ambientes da planície costeira (MALABARBA; ISAIA, 1992). Os ambientes da Serra Geral compreendem pequenos arroios formadores dos rios Maquiné e Três Forquilhas nos Campos de cima da Serra nos municípios de Itati, Maquiné e São Francisco de Paula. Várias espécies de peixes da bacia do rio Tramandaí tem sua distribuição, dentro da bacia, restrita a esta sub-região. Estas espécies, no entanto, ocorrem em outras bacias de rios costeiros ao norte da bacia do rio Tramandaí, nos vales dos rios Mampituba e Araranguá na encosta da Serra Geral, estando completamente ausentes nas bacias de rios localizadas ao sul do rio Tramandaí. Esta distribuição evidencia uma origem histórica comum da ictiofauna dos rios Maquiné e Três Forquilhas no norte do estado do Rio Grande do Sul com aqueles rios do sul do estado de Santa Catarina (MALABARBA; ISAIA, 1992).

Os ambientes de água doce da Planície Costeira (foz do rio Maquiné na lagoa dos Quadros e uma série de lagoas) ocupam uma área que estava completamente submersa há 150.000 anos, quando o nível do mar atingiu níveis 50m acima do nível

atual, tendo sido formada entre 60.000 e 6.000 anos no período da última glaciação em duas transgressões oceânicas. Estes ambientes têm normalmente fundo de areia ou lodo, a fauna de peixes encontrada nesses ambientes inclui desde espécies de pequeno porte associadas aos banhados e pequenos lagos e arroios, até as de grande porte e interesse comercial, encontradas nas zonas mais profundas das lagoas e canais naturais. Diferentemente da ictiofauna dos rios da encosta da Serra Geral, parte das espécies da ictiofauna dos corpos d'água da planície costeira são comuns àquelas registradas para a bacia da laguna dos Patos, ao sul da bacia do rio Tramandaí, evidenciando uma origem comum e mais recente deste componente da ictiofauna. Apesar desta semelhança, algumas espécies de peixes de água doce características da planície costeira do sistema do rio Tramandaí não ocorrem na bacia da laguna dos Patos, demonstrando o isolamento atual dos dois sistemas hidrográficos (MALABARBA et al., 2013).

A grande dimensão e conexão com o mar fazem da Laguna dos Patos um recurso hídrico considerável que, além de ser um local de refúgio e reprodução de diversas espécies de animais (CARVALHO; LACERDA; GRIEP, 2005), encontram-se no centro do desenvolvimento econômico do Estado do Rio Grande do Sul. As águas do Guaíba são utilizadas para o abastecimento público, esgotamento sanitário, drenagem urbana, indústria, agropecuária, turismo, esporte e lazer, e conseqüentemente possuem muitos problemas ambientais (FLORES-LOPES, 2006).

De acordo com Malabarba et al. (2004) a bacia do Guaíba apresenta nas suas imediações uma grande concentração urbana e industrial, recebendo diretamente ou através de seus afluentes diversas contribuições de poluentes por meio de despejos de efluentes industriais e domésticos. Regiões do Lago Guaíba como Gasômetro recebem as águas provenientes dos rios Caí, Sinos e Gravataí. Nesta região é lançada toda a carga de esgotos da zona central da cidade de Porto Alegre (FLORES-LOPES et al., 2001).

O Rio Grande do Sul destaca-se basicamente por dois cursos d'água, os que desaguam no Atlântico, já discutido, e os que desaguam no rio Uruguai (VIEIRA, 1984). O rio Uruguai é formado da confluência do rio Pelotas com o rio Canoas, a partir daí percorre um percurso de 2.200km de extensão, até a sua foz no estuário do rio da Prata. No início deste longo caminho, o rio Uruguai divide os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em seu trecho nacional. Após, em seu trecho compartilhado, o rio Uruguai materializa a fronteira entre o Brasil e a Argentina; a

seguir, deixa de banhar o território brasileiro, servindo de fronteira para o Uruguai e a Argentina. A área total drenada pelo rio, que se configura na Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai, é de cerca de 385.000km<sup>2</sup>, destes, 45% (ou seja, 174.412km<sup>2</sup>) estão situados em território nacional, o que corresponde a Região Hidrográfica do Uruguai, apenas 2% do território do país (PLANO NACIONAL DE RECURSOS HÍDRICOS, 2006).

No sistema do rio Uruguai, trabalhos com a comunidade ictiofaunística são relativamente escassos e incipientes quando comparado aos rios Paraná e Paraguai (WEIS et al., 1983; BERTOLETTI, 1985; BOSSEMEYER et al. 1985; BERTOLETTI et al. 1989; HAHN et al. 1997; DI PERSIA; NEIFF, 1980 apud COPATTI, ZANINI, VALENTE, 2009). A complexa origem do rio Uruguai no Plioceno e no Pleistoceno inferior (LATRUBESSE, STEVAUX, SINHA, 2005) pode ter colaborado de alguma forma com a diversidade de peixes desta bacia. Todavia não é possível afirmar com certeza o que gerou a riqueza de espécies encontrada hoje no rio Uruguai. Eventos naturais (geológicos e evolutivos), somados à enorme diversidade de habitats existentes na região, explicam a grande diversidade de espécies lá encontrada.

### 1.3 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DO GÊNERO *RINELORICARIA*

Os estudos cromossômicos realizados até o momento totalizam 15 espécies de *Rineloricaria* de diferentes regiões brasileiras, que foram reunidos na tabela 1, na tentativa de ilustrar a diversidade cariotípica. Fica evidente que os estudos concentram-se nas regiões hidrográficas do sul e sudeste, sem estudos para este gênero na região centro-oeste, norte e nordeste.

Os representantes do gênero *Rineloricaria* destacam-se por apresentar uma ampla variação no número diploide (2n) de 36 cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998), a 70 cromossomos em *Rineloricaria* sp. n. (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2003) e *Rineloricaria lima* (ROSA et al. 2012). Segundo Alves, Oliveira e Foresti (2003), a diferença no número diploide pode ser devido à ocorrência de grupos naturais ou alta taxa de evolução cariotípica, os autores afirmam que o elevado número diploide é acompanhado por um alto número de acrocêntricos, sugerindo a ocorrência de fissões cêntricas. Conforme Kavalco et al. (2005) tanto fissões, fusões cêntricas e inversões pericêntricas podem estar envolvidos na evolução cariotípica da subfamília Loricariinae. Em *R. latirostris* foi

descrito por Giuliano-Caetano (1998) um polimorfismo numérico e estrutural com a ocorrência de 11 citótipos diferentes, sugerindo a participação de eventos Robertsonianos na evolução desta espécie.

Com base nas tendências da evolução cariotípicas de Loricariinae é proposto que fissões cêntricas a partir da condição ancestral de  $2n=54$  originaram as variações no número diploide (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2003). Rosa et al. (2012) encontraram em *R. lima* uma variação cromossômica de 66 a 70 cromossomos, sendo proposta mais de uma hipótese para explicar tal variação. A primeira hipótese sugere que fissões a partir do cariótipo ancestral de  $2n=54$  tenha originado o cariótipo com 70 cromossomos e que as inúmeras fissões podem ter originado cromossomos sem sequências teloméricas, susceptíveis a degradação. A proteção da extremidade cromossômica pode ocorrer pela captura da região telomérica de outro cromossomo ou a adição de telômero por meio da atividade da telomerase. De acordo com os autores citados em *R. lima* prováveis rearranjos estruturais estabilizaram as fissões cromossômicas, favorecendo o aparecimento de todos os outros cariótipos, até o de 66 cromossomos.

A outra hipótese é que os pontos de fusão apresentem filamentos de cromatina que são indicativos de descondensação, genes de DNA repetitivo fornecem pontos de fusão devidos sua atividade de descondensação. Slijepcevic et al. (1997) afirmam que a descondensação da cromatina telomérica pode levar a fusões cromossômicas, mesmo em telômeros longos. Segundo Rosa et al. (2012) a presença de sítios de DNAr 5S em acrocêntrico, por fusão, poderia originar cromossomos metacêntricos em *R. lima* e os autores sugerem que os rearranjos de fusão são o principal mecanismo de estabilização dos pontos de fissão gerados. Isso foi comprovado pela presença de ITS (sítios intersticiais teloméricos) nas regiões pericentroméricas de alguns metacêntricos em *R. lima*, e seus cromossomos derivados, bem como a fusão de cromossomos transportando DNAr 5S na região terminal, formando metacêntricos e seus cromossomos derivados.

Porto (2012) observou em *R. lanceolata* polimorfismo cromossômico numérico e estrutural, bem como um polimorfismo de RON. O número diploide variou de 45 a 48, sendo identificados 10 citótipos. Para explicar tal polimorfismo foram sugeridos fusão cêntrica, fusão em tandem, inversão pericêntrica e cruzamentos aleatórios.

A região organizadora de nucléolo (RON) em Loricariideos é frequentemente descrita por muitos autores como Alves, Oliveira, Foresti (2003), Maia et al., (2010), Porto; Portela-Castro; Martins-Santos (2011) localizada em posição terminal e em um único par (RON simples), porém, nem sempre esta no mesmo par cromossômico do complemento nas diferentes espécies. Giuliano-Caetano (1998) descreveu o primeiro caso de RON na posição intersticial em *R. latirostris*, que foi confirmado por Rodrigues (2010), de RONS multiplas já foram descritas em *R. pentamaculata* (PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2011) e *R. lanceolata* (PORTO, 2012). É comum, também para este gênero RONS com e sem polimorfismo de tamanho sendo bem documentados por diversos autores como por Maia et al. (2010) em *R. pentamaculata*. A associação das RONS com as regiões heterocromáticas também é comum para o gênero, além de apresentar heterocromatina distribuída nas regiões pericentroméricas.

Porto, Portela-Castro e Martins-Santos (2011) encontraram um polimorfismo intrapopulacional em *R. pentamaculata*, e com base no padrão do bandamento C foi proposto dois eventos para explicar tal variação. Primeiro, não-disjunção meiótica, segundo a fusão cêntrica foram sugeridos como responsáveis pela formação do cromossomo submetacêntrico do par 28 heteromórfico. Porto, Portela-Castro e Martins-Santos (2010) estudando a mesma população de *R. pentamaculata* descreveu o primeiro caso de cromossomo B para este gênero, presente tanto no cariomórfio padrão, quanto no cariomórfio com o par heteromórfico. Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000) propõe que o cromossomo B seja um produto secundário da evolução do cariótipo padrão, ou seja, derivados a partir de polissomia de cromossomos A, por fragmentos cêntricos resultantes da fusão de cromossomos A ou amplificação de um fragmento da região pericentromérica de um cromossomo A. Assim, foi proposto que fragmentos cêntricos provenientes de rearranjos cromossômicos formaram o par heteromórfico em *R. pentamaculata*, podendo ser responsável pela origem dos microcromossomos B observados. Dessa forma podemos observar que o polimorfismo numérico também pode ou não estar relacionado com a presença de cromossomos Bs, além de também apresenta polimorfismo estrutural.

Rodrigues (2010) analisou nove espécies de *Rineloricaria* oriundos da bacia do Alto Paraná e drenagens costeiras (tabela 1). Das populações analisadas, algumas já foram caracterizadas citogeneticamente, como é o caso de *R. latirostris* e

*Rineloricaria* sp. n. Os cariomórfos descritos neste trabalho confirma os dados de Giuliano-Caetano (1998) sobre constituição cariotípica de parte das populações, localização de regiões organizadoras de nucléolo (RON), posição de heterocromatina, além da RONS heteromórficas encontradas em *R. latirostris*.

Alves, Oliveira e Foresti (2003) já haviam descrito o cariótipo de *Rineloricaria* sp. n com 70 cromossomos, porém a diferença entre esses autores e Rodrigues (2010) esta na classificação cariotípica, pois Alves, Oliveira e Foresti (2003) consideraram a constrição secundária do par portador das RONS na classificação dos cromossomos tendo 2 cromossomos metacêntricos e 68 acrocêntricos, já Rodrigues (2010) não considerou a constrição e classificou todos os 70 cromossomos como subtelo-acrocêntricos. O fato de levar em conta ou não a constrição secundária pode explicar as diferenças nos resultados na constituição cariotípica (RODRIGUES, 2010).

Maia et al. (2010) analisaram três espécies de *Rineloricaria* e encontraram em *R. cadeae* o número diploide de 64, diferindo do encontrado por Alves et al (2003) que foi de 66 cromossomos, ambos os trabalhos foram realizados com exemplares coletados na localidade tipo. Maia et al. (2010) também descreveram para *R. strigilata* 68 cromossomos sendo que Rodrigues (2010) encontrou 70 cromossomos, porém somente Maia et al. (2010) coletaram na localidade tipo. Os dados encontrados para *R. pentamaculata*, também por Maia et al. (2010) confirmam os dados obtidos por Porto; Portela-Castro; Martins-Santos (2010), Porto; Portela-Castro; Martins-Santos (2011) para esta espécie (tabela 1).

As regiões heterocromáticas descritas para este gênero são localizadas nas regiões pericentroméricas e colocalizadas a RON. Os estudos com coloração por fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI indentificaram que regiões ricas em CG, geralmente, são coincidentes com as RONS (GIULIANO-CAETANO, 1998; PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2010; MAIA et al., 2010).

O uso de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizado até o momento com sondas de DNAr 18S e 5S e sonda de sequência telomérica. Porto; Portela-Castro; Martins-Santos (2011) encontraram sítios de DNA 18S correspondentes as marcações com nitrato de prata em *R. pentamaculata* confirmando o padrão de RON simples e confirmaram o primeiro caso de RONS multiplas. Mendes-Neto (2008) determinou a localização do gene ribossomal 5S na região pericentromérica de dois pares, um de tamanho médio e o outro pequeno em *Rineloricaria* cf. *latirostris*. Rosa

et al. (2012) utilizaram sonda telomérica e DNAr 5S em *Rineloricaria lima* como uma ferramenta para ajudar a caracterizar a espécie e entender os mecanismos envolvidos na diversificação deste grupo.

As espécies de *Rineloricaria*, de acordo com dados da literatura (Tabela 1), apresentam polimorfismos cromossômicos intrapopulacionais e foram, descritas em sua maioria, para a bacia do Alto Paraná. Os representantes do gênero *Rineloricaria* não são migradores e apresentam hábitos sedentários, habitando pequenos riachos de pouca profundidade e forte correnteza. Sendo assim, os rios de maior vazão funcionam como barreiras para essas populações, isolando-as em rios de menor porte e facilitando eventos de vicariância, podendo levar a um evento de especiação alopátrico e endemismo (RODRIGUES, 2010).

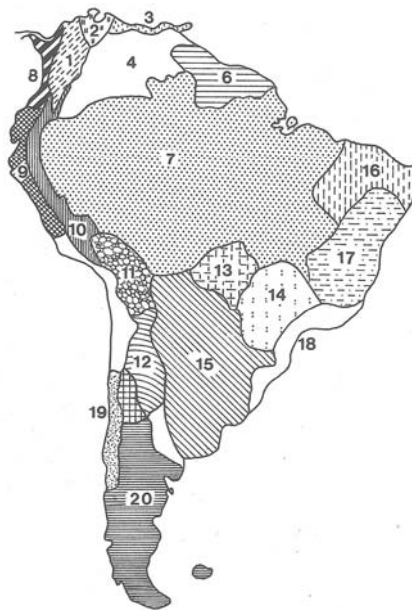
Limeira, Renesto e Zawadzki (2009) realizaram comparação aloenzimática em um morfotipo de *R. pentamaculata*, do rio Keller no trecho médio da bacia do rio Ívai e em outro, *Rineloricaria aff. pentamaculata*, do rio São João, na porção superior da bacia do rio Ívai. As duas amostras diferem em frequências alélicas em três locus polimórficos e, também, morfologicamente, sendo que as bacias são isoladas geograficamente e é provável, segundo os autores, que ambas as populações representem espécies *status nascendi*, ou seja, em processo de especiação.

Diante deste cenário, este trabalho realizou uma análise citogenética em exemplares de *Rineloricaria* capturados em diferentes bacias hidrográficas do Brasil, comparando os dados obtidos com aqueles da literatura, buscando contribuir com a taxonomia, biogeografia ao entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica do gênero.

**Figura 1** – Áreas ictiogeográficas da América do Sul: 1-Domínio Magdalena; 2-Província Maracaibo; 3-Província Costa do Caribe; 4-Província Orinoquo; 5-Província Trindade; 6-Província Guianense; 7-Província Amazonense; 8-Província Nor-Pacífica; 9-Província Guianas; 10-Província Nor-Andina; 11-Titicaca; 12-Sul-Andino Guiana; 13-Província Alto Paraguai; 14-Província Anto Paraná; 15-Província Parano-Platence; 16-Província Nordeste do Brasil; 17-Província do rio São Francisco; 18-Província rios costeiros Sudoeste do Brasil; 19-Província Chilena; 20-Província Patagônia (SCHÄFER, 1984).



**Figura 2** – Divisão hidrográfica nacional (CONEJO et al., 2005)



**Tabela 1** – Dados cromossômicos de espécies de *Rineloricaria* disponíveis na literatura e seus respectivos locais de coleta

ESPÉCIE	LOCALIDADE-ESTADO	2n	FÓRMULA CARIOTÍPICA	BC	RONs	REFERÊNCIAS.
<b>Bacia do Atlântico Sul</b>						
<i>R. cadeae</i>	Lago Guaíba-Rio Grande do Sul	64	2m-sm+62st-a	RP,CS,	Terminal (par 2)	Maia et al. 2010
	Lago Guaíba- Rio Grande do Sul	66	2m-sm+64st-a	RP,CS,	Terminal (par 9)	Alves; Oliveira; Foresti, 2003
<i>R. strigilata</i>	Rio Forquetinha- Rio Grande do Sul	68	6m-sm+62st-a	RP,CS,	Terminal (par 9)	Maia et al. 2010
<i>R. kronei</i>	Rio Itapocu-Santa Catarina	64	6m-sm+48st-a	RP,CS,	Terminal (par 5)	Alves; Oliveira; Foresti, 2003
<b>Bacia do Atlântico Sudeste</b>						
<i>R. cf. nigricauda</i>	Ribeirão Bonito-RJ	70	70st-a	RP,CS,	Terminal (par 4)	Rodrigues, 2010
<i>Rineloricaria sp.1</i>	Rio São José-RJ	62	2m-sm+60st-a	RP,CS,	Terminal (par 2)	Rodrigues, 2010
<i>Rineloricaria sp.2</i>	Rio Paraíba do Sul-RJ	62	2m-sm+60st-a	RP,CS,	Terminal (par 2)	Rodrigues, 2010
		62	4m-sm+ 58 st-a	RP,CS,	Terminal (par 3)	Rodrigues, 2010
		62	8m-sm+ 54st-a	RP,CS,	Terminal (par 5)	Rodrigues, 2010
<i>Rineloricaria sp.3</i>	Córrego Passa Vinte-SP	62	8m-sm+54st-a	RP,CS,	Terminal (par 5)	Rodrigues, 2010
<i>Rineloricaria sp.4</i>	Rio Jurumirim-RJ	64	6m-sm+58st-a	RP,CS,	Terminal (par 5)	Rodrigues, 2010
<i>Rineloricaria sp.5</i>	Riacho da Baía de Paranaguá-PR	68	2m-sm+66st-a	RP,CS,	Terminal (par 3)	Rodrigues, 2010
<i>Rineloricaria sp.n</i>	Rio Jucupiranga-SP	68	3m-sm+65st-a	RP,CS,	Terminal (par 4)	Rodrigues, 2010
		70	70st-a	RP,CS,	Terminal (par 2)	Rodrigues, 2010
	Rio Betari-SP	70	70st-a	RP,CS,	Terminal (par 1)	Rodrigues, 2010
<i>R. cf. latirostris</i>	Rio São Francisco-MG	48	14m-sm+34st-a	RP,CS,	Terminal (par 10)	Mendes-Neto, 2008
<b>Bacia do alto Paraná</b>						
<i>R. latirostris</i>	Rio Mogi-guaçu-SP	36	24m-sm+12st-a	RP,CS,	Intersticial (par 2)	Giuliano-Caetano, 1998
		37	23m-sm+14st-a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		38	22m-sm+16st-a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		39	21m-sm+18st-a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		40	20m-sm+20st-a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		40	20m-sm+20st-a	RP,CS,	Intersticial	Rodrigues, 2010
	Rio Passa Cinco-SP	44	16m-sm+28a	RP,CS,	Intersticial (par 2)	Giuliano-Caetano, 1998
		44	14m-sm+30a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	15m-sm+29a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	17m-sm+27a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	13m+1sm+30a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	10m+4sm+30a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	10m+3sm+31a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	16m+28a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		45	15m+30a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998

		46	14m+32a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		46	10m+4sm+32a	RP,CS,	Intersticial	Rodrigues, 2010
		47	13m+34a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
	Ribeirão Três Bocas-PR	43	17m+23a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		44	16m+28a	RP,CS,	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		46	14m+32a	RP,CS	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		47	13m+34a	RP,CS	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
		48	12m+36a	RP,CS	Intersticial	Giuliano-Caetano, 1998
<i>R. pentamaculata</i>	Rio Taquaral-SP	58	4m-sm+54st-a	RP,CS	Terminal (par 3)	Rodrigues, 2010
	Rio Jacucaca-PR	56	8m-sm+48st-a	RP,CS	Terminal (par 5)	Maia et al. 2010
	Rio Keller-PR	56	8m-sm+48st-a	RP,CS	Terminal (par 5)	Porto; Portela-Castro; Martins-Santos, 2011
	Córrego Tatupeba-PR	56	8m-sm+48st-a	RP,CS	Múltiplas: pares 5 e 8	Porto; Portela-Castro; Martins-Santos, 2011
	Rio Tauá-PR	56	8m-sm+48st-a	RP,CS	Terminal (par 5)	Porto; Portela-Castro; Martins-Santos, 2011
	<b>Cromossomos B (2-4)</b>					
<i>Rineloricaria lima</i>	Ribeirão da Areia-PR e Rio Açungui-PR	66	3m-sm+63a	RP,CS	Terminal (par:3)	Rosa et al. 2012
		68	4m-sm+ 64a	RP,CS	Terminal (par 3)	Rosa et al. 2012
		68	2m-sm+66a	RP,CS	Terminal (par 2)	Rosa et al. 2012
		69	2m-sm+67a	RP,CS	Terminal (par 2)	Rosa et al. 2012
		69	1m+68a	RP,CS	Terminal (par 2)	Rosa et al. 2012
		70	2m+68a	RP,CS	Terminal (par 2)	Rosa et al. 2012
	<b>Bacia do alto Paraguai</b>					
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	Corrego do Onça-MS	45	4m+2sm+2st+37a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		46	3m+2sm+2st+39a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		46	4m+2sm+2st+38a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		46	2m+2sm+2st+40a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		47	4m+1sm+2st+40a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		47	3m+1sm+2st+41a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		47	2m+1sm+2st+42a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		48	4m+2st+42a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		48	3m+2st+43a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012
		48	3m+2sm+2st+41a	RP, CS, I	Terminal, Intersticial	Porto, 2012

2n=número dipóide, BC=bandamento C, RP=região pericentromérica, CS=constrição secundária, I=região intersticial, RON=região organizadora de nucléolo

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar citogeneticamente diferentes espécies da subfamília Loricariinae, descrevendo as características cromossômicas e verificar se existem padrões cariotípicos associados às diversas regiões geográficas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os cromossomos mitóticos das espécies coletadas do gênero *Rineloricaria* a fim de determinar seu número diploide e fórmula cariotípica;
- Detectar as regiões organizadoras de nucléolos e a distribuição da heterocromatina para determinar seu padrão de distribuição nas espécies e definir possíveis marcadores;
- Evidenciar regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e AT a fim de determinar a constituição das regiões organizadoras de nucléolo e regiões heterocromáticas;
- Localizar os sítios ribossômicos 18S e 5S a fim de determinar possíveis marcadores para o grupo;
- Definir um padrão biogeográfico e cromossômico;
- Contribuir com mais dados citogenéticos para o gênero *Rineloricaria* para um melhor entendimento da sua estrutura e evolução cariotípicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA

Foram nove espécies pertencentes ao gênero *Rineloricaria* de diferentes bacias hidrográficas (tabela 2).

##### Bacia do alto Paraná (Paraná)

- *Rineloricaria pentamaculata* coletada no ribeirão Jacucaca (afluente do rio Tibagi);
- *Rineloricaria pentamaculata* coletada no ribeirão Queixada (afluente do rio Ivaí).

##### Bacia do rio Tramandaí (Rio Grande do Sul)

- *Rineloricaria aequalicuspis* foi coletada no rio Maquiné;
- *Rineloricaria strigilata* foi coletada na lagoa da Cerquinha e
- *Rineloricaria quadrensis* na lagoa dos Quadros.

##### Bacia da Laguna dos Patos (Rio Grande do Sul)

- *Rineloricaria microlepidogaster*, *Rineloricaria cadeae* e *Rineloricaria malabarbai* foram coletadas no rio Forquetinha.

##### Bacia do alto Paraguai (Mato Grosso do Sul)

- *Rineloricaria parva* foi coletada no rio Miranda, localizado no Pantanal sul Matogrossense.

##### Bacia do Uruguai (Misiones, Argentina)

- *Rineloricaria* cf. *reisi.*, coletada no arroio Chimiray, no município de Azara, província de Misiones (ARG)

(figura 3 e figura 4).

As espécies foram tombadas no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.

**Tabela 2** – Lista de espécies analisadas, com dados de locais de coleta e coordenadas geográficas

Espécie	Localidade	Município	Coordenadas	
			Sul (S)	Oeste (W)
	<b>Bacia do alto Paraná</b>			
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	ribeirão Jacucaca	Califórnia-Paraná	23°38'18.5"	51°20'44.9"
	ribeirão Quexada	Borrazópolis-Paraná	23°56'9.65"	51°39'26.08"
	<b>Bacia do alto Paraguai</b>			
<i>R. parva</i>	rio Miranda	Corumbá-Mato Grosso do Sul	19°34'36.88"	57°01'5.87"
	<b>Bacia do rio Tramandaí</b>			
<i>R. aequalicuspis</i>	rio Maquiné	Maquiné-Rio Grande do Sul	29°39'10.4"	50°12'31.8"
<i>R. strigilata</i>	lagoa da Cerquinha	Cidreira- Rio Grande do Sul	30°13'56.52"	50°15'40.93"
<i>R. quadransis</i>	lagoa dos Quadros	Capão da Canoa- Rio Grande do Sul	29°44'42.8"	50°06'54.3"
	<b>Bacia da Laguna dos Patos</b>			
<i>R. microlepidogaster</i>	rio Forquetinha	Canudos do Vale- Rio Grande do Sul	29°24'22.4"	52°03'19.2"
<i>R. cadeae</i>	rio Forquetinha	Canudos do Vale- Rio Grande do Sul	29°24'22.4"	52°03'19.2"
<i>R. malabarbai</i>	rio Forquetinha	Canudos do Vale- Rio Grande do Sul	29°24'22.4"	52°03'19.2"
	<b>Bacia do rio Uruguai</b>			
<i>Rineloricaria cf. reisi</i>	Arroio Chimiray	Misiones-ARG	28°08'00.76"	55°36'36.79"

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Obtenção de Cromossomos Mitóticos

A técnica utilizada foi adaptada para peixes por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978) que consiste em:

- a) Injetar intraperitonealmente, solução aquosa de colchicina a 0,025% na proporção de 1mL/100g de peso do animal.  
Observação: antes do sacrifício, o animal é anestesiado com benzocaína (15ml de solução estoque em 5L de água)
- b) Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50', sacrificando-o em seguida e retirando a porção do rim posterior.
- c) Lavar o material retirado em solução hipotônica de KCl a 0,075M, transferindo-o para uma pequena cuba de vidro contendo 6 mL dessa solução.
- d) Divulsionar o material com pinças de dissecação para separação de células, completando esse processo com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, através de movimentos de aspiração e expiração do material.
- e) Colocar a solução obtida em estufa a 36-37 °C por 20 minutos.
- f) Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pauster, transferindo em seguida para o tubo de centrífuga, desprezando os blocos de tecidos não desfeitos.
- g) Centrifugar durante 10 minutos, a 800-1000 rpm e, em seguida, descartar o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta Pauster.
- h) Adicionar, vagarosamente, 5 a 6 mL de fixador (metanol e ácido acético 3:1) gelado, deixando-o escorrer através de paredes do tubo.
- i) Ressuspender o material, com o auxílio da pipeta Pauster, centrifugando por mais 10 minutos com a mesma rotação descrita no item 7.
- j) Repetir os itens 8 e 9 por 2 vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante adicionar 1 a 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de sedimento e ressuspender bem o material.
- k) Pingar duas gotas de suspensão, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa e seca.
- l) Deixar diretamente ao ar para completar a secagem.

- m) Corar com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 por 10 minutos e lavar com água destilada.
- n) Secar ao ar.

### 3.2.2 Classificação Cromossômica

Os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos) conforme a relação de braços, segundo Levan, Fredga e Sanderg (1964). O limite da relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

- RB=1,00-1,70 metacêntrico (m);
- RB=1,71-3,00 submetacêntrico (sm);
- RB=3,01-7,00 subtlocêntrico (st);
- RB=>7,00 acrocêntrico (a)

Os cromossomos m-sm e st-a foram agrupados conforme estudos citogenéticos anteriores em Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; RUBERT; ZAWADZKI; GIULIANO-CAETANO, 2008). Os cromossomos foram analisados em microscópio Leica DM 2000. Para a captura das imagens foi utilizado o software Motic Image Plus 2.0.

### 3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONS)

A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi feita conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980), como se segue:

- a) Pingar sobre a lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2% (1 g de gelatina em 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada mais 0,5 mL de ácido fórmico).
- b) Adicionar, sobre a gota anterior, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% (0,5 g AgNO<sub>3</sub> em 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada). Misturar bem e cobrir com lamínula.
- c) Incubar em estufa a 60 °C, por um período de aproximadamente 5 minutos, para que as lâminas adquiram uma coloração marrom dourada.

- d) Retirar da estufa e remover a lamínula com a ajuda de um jato de água destilada.
- e) Deixar secar ao ar.

#### 3.2.4 Detecção da Região de Heterocromatina (Banda C)

Para o estudo da heterocromatina foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

- a) Tratar a lâmina contendo cromossomos mitóticos com uma solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente, durante 15 ou 30 minutos.
- b) Lavar em água deionizada e secar ao ar.
- c) Submergir as lâminas numa cuba contendo solução de hidróxido de bário a 5% por 10 a 60 segundos, a 60 °C.
- d) Lavar em solução de HCl 0,2N.
- e) Lavar em água deionizada e secar ao ar.
- f) Incubar as lâminas numa solução salina de 2xSSC, aquecida por 45 minutos a 60° C.
- g) Lavar em água deionizada e secar ao ar.
- h) Corar com Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 5 minutos.
- i) Lavar em água deionizada e secar ao ar.

#### 3.2.5 Dupla Coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI

A técnica utilizada foi descrita por Schweizer (1980) com algumas modificações:

- a) Colocar cerca de 40 µl de solução de cromomicina (CMA<sub>3</sub>) sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora;
- b) Escorrer a lamínula e lavar com água. Secar levemente;
- c) Colocar cerca de 40 µl de solução DAPI 0,2 µg/ml sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 15 minutos;
- d) Escorrer a lamínula e lavar com água.
- e) Deixar a lâmina secar ao ar.
- f) Cobrir com lamínula em meio de montagem glicerol/McIlvaine. Esperar de 3 a 15 dias para analisar.

### 3.2.6 Hibridação *in situ* por Fluorescência – FISH

O protocolo descrito a seguir foi baseado nos procedimentos adotados por Pinkel et al. (1986), com modificações.

### 3.2.7 Preparações de Lâminas

- Desidratar em série de etanol 70% e 100%, 5 minutos cada e logo após secar ao ar.

#### 3.2.7.1 Tratamento com RNase

- Colocar 90  $\mu\text{L}$  de RNase uso (0,4% RNase/2xSSC) em cada lâmina, cobrir com uma lamínula plástica e incubar a 37°C por uma hora em câmara úmida.  
**RNase uso:** - 0,4  $\mu\text{L}$  de RNase estoque (10mg/mL) x nº de lâminas - 100  $\mu\text{L}$  de 2xSSC x nº de lâminas
- Lavar as lâminas em 2xSSC por 10 minutos a temperatura ambiente no agitador.
- Lavar as lâminas em paraformaldeído 4% a temperatura ambiente, por 10 minutos no agitador.
- Descartar o paraformaldeído no vidro de descarte apropriado e colocar novamente 2xSSC, por 10 minutos, no agitador.
- Descartar o 2xSSC e colocar 1xPBS, por 5 minutos, no agitador.
- Descartar o 1xPBS e colocar álcool etílico 70% por 5 minutos, no agitador.
- Descartar o álcool 70% e colocar o álcool 100% por 5 minutos, não precisa agitar.
- Descartar o álcool 100% e deixar as lâminas secando a temperatura ambiente por no mínimo 30 min ou no máximo 3 horas.
- Preparar o mix de hibridação.

#### **Mix de Hibridação: (quantidade suficiente para uma lâmina)**

Em um tubo Eppendorf 0,6 mL adicionar:

- 7,5  $\mu\text{L}$  da sonda marcada,
- 30  $\mu\text{L}$  de formamida (concentração final 50%),

-12  $\mu\text{L}$  de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%)

-10,5  $\mu\text{L}$  de 20xSSC

- Desnaturar as lâminas em formamida 70%\*\*\* a 70° C por 4 minutos.

**Formamida 70%:** - 24,5 mL Formamida

- 10,5 mL 2xSSC

- Imediatamente desidratar as lâminas em série de etanol 50% e 100% por 5 minutos cada, ambas no gelo. Deixar secar ao ar.
- Colocar o mix de hibridação no banho-maria previamente aquecido a 80°C, por 10 minutos.
- Retirar e colocar imediatamente no gelo até o uso (no mínimo 10 minutos).

### 3.2.7.2 Hibridação

- Colocar 50  $\mu\text{L}$  do mix de hibridação sob lamínula de vidro, colocando em seguida o lado da lâmina com o material em contato com a lamínula. Incubar as lâminas de maneira invertida (lamínula para baixo) em câmara úmida a 37°C, *overnight*.

### 3.2.7.3 Lavagens pós-hibridação:

- Colocar as soluções de 2xSSC e 1xPBS no banho-maria para aquecer a 45°C. Preparar solução de 1xPBD.

**1xPBD (para 1000 mL). Quantidade calculada para lavagem de 4 lâminas**

- 200 mL 20xSSC;
- 6 mL Triton 100;
- 10 g de leite em pó desnatado;
- 800 mL água destilada qsp. 100; pH 7,0

- Lavar as lâminas em 2xSSC aquecido a 45°C por 5 minutos com agitação, repetir mais uma vez essa lavagem.

- Lavar as lâminas em 1x PBS aquecido a 45°C por 10 minutos com agitação.

### 3.2.7.4 Detecção e amplificação do sinal

- Incubar as lâminas em 1xPBD.

- Colocar 50  $\mu\text{L}$  da solução de detecção sobre uma lamínula de plástico.

**Solução de detecção avidina-FITC** (quantidade por lâmina):

5 µL de FITC (1:100) + 45µL de BSA 5% x nº lâminas

**\*para Double FISH:**

0,25 µL de anti-Digoxigenina + 5 µL de FITC (1:100) + 44,75 µL de BSA 5% x nº lâminas

- Inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 1 hora em câmara úmida a 37°C;
- Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1xPBD a 45°C, por 5 minutos, NO ESCURO.

**3.2.7.5 Caso deseje amplificar o sinal**

- Incubar com 40 µL de anti-avidina-biotina conjugada (1,0 µL anti-avidina + 39 µL 1xPBD) por lâmina durante 20 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C

Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1xPBD a 45°C, por 5 minutos, NO ESCURO.

- Sobre uma lamínula colocar 3,5 µL de FITC (1:100) + 46,5 µL de BSA 5%.

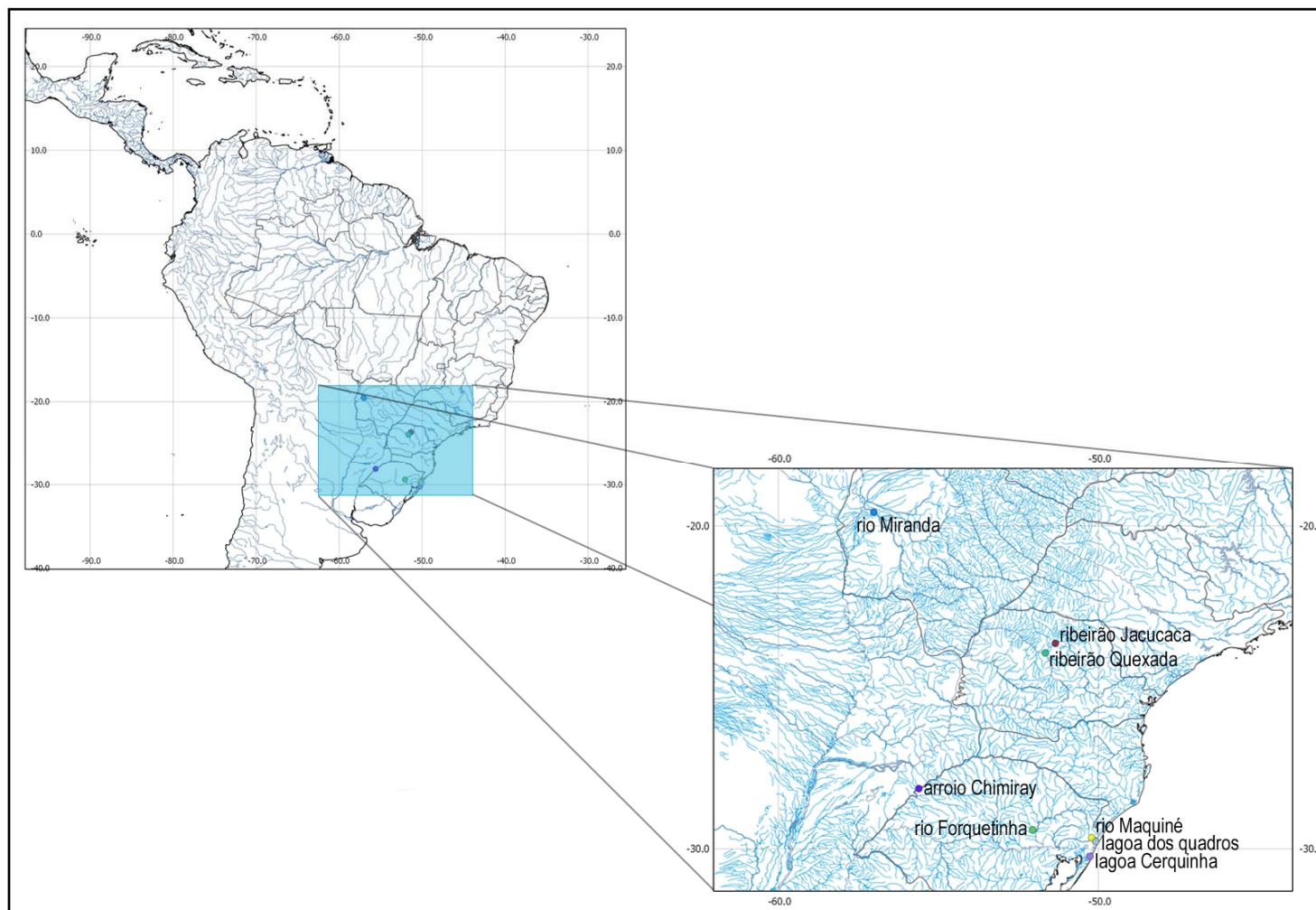
Inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 20 minutos em câmara úmida a 37°C;

- Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1xPBD a 45°C, por 5 minutos, NO ESCURO.

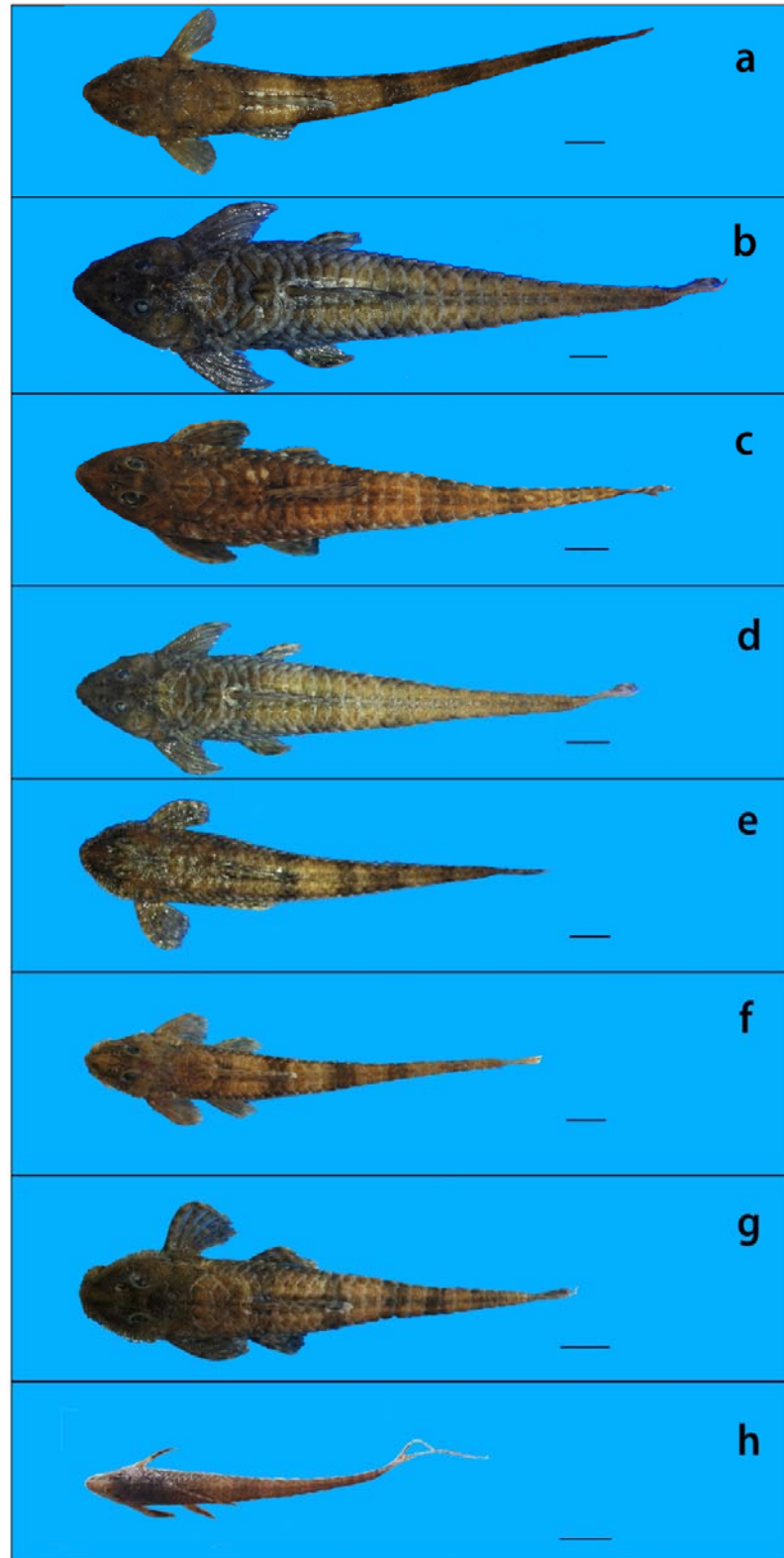
**3.2.7.6 Montagem das lâminas**

Incubar a lâmina em 1xPBD até a montagem. Na proporção de 25µL de meio de montagem DABCO + 1µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM + 1µL de solução de Iodeto de Propídio (50µg/mL); ou 1 µL DAPI (2µg/mL) por lâmina. Guardar no escuro a 4°C.

**Figura 3** – Locais onde foram feitas as coletas. Rio Miranda (bacia do rio Paraguai), ribeirão Jacucaca (bacia do rio Tibagi), ribeirão Quexada (bacia do rio Ivaí), arroio Chimiray (bacia do rio Uruguai), rio Forquetinha (bacia da Laguna dos Patos), rio Maquiné (bacia do rio Tramandaí), lagoa dos Quadros (bacia do rio Tramandaí) e lagoa Cerquinha (bacia do rio Tramandaí).



**Figura 4** – Exemplos das espécies estudadas do gênero *Rineloricaria* e *Sturisoma*. Em a: *R. pentamaculata*; b: *R. aequaliscuspis*; c: *R. strigilata*; d: *R. microlepidogaster*; e: *R. cadeae*; f: *R. quadrensis*, g: *R. malabarbai*, h: *R. parva*, i: *S. robustum*



# CAPÍTULO 1

## **ASPECTOS BIOGEOGRÁFICOS ASSOCIADOS A DADOS CROMOSSÔMICOS DE *Rineloricaria* (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIIDAE)**

## ASPECTOS BIOGEOGRÁFICOS ASSOCIADOS A DADOS CROMOSSÔMICOS DE *Rineloricaria* (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIIDAE)

Natália Bortholazzi Venturelli<sup>1</sup>, Fabio Hiroshi Takagui<sup>1</sup>, Mônica Sônia Rodriguez<sup>2</sup>,  
Lucia Giuliano-Caetano<sup>1</sup>

### RESUMO:

O gênero *Rineloricaria* é composto por 65 espécies sendo que há dados citogenéticos de apenas 15. Estes dados são disponíveis para as regiões sul, sudeste e centro oeste do Brasil, não há dados para as regiões norte e nordeste. Apesar de poucas espécies estudadas os resultados demonstram grande variabilidade cariotípica no gênero. O presente estudo apresenta dados de número diploide ( $2n$ ) das seguintes espécies: *Rineloricaria pentamaculata* ( $2n=56$ ), *Rineloricaria parva* ( $2n=60$ ), *Rineloricaria* cf. *reisi* ( $2n=60$ ), *Rineloricaria aequalicuspis* ( $2n=68$ ), *Rineloricaria strigilata* ( $2n=70$ ), *Rineloricaria quadrensis* ( $2n=70$ ), *Rineloricaria microlepidogaster* ( $2n=68$ ), *Rineloricaria cadeae* ( $2n=64$ ) e *Rineloricaria malabarbae* ( $2n=64$ ). O alto número diploide ( $2n$ ) foi encontrado tanto nas bacias litorâneas (bacia do rio Tramandaí e bacia da laguna dos Patos) quanto nas bacias do interior do continente (bacia do rio Paraguai e bacia do rio Uruguai). Constatou-se que o número diploide de 56 é exclusivo de *R. pentamaculata* e que a espécie *Rineloricaria parva* coletada no interior do continente (bacia do rio Paraguai) apresentou 60 cromossomos e o primeiro par meta-submetacêntrico portador de uma constrição secundária terminal no braço curto sendo considerada uma característica citotaxonômica importante. *Rineloricaria aequalicuspis*, *R. microlepidogaster*, *R. strigilata* apresentaram características citogenéticas semelhantes apesar de estarem em bacias distintas. Este fato é uma evidência de que as bacias do Paraná, Paraguai e Atlântico Sul tiveram uma mesma origem, e o isolamento e os rearranjos possibilitaram a diversificação encontrada no gênero *Rineloricaria*

**Palavras-Chave:** *Rineloricaria*. Diversidade genética. Biogeografia.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia geral, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil, natalia\_venturelli@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Parnaíba, Rodovia MG-230 Km7 CEP: 38810-000, Rio Parnaíba, Minas Gerais, Brasil. msrodriguezx@gmail.com

## INTRODUÇÃO

O gênero *Rineloricaria* é composto por 65 espécies sendo que há dados citogenéticos de apenas 15. Estes dados encontram-se resumidos na tabela 3 e demonstram uma variação no número diploide de ( $2n$ ) 36 em *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998), a 70 cromossomos em *Rineloricaria* sp. n. (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2003) e *Rineloricaria lima* (ROSA et al. 2012).

A diferença no número diploide pode ser devido à ocorrência de grupos naturais ou alta taxa de evolução cariotípicas no gênero *Rineloricaria*, o elevado número diploide observado em alguns Loricariinae é acompanhado por um alto número de acrocêntricos sugerindo a ocorrência de fissões cêntricas (ALVES, OLIVEIRA, FORESTI, 2003). Conforme Kavalco et al. (2005) tanto fissões, fusões cêntricas e inversões pericêntricas podem estar envolvidas na evolução cariotípica da subfamília Loricariinae.

Em *R. latirostris* foi descrito por Giuliano-Caetano (1998) um polimorfismo numérico e estrutural com a ocorrência de 11 citótipos diferentes, sugerindo a participação de eventos Robertsonianos na evolução desta espécie. Porto (2012) observou em *R. lanceolata* polimorfismo cromossômico numérico e estrutural, bem como um polimorfismo da região organizadora de nucléolo (RON). O número diploide em *R. lanceolata* variou de 45 a 48 cromossomos, sendo identificados 10 citótipos. Para explicar tal polimorfismo foi sugerido por Porto (2012) fusão cêntrica, fusão em tandem, inversão pericêntrica e cruzamentos aleatórios.

Com base nas tendências da evolução cariotípicas de Loricariinae é proposto que fissões cêntricas a partir da condição ancestral de  $2n=54$  originaram as variações no número diploide (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2003). Baseada nessa hipótese Rosa et al. (2012) propuseram que fissões a partir do cariótipo ancestral de  $2n=54$  podem ter originado cromossomos instáveis em *R. lima*, prováveis rearranjos estruturais estabilizaram essas fissões cromossômicas, originaram o polimorfismo observado de 66 a 70 cromossomos.

Este gênero é o maior da subfamília Loricariinae e, é um gênero que apresenta confusões taxonômicas. A princípio as espécies de *Hemiloricaria* foram consideradas sinônimos de *Rineloricaria* (ISBRÜCKER, 1980) e posteriormente *Hemiloricaria* foi revalidada (ISBRÜCKER, 2001). Em 2008, Rodriguez, Reis (2008) sugeriram uma explicação para apoiar que tanto *Hemiloricaria* e *Rineloricaria* são

válidos, com base nos caracteres morfológicos e distribuição das espécies. Segundo estes autores, *Hemiloricaria* corresponde a mais ampla distribuição dos gêneros *Rineloricaria* e *Hemiloricaria*, encontrado em toda a América do Sul, exceto na Bacia do alto Paraná e drenagens costeiras do Atlântico. Rodriguez, Reis (2008) afirmam que *Rineloricaria* encontram-se distribuído apenas ao longo da bacia do rio Paraná e drenagens costeiras do Atlântico desde o Uruguai até o Nordeste do Brasil.

Entretanto, espécies de *Rineloricaria* foram descritas na região geográfica de *Hemiloricaria*, sendo necessárias análises filogenéticas para apoiar tal identificação. (PY-DANIEL E FICHBERG, 2008; FICHBERG E CHAMON, 2008; VERA-ALCARAZ, PAVANELLI E ZAWADZKI, 2012).

A distribuição biogeográfica das espécies dos gêneros *Rineloricaria* e *Hemiloricaria* podem estar relacionados com os eventos geológicos antigos, pois, durante este período (aproximadamente 500 milhões de anos atrás), os continentes se reuniam e originavam a maior parte das províncias estruturais presentes hoje no continente sul-americano (RIBEIRO, LIMA E MENEZES, 2011). Estas diferentes províncias constituem-se na maioria dos Escudos Cristalinos, ou seja, a maior porção do atual continente sul-americano. Ainda, segundo estes autores muitos dos eventos tectônicos que se desenrolaram posteriormente, muitos deles ativos, originaram importantes elementos da paisagem sul-americana, tais como bacias tectônicas modernas como o Pantanal e a depressão do Araguaí-Tocantins, entre outras. Estas mudanças são responsáveis pela distribuição das espécies de peixes que se encontram amplamente distribuídas ou isoladas.

A ampla distribuição do gênero esta provavelmente relacionada à biogeografia de peixes e classificação regional de áreas ictiogeográficas, esse resultado reforça a interpretação de que uma região liminozoogeográfica não é determinada unicamente pelas bacias dos grandes sistemas fluviais, mas também pelos fatores histórico-ecológicos, possibilitando, ou não, a fixação de grupos de animais e plantas em regiões muito pequenas ou mais amplas (SCHÄFER, 1984).

Os dados do presente trabalho e da literatura (Tabela 1) mostram que os estudos concentram-se nas regiões hidrográficas do sul e sudeste, com poucos estudos ou nenhum na região centro-oeste, norte e nordeste. Sendo, ainda, insuficientes para determinar o comportamento cromossômico do gênero ao longo do tempo nas bacias.

Aliado a diversidade genética há também as confusões taxonômicas em relação à divisão de *Rineloricaria*, as falhas na descrição do grupo permitem discussões quanto às espécies que compõem os gêneros. Este trabalho buscou contribuir com mais dados citogenéticos de novas espécies na tentativa de elucidar melhor a distribuição biogeográfica e cromossômica deste gênero.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas diferentes espécies pertencentes ao gênero *Rineloricaria* de diferentes bacias hidrográficas.

### Bacia do alto Paraná (Paraná)

- 6 indivíduos de *Rineloricaria pentamaculata* coletada no ribeirão Jacucaca (afluente do rio Tibagi);
- 10 indivíduos de *Rineloricaria pentamaculata* coletada no ribeirão Queixada (afluente do rio Ivaí).

### Bacia do rio Tramandaí (Rio Grande do Sul)

- 27 indivíduos de *Rineloricaria aequalicuspis* foi coletada no rio Maquiné;
- 5 indivíduos de *Rineloricaria strigilata* foi coletada na lagoa da Cerquinha e;
- 11 indivíduos de *Rineloricaria quadrensis* na lagoa dos Quadros.

### Bacia da Laguna dos Patos (Rio Grande do Sul)

- 11 indivíduos de *Rineloricaria microlepidogaster*, 7 indivíduos de *Rineloricaria cadeae* e 4 indivíduos de *Rineloricaria malabarbai* foram coletadas no rio Forquetinha.

### Bacia do alto Paraguai (Mato Grosso do Sul)

- 19 indivíduos de *Rineloricaria parva* foi coletada no rio Miranda, localizado no Pantanal sul Matogrossense.

Bacia do Uruguai (Misiones, Argentina)

- 9 indivíduos de *Rineloricaria* cf. *reisi*, coletada no arroio Chimiray, no município de Azara, província de Misiones (ARG)

A obtenção de cromossomos mitóticos foi segundo Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978).

## RESULTADOS

A espécie *Rineloricaria pentamaculata* do rio Jacucaca e ribeirão Quexada, bacia do alto Paraná, apresentou 56 cromossomos sendo 8 meta-submetacêntricos e 48 subtelo-acrocêntricos (figura 1a).

A espécie *Rineloricaria parva* do rio Miranda (MS), bacia do rio Paraguai apresentou 60 cromossomos sendo 6 meta-submetacêntricos e 54 subtelo-acrocêntricos (figura 1b).

A espécie *Rineloricaria* cf. *reisi*, do arroio Chimiray, bacia do rio Uruguai apresentou 60 cromossomos todos subtelo-acrocêntricos (figura 1c).

As espécies estudadas na bacia do rio Tramandaí (RS) foram: *Rineloricaria aequalicuspis* com 68 cromossomos subtelo-acrocêntricos (figura 1d); *R. strigilata* que apresentou 70 cromossomos, sendo 8 cromossomos meta-submetacêntricos e 62 cromossomos subtelo-acrocêntricos (figura 1e); e *Rineloricaria quadrensis* com 70 cromossomos, sendo 8 meta-submetacêntricos e 62 subtelo-acrocêntricos (figura 1f).

As espécies estudadas na bacia da Laguna dos Patos (RS) foram: a espécie *Rineloricaria cadeae* que apresentou 64 cromossomos todos subtelo-acrocêntricos (figura 1g); a espécie *Rineloricaria microlepidogaster* apresentou 68 cromossomos subtelo-acrocêntricos (figura 1h) e *Rineloricaria malabarbai* apresentou 64 cromossomos, sendo 2 cromossomos meta-submetacêntricos e 62 subtelo-acrocêntricos (figura 1i).

Estes dados encontram-se na tabela 1.

## DISCUSSÃO

Os dados citogenéticos deste trabalho ampliam para 21 espécies de *Rineloricaria* estudadas até o momento, das 65 descritas para o gênero, além de trazer informações citogenéticas sobre espécies de bacias hidrográficas pouco estudadas como é o caso da bacia do alto rio Paraguai e do Uruguai.

O mapa da figura 2 ilustra os números diploides das várias espécies de *Rineloricaria* estudadas em diferentes bacias hidrográficas do Brasil. Os poucos estudos citogenéticos no gênero demonstram grande variabilidade cromossômica, provavelmente essa variabilidade esteja associada a um processo de especiação. O presente estudo encontrou uma variação de 56 cromossomos em *R. pentamaculata* (bacia do alto Paraná) até 70 cromossomos em *R. quadrensis* e *R. strigilata* (Atlântico Sul-bacia do rio Tramandaí). O alto número diploide foi encontrado tanto em bacias litorâneas, bacia do rio Tramandaí e bacia da laguna dos Patos, como em bacias no interior do continente, tais como bacias do rio Paraguai e bacia do rio Uruguai, nestas bacias foram encontradas o número diploide de 60 que não havia sido descrito até então.

Observando a distribuição nas bacias hidrográficas (figura 2), os estudos em *Rineloricaria* concentram-se na bacia do alto Paraná. É nessa bacia que se encontra um dos menores números diploides ( $2n$ ) de 36-40 e 44-47 em *R. latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998). Em recente estudo Porto (2012) descreveu números diploides baixos também, de 45 a 48 cromossomos, porém para a bacia do rio Paraguai. Em ambos os casos a fusão foi o principal mecanismo de diversificação cariotípica.

*Rineloricaria pentamaculata*, da bacia do alto Paraná, é a espécie que possui mais estudos citogenéticos dentro do gênero *Rineloricaria*. O presente estudo e os da literatura apontam que 56 cromossomos seja o número diploide predominante nesta espécie e de acordo com mapa (figura 2), o número diploide de 56 é restrito a esta bacia e característico da espécie, podendo ser um marcador citotaxonômico. Já os números diploides maiores de 60 cromossomos não são específicos, pois ocorreram em mais de uma espécie, por exemplo,  $2n=62, 64, 68, 70$  (Tabela 1).

Rodrigues (2010) com os dados de número diploides disponíveis na época propôs que a distribuição do alto número diploide ocorra no litoral e baixo número diploide no interior, porém o presente estudo encontrou um alto número diploide, de

60 cromossomos, em duas bacias do interior (bacia do rio Paraguai e do rio Uruguai). Além de ser alto o  $2n=60$  é muito próximo do  $2n=62$  e  $64$  que ocorrem no litoral, os rearranjos cromossômicos como fissão, fusão e inversões são mecanismos que podem estar envolvidos na diversificação cromossômica das espécies ao longo das bacias (GIULIANO-CAETANO 1998, PORTO, PORTELA-CASTRO E MARTINS-SANTOS 2011, ROSA et al. 2012 e PORTO 2012).

*Rineloricaria parva*, da bacia do alto Paraguai, apresentou 60 cromossomos (6m-sm + 54st-a) e chama atenção não só pelo número diploide baixo, mas também por apresentar constrição secundária terminal no primeiro par meta-submetacêntrico, característica incomum para o gênero. É a única espécie a apresentar essa constrição até o momento, sendo uma característica citotaxonômica importante. *Rineloricaria parva* encontra-se justamente na área geográfica de *Hemiloricaria* e por apresentar essa característica, que a diferencia das outras espécies do seu gênero, retoma a discussão quanto à classificação e distribuição dos gêneros *Hemiloricaria* e *Rineloricaria*. Isso reforça o fato de que caracteres citotaxonômicos devem ser considerados na classificação das espécies e que estudos citogenéticos no gênero *Hemiloricaria* são fundamentais para ajudar a esclarecer a filogenia e distribuição do grupo.

*Rineloricaria cf. reisi* da bacia do rio Uruguai apresentou 60 cromossomos assim como *R. parva*, porém todos os cromossomos foram subtelo-acrocêntricos. Portanto, o número diploide e sua fórmula cariotípica também são marcadores espécie-específico.

*Rineloricaria strigilata* e *R. quadrensis* (bacia do rio Tramandaí) apresentaram o número diploide de 70 e a mesma fórmula cariotípica (8m-sm + 62st-a). Geralmente o alto número diploide está associado à presença de subtelo-acrocêntricos, no entanto, estas espécies fugiram ao padrão ao apresentarem uma quantidade de meta-submetacêntrico além da esperada. Isto não é frequente no gênero. Outra espécie descrita com 70 cromossomos é *Rineloricaria cf. lima* (ROSA et al., 2012) da bacia do alto Paraná, porém com menos cromossomos meta-submetacêntricos (2m-sm e 68st-a).

A espécie *Rineloricaria cf. lima* e *R. strigilata* pertencem ao mesmo clado, são espécies morfologicamente semelhantes (FICHBERG, 2008) e aparentemente são citogeneticamente semelhantes também, apesar de *Rineloricaria cf. lima* apresentar variação no número diploide de 66, 68, 69 e 70. *Rineloricaria strigilata* foi estudada

também por Maia *et al.* (2010) e apresentou  $2n=68$  (6m-sm + 62st-a), porém os espécimes estudados por esses autores foram da bacia da laguna dos Patos. Esta é a única espécie que acontece em dois sistemas hidrográficos isolados.

*Rineloricaria aequalicuspis* e *R. microlepidogaster*, que pertencem a bacias distintas: bacia do rio Tramandaí e bacia da laguna dos Patos, respectivamente, apresentaram ambas 68 cromossomos todos subtelo-acrocêntricos. Essas espécies pertencem ao mesmo clado segundo Fichberg (2008) e citogeneticamente apresentam as mesmas características. *Rineloricaria* cf. *lima*, *R. strigilata*, *R. aequalicuspis* e *R. microlepidogaster* são evidências da origem comum dessas bacias, pois, mesmo estando isoladas atualmente, mantêm características citogenéticas semelhantes.

O número diploide de 64 foi encontrado tanto em *R. malabarbai* quanto em *R. cadeae* (ambas bacia da Laguna dos Patos), porém com diferença na fórmula cariotípica: *R. cadeae* possui todos os 64 cromossomos subtelo-acrocêntricos e *R. malabarbai* possui 2m-sm + 62st-a. Maia *et al.* (2010) e Alves, Oliveira e Foresti (2003) estudaram também a espécie *R. cadeae* e descreveram para ela 64 cromossomos (2m-sm + 62 st-a) e 66 cromossomos (2m-sm + 64 st-a), respectivamente. Nenhum dos estudos anteriores apresenta os mesmos dados do estudo atual, isso comprova a variabilidade intrapopulacional existente na espécie.

O trabalho de Limeira Renesto e Zawadzki (2009), utilizando aloenzimas em duas populações de *R. pentamaculata* isoladas geograficamente, corrobora a hipótese de que essas populações encontram-se em processo de especiação. Assim como *R. pentamaculata* encontra-se nesse processo de especiação, *R. cadeae*, *Rineloricaria* cf. *lima*, *R. strigilata*, *R. aequalicuspis* e *R. microlepidogaster* também poderiam estar, já que são encontrados diferentes números diploide e fórmulas cariotípicas para elas.

Apesar das espécies de *Rineloricaria* estarem em bacias geograficamente separadas e não serem espécies migradoras, antigamente havia conexão entre as bacias. De acordo com Schäfer (1984), sobre biogeografia de águas continentais, as bacias do Atlântico Sul, Uruguai e alto Paraná estão na mesma área ictiogeográfica, isso reforça que a região limnozoogeográfica não é determinada unicamente pelas bacias dos grandes sistemas fluviais, mas também pelos fatores históricos-ecológicos, possibilitando, ou não, a fixação de grupos de animais e plantas em regiões muito pequenas ou mais amplas.

Os dados de número diploide deste trabalho e os da literatura (tabela 3) são uma evidência da origem comum das bacias do Atlântico Sul, Uruguai, Paraná e Paraguai. Também confirmam que estas espécies de *Rineloricaria*, por não serem migradoras, encontram-se isoladas e em processo de especiação.

Considerando a ampla distribuição do gênero e os poucos estudos citogenéticos ainda não é possível determinar a padrão cromossômico para *Rineloricaria*. São devido à distribuição, ao isolamento geográfica, ao processo de vicariância e aos rearranjos cromossômicos que possibilitam a diversificação citogenética interespecífica e intraespecífica encontra a cada nova captura.

## CONCLUSÃO

Os estudos citogenéticos em *Rineloricaria* mostram que o alto número diploide é encontrado tanto em bacias do interior como em bacias costeiras do continente. O número diploide de 56 é exclusivo para *R. pentamaculata*, podendo ser considerado como um marcador para a espécie. As espécies *Rineloricaria* cf. *lima*, *R. strigilata*, *R. aequalicuspis* e *R. microlepidogaster* apresentaram características citogenéticas semelhantes apesar de estarem em bacias distintas. Este fato é uma evidência de que as bacias do Paraná, Paraguai e Atlântico Sul tiveram uma mesma origem, e o isolamento e os rearranjos possibilitaram a diversificação encontrada no gênero *Rineloricaria*.

## REFERÊNCIAS

ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.

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

CHIACHIO, Marcio Cesar. **Estudos Filogenéticos na subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriforme: Loricariidae) com base em seqüências de DNA**. Apresentado originalmente como tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2009.

\_\_\_\_\_; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and

Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 606-617, nov. 2008.

COVAIN, R., FISCH-MULLER, S. The genera of neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): practical key and synopsis. **Zootaxa**, n.1462, p.1-40, 2007.

FICHBERG, I. **Relações filogenéticas das espécies do gênero *Rineloricaria* Bleeker, 1862 (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae)**. Apresentado originalmente como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FREITAS, H.E.A. **Descrição cariotípicas de exemplares de *Sturisoma robustum* (Loricariidae, Loricariinae), do córrego do Onça, afluyente do rio Taquari, Município de Coxim**. Apresentado originalmente como trabalho de conclusão de curso na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Coxim, Coxim, MS. 2007

GHAZZI, M. S. Nove espécies novas do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Uruguai, do sul do Brasil. **Iheringia. Série Zool.**, Porto Alegre, v. 98, n. 1, p.100-122, 2008.

GIULIANO-CAETANO, Lucia. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pices, Loricariinae)**. Apresentado originalmente como tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

GINDRI, B.S. **Contribuição ao estudo citogenético em Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da região do alto Taquari**. Apresentado originalmente como dissertação de Mestrado, Universidade estadual de Maringá. Maringá, 2009.

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

LIMEIRA, D. M.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C. H. Allozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí, upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 431-435, 2009.

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

PORTO F.E.; PORTELA-CASTRO A.L.B; MARTINS-SANTOS, I.C. Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1654-1659, 2010.

PORTO, F.E.; PORTELA-CASTRO, A.L.B; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. **Ichthyol Res**, v. 10, 2011.

PORTO Fernanda Errero. **Diversidade Cromossômica em duas espécies da subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraguai-MS**. Apresentado originalmente como tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012

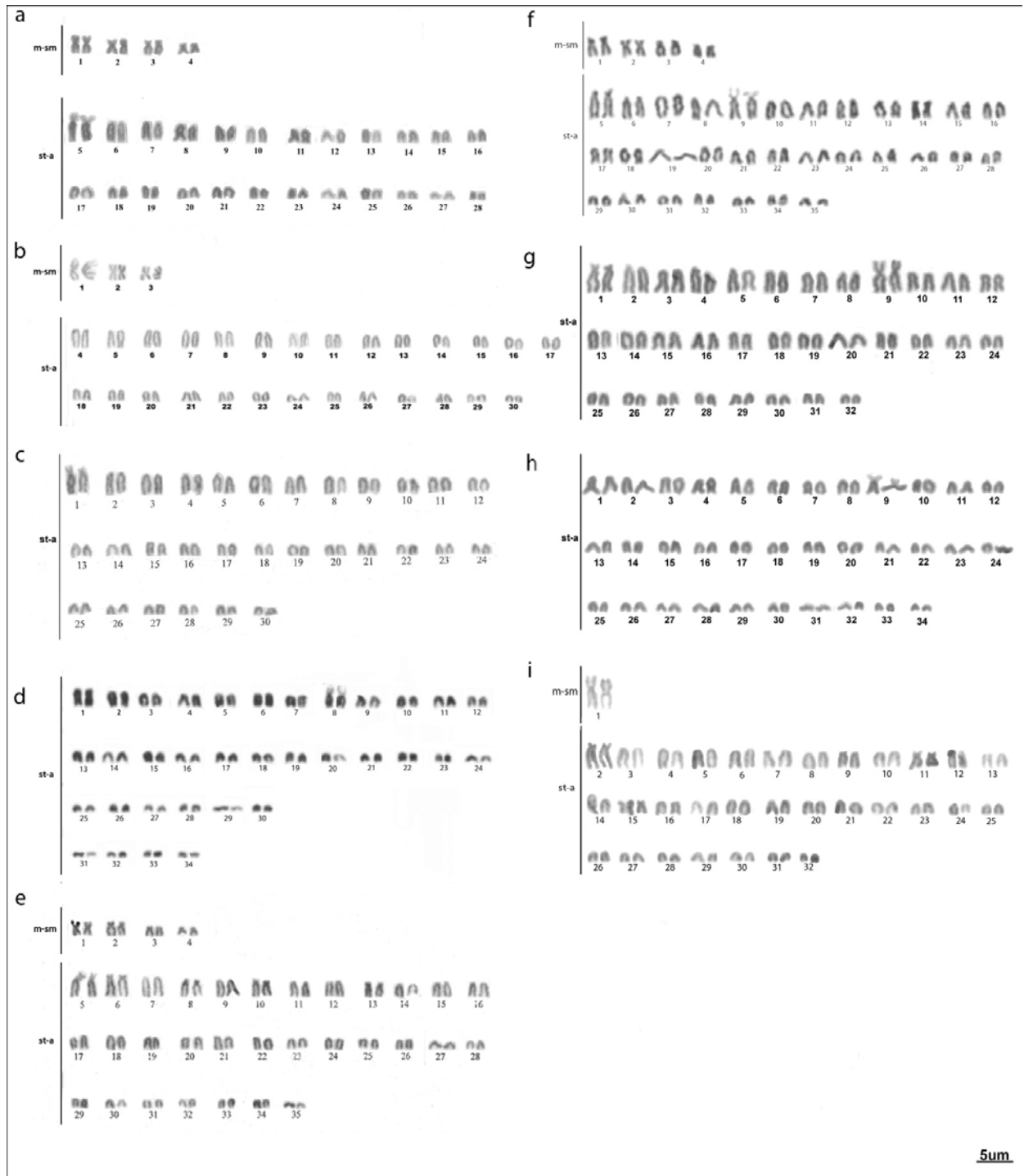
ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v. 22, p. 739-749, 2012.

RIBEIRO, A. C.; LIMA, F. C. T.; MENEZES, N. A. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. In: CARVALHO, Claudio; ALMEIDA, Eduardo. (Org.). **Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos**. São Paulo: Roca, 2011. p. 261-276.

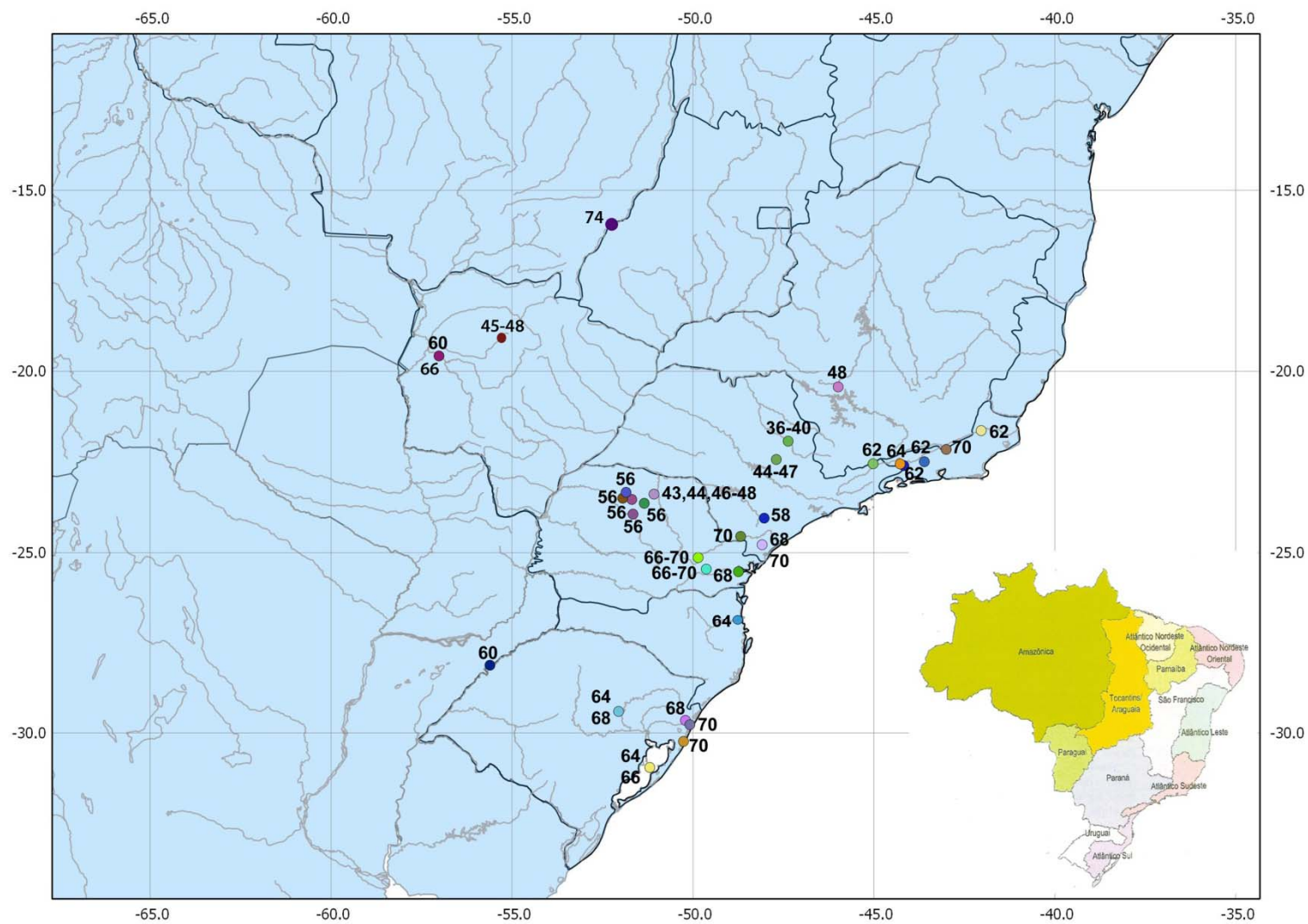
RODRIGUES, Raquel Maria. **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2010.

SCHWARZBOLD, A.; SCHÄFER, A. Gênese das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul - Brasil. **Amazoniana**, v. 9, n.1, p. 87-104, 1984.

**Figura 1** – Cariótipos das espécies estudadas. Em a: *R. pentamaculata*; b: *R. parva*; c: *Rineloricaria* cf. *reisi*; d: *R. aequalicuspis*; e: *R. strigilata*; f: *R. quadrensis*; g: *R. cadeae*; h: *R. microlepidogaster*; i: *R. malabarba*



**Figura 2** – Localização dos números diploides das espécies estudadas no presente trabalho e das que se encontram na literatura.



**Tabela 3** – Dados de número diploide de *Rineloricaria* disponíveis na literatura e presente estudo

ESPÉCIE	LOCALIDADE-ESTADO	2n	FÓRMULA CARIOTÍPICA	REFERÊNCIAS.	
<b>Bacia do Atlântico Sul</b>					
<i>R. cadeae</i>	Lago Guaíba-Rio Grande do Sul	64	2m-sm+62st-a	Maia et al. 2010	
	Lago Guaíba- Rio Grande do Sul	66	2m-sm+64st-a	Alves; Oliveira; Foresti, 2003	
<i>R. microlepidogaster</i>	Rio Forquetinha-Rio Grande do Sul	64	64st-a	<b>Presente estudo</b>	
	Rio Forquetinha-Rio Grande do Sul	68	68st-a	<b>Presente estudo</b>	
<i>R. malabarbai</i>	Rio Forquetinha-Rio Grande do Sul	64	2m-sm+64st-a	<b>Presente estudo</b>	
<i>R. aequalicuspis</i>	Rio Maquiné-Rio Grande do Sul	68	68st-a	<b>Presente estudo</b>	
<i>R. quadrensis</i>	Lagoa dos Quadros-Rio Grande do Sul	70	8m-sm+62st-a	<b>Presente estudo</b>	
<i>R. strigilata</i>	Rio Forquetinha-Rio Grande do Sul	68	6m-sm+62st-a	Maia et al. 2010	
	Lagoa da Cerquinha-Rio Grande do Sul	70	6m-sm+62st-a	<b>Presente estudo</b>	
<i>R. kronei</i>	Rio Itapocu-Santa Catarina	64	6m-sm+48st-a	Alves; Oliveira; Foresti, 2003	
<b>Bacia do Atlântico Sudeste</b>					
<i>R. cf. nigricauda</i>	Ribeirão Bonito-Rio de Janeiro	70	70st-a	Rodrigues, 2010	
<i>Rineloricaria sp.1</i>	Rio São José-Rio de Janeiro	62	2m-sm+60st-a	Rodrigues, 2010	
<i>Rineloricaria sp.2</i>	Rio Paraíba do Sul-Rio de Janeiro	62	2m-sm+60st-a	Rodrigues, 2010	
		62	4m-sm+ 58 st-a	Rodrigues, 2010	
<i>Rineloricaria sp.3</i>	Córrego Passa Vinte-São Paulo	62	8m-sm+ 54st-a	Rodrigues, 2010	
		62	8m-sm+54st-a	Rodrigues, 2010	
<i>Rineloricaria sp.4</i>	Rio Jurumirim-Rio de Janeiro	64	6m-sm+58st-a	Rodrigues, 2010	
<i>Rineloricaria sp.5</i>	Riacho da Baía de Paranaguá-Paraná	68	2m-sm+66st-a	Rodrigues, 2010	
<i>Rineloricaria sp.n</i>	Rio Jucupiranga-São Paulo	68	3m-sm+65st-a	Rodrigues, 2010	
		70	70st-a	Rodrigues, 2010	
<i>R. cf. latirostris</i>	Rio Betari-São Paulo	70	70st-a	Rodrigues, 2010	
	Rio São Francisco-Minas Gerais	48	14m-sm+34st-a	Mendes-Neto, 2008	
<b>Bacia do alto Paraná</b>					
<i>R. latirostris</i>	Rio Mogi-guaçu-São Paulo	36	24m-sm+12st-a	Giuliano-Caetano, 1998	
		37	23m-sm+14st-a	Giuliano-Caetano, 1998	
		38	22m-sm+16st-a	Giuliano-Caetano, 1998	
		39	21m-sm+18st-a	Giuliano-Caetano, 1998	
		40	20m-sm+20st-a	Giuliano-Caetano, 1998	
		40	20m-sm+20st-a	Rodrigues, 2010	
		Rio Passa Cinco-São Paulo	44	16m-sm+28a	Giuliano-Caetano, 1998
			44	14m-sm+30a	Giuliano-Caetano, 1998
			44	15m-sm+29a	Giuliano-Caetano, 1998
			44	17m-sm+27a	Giuliano-Caetano, 1998
	44		13m+1sm+30a	Giuliano-Caetano, 1998	
	44		10m+4sm+30a	Giuliano-Caetano, 1998	
	44		10m+3sm+31a	Giuliano-Caetano, 1998	
	44		16m+28a	Giuliano-Caetano, 1998	
	45		15m+30a	Giuliano-Caetano, 1998	
	46		14m+32a	Giuliano-Caetano, 1998	
	46	10m+4sm+32a	Rodrigues, 2010		
	Ribeirão Três Bocas- Paraná	47	13m+34a	Giuliano-Caetano, 1998	
		43	17m+23a	Giuliano-Caetano, 1998	
		44	16m+28a	Giuliano-Caetano, 1998	
46		14m+32a	Giuliano-Caetano, 1998		
<i>R. pentamaculata</i>	Rio Taquaral-São Paulo	47	13m+34a	Giuliano-Caetano, 1998	
		48	12m+36a	Giuliano-Caetano, 1998	
	Rio Jacucaca- Paraná	58	4m-sm+54st-a	Rodrigues, 2010	
		56	8m-sm+48st-a	Maia et al. 2010, <b>Presente estudo</b>	

	Rio Keller-Paraná	<b>56</b>	8m-sm+48st-a	Porto; Portela-Castro; Martins-Santos, 2011
	Córrego Tatupeba-Paraná	<b>56</b>	8m-sm+48st-a	Porto; Portela-Castro; Martins-Santos, 2011
	Rio Tauá-Paraná	<b>56</b>	8m-sm+48st-a	Porto; Portela-Castro; Martins-Santos, 2011
	<b>Cromossomos B (2-4)</b>			
	Ribeirão Queixada	<b>56</b>	8m-sm+48st-a	<b>Presente estudo</b>
<i>Rineloricaria lima</i>	Ribeirão da Areia-PR e Rio Açungui-Paraná	<b>66</b>	3m-sm+63a	Rosa <i>et al.</i> 2012
		<b>68</b>	4m-sm+ 64a	Rosa <i>et al.</i> 2012
		<b>68</b>	2m-sm+66a	Rosa <i>et al.</i> 2012
		<b>69</b>	2m-sm+67a	Rosa <i>et al.</i> 2012
		<b>69</b>	1m+68a	Rosa <i>et al.</i> 2012
		<b>70</b>	2m+68a	Rosa <i>et al.</i> 2012
	<b>Bacia do alto Paraguai</b>			
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	Corrego do Onça-Mato Grosso do Sul	<b>45</b>	4m+2sm+2st+37a	Porto, 2012
		<b>46</b>	3m+2sm+2st+39a	Porto, 2012
		<b>46</b>	4m+2sm+2st+38a	Porto, 2012
		<b>46</b>	2m+2sm+2st+40a	Porto, 2012
		<b>47</b>	4m+1sm+2st+40a	Porto, 2012
		<b>47</b>	3m+1sm+2st+41a	Porto, 2012
		<b>47</b>	2m+1sm+2st+42a	Porto, 2012
		<b>48</b>	4m+2st+42a	Porto, 2012
		<b>48</b>	3m+2st+43a	Porto, 2012
		<b>48</b>	3m+2sm+2st+41a	Porto, 2012
<i>R. parva</i>	Rio Miranda-Mato Grosso do Sul	<b>60</b>	6m-sm+54st-a	<b>Presente estudo</b>
	<b>Bacia do rio Uruguai</b>			
<i>Rineloricaria cf. reisi</i>	Arroio Chimiray-Misiones	<b>60</b>	60st-a	<b>Presente estudo</b>

---

2n=número diplide, m-sm=meta-submetacêntrico, st-a=subtelo-acrocêntrico

## **CAPÍTULO 2**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES  
CROMOSSÔMICOS EM NOVE ESPÉCIES DE  
*Rineloricaria* (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES,  
LORICARIIDAE)**

## IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM NOVE ESPÉCIES DE *Rineloricaria* (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIIDAE)

Natália Bortholazzi Venturelli<sup>1</sup>, Fabio Hiroshi Takagui<sup>1</sup>, Mônica Sônia Rodriguez<sup>2</sup>,  
Lucia Giuliano-Caetano<sup>1</sup>

### RESUMO:

Loricariinae revela uma expressiva variação no número diploide, assim como o gênero *Rineloricaria*, no entanto variações nos bandamentos cromossômicos neste gênero são pontuais. No presente trabalho, foram realizados bandamentos cromossômicos em nove espécies: *Rineloricaria pentamaculata* (bacia do alto rio Paraná), *Rineloricaria parva* (rio Miranda), *Rineloricaria* cf. *reisi* (arroyo Chimiray), *Rineloricaria aequalicuspis* (rio Maquiné), *Rineloricaria strigilata* (lagoa da Cerquinha), *Rineloricaria quadrensis* (lagoa dos Quadros), *Rineloricaria cadeae* (rio Forquetinha), *Rineloricaria microlepidogaster* (rio Forquetinha) e *Rineloricaria malabarbai* (rio Forquetinha). A análise da região organizadora de nucléolo (RON) revelou a presença de um par cromossômico (RON simples), em cromossomos subtelo-acrocêntricos, exceto em *R. parva* que apresentou em cromossomos meta-submetacêntrico, caracterizando-se como um bom marcador para a espécie. A heterocromatina encontra-se distribuída nas regiões pericentroméricas e na região da constrição secundária, exceto em *R. cadeae*, que não apresentou heterocromatina na região da constrição. Em todas as espécies, a região da constrição é rica nos pares de base GC e foi confirmado pela FISH com DNAr 18S como sendo RON simples. A sonda de DNAr 5S foi variável, *R. pentamaculata* apresentou 12 cromossomos marcados; *R. aequalicuspis* apresentou 16 cromossomos; *R. malabarbai* 7; *R. strigilata* 6 cromossomos; *R. cadeae* 4 cromossomos; *R. microlepidogaster* 3 cromossomos; *R. quadrensis* 8 cromossomos e *R. parva* 2 cromossomos. Podemos inferir que cada espécie apresenta um padrão de distribuição do DNAr 5S. Os resultados apontam a variação no número de sítios do DNAr 5S como um marcador citogenético útil na identificação de espécies. Os dados citogenéticos indicam que alguns cromossomos marcadores foram definidos atualmente, sendo uma ferramenta para auxiliar na taxonomia de gênero.

**Palavras-chave:** Marcadores citogenéticos. Genes ribossômicos. Loricariinae.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia geral, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil, natalia\_venturelli@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Parnaíba, Rodovia MG-230 Km7 CEP: 38810-000, Rio Parnaíba, Minas Gerais, Brasil. msrodriguezx@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Loricariinae revela uma expressiva variação no número diploide assim como o gênero *Rineloricaria*, no entanto este gênero vem acompanhado de alto número de cromossomos subtelo-acrocêntricos, com base nas tendências da evolução cariotípica de Loricariinae foi proposto por Artoni e Bertollo (2001) e Alves, Oliveira e Foresti (2003) que o mecanismo de fissão cêntrica a partir da condição ancestral de 54 cromossomos originaram as variações no número diploide e o aumento da ocorrência de cromossomos subtelo-acrocêntricos.

Contraditoriamente a extensa variação no número diploide, o bandamento cromossômico no gênero *Rineloricaria* mostra-se um pouco mais conservado com variações pontuais. É comumente descrito para o gênero um par subtelo-acrocêntrico portador de uma constrição secundária, sendo esta mesma região portadora da região organizadora de nucléolo (RON), caracterizando-se como um padrão de RON simples. Esta região também mostra-se rica nos pares de base GC quando coradas com cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e a heterocromatina é distribuída nas regiões pericêntricas e associadas a RON (ALVES, OLIVEIRA, FORESTI, 2003; MAIA et al, 2010; PORTO, PORTELA-CASTRO E MARTINS-SANTOS, 2011; PORTO, 2012).

As variações pontuais nos bandamentos referem-se a polimorfismos de RONS (PORTO, PORTELA-CASTRO E MARTINS-SANTOS, 2011; PORTO, 2012), presença de cromossomos Bs (PORTO, PORTELA-CASTRO E MARTINS-SANTOS, 2010), e polimorfismo de heterocromatina (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2003; MAIA et al, 2010; PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2011; PORTO, 2012).

O uso de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) em *Rineloricaria* foi realizado até o momento com sondas de DNAr 18S e 5S e sonda de sequência telomérica. Por meio da sonda de DNAr 18S confirma-se o padrão de RON simples ou múltipla, no caso de *Rineloricaria* geralmente é simples, porém Porto, Portela-Castro e Martins-Santos (2011) descreveu o primeiro caso de RONS múltiplas em *Rineloricaria pentamaculata* confirmada com a sonda de DNAr 18S.

O gene ribossomal 5S varia nas espécies do gênero, não sendo possível determinar um padrão de distribuição nas espécies como o DNAr 18S. O DNAr 5S foi utilizado pela primeira vez em uma espécie do gênero por Mendes-Neto (2001), posteriormente por Rodrigues (2010) e por Rosa et al (2012), também foi utilizado

por Rosa et al (2012) sonda de sequência teloméricas. Estas sonda foram utilizadas no intuito de ajudar a caracterizar as espécies e entender os mecanismos envolvidos na diversificação deste grupo.

As caracterização de bandamentos citogenéticos neste gênero são poucos comparados com a quantidade de espécies descritas para o gênero, cerca de 15 foram estudadas contra 65 descritas. Portanto, este trabalho tem por objetivo caracterizar citogeneticamente as RONS por meio de bandamento C, impregnação por nitrato de prata (AgRON), fluorocromos base específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI, e por meio da hibridação fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S e 5S em nove espécies de *Rineloricaria* provenientes de diferentes bacias afim de contribuir com dados de espécies nunca estudadas e descrever possíveis cromossomos marcadores para o gênero e espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas diferentes espécies pertencentes ao gênero *Rineloricaria* de diferentes bacias hidrográficas (tabela 2).

### Bacia do alto Paraná (Paraná)

- 6 indivíduos de *Rineloricaria pentamaculata* coletada no ribeirão Jacucaca (afluente do rio Tibagi);
- 10 indivíduos de *Rineloricaria pentamaculata* coletada no ribeirão Queixada (afluente do rio Ivaí).

### Bacia do rio Tramandaí (Rio Grande do Sul)

- 27 indivíduos de *Rineloricaria aequalicuspis* foi coletada no rio Maquiné;
- 5 indivíduos de *Rineloricaria strigilata* foi coletada na lagoa da Cerquinha e;
- 11 indivíduos de *Rineloricaria quadrensis* na lagoa dos Quadros.

### Bacia da Laguna dos Patos (Rio Grande do Sul)

- 11 indivíduos de *Rineloricaria microlepidogaster*, 7 indivíduos de *Rineloricaria cadeae* e 4 indivíduos de *Rineloricaria malabarbai* foram coletadas no rio Forquetinha.

#### Bacia do alto Paraguai (Mato Grosso do Sul)

- 19 indivíduos de *Rineloricaria parva* foi coletada no rio Miranda, localizado no Pantanal sul Matogrossense.

#### Bacia do Uruguai (Misiones, Argentina)

- 9 indivíduos de *Rineloricaria cf. reisi.*, coletada no arroio Chimiray, no município de Azara, província de Misiones (ARG)

A obtenção de cromossomos mitóticos foi segundo Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). A impregnação por nitrato de prata segundo Howell e Black (1980); a detecção da heterocromatina segundo Sumner (1972) e a coloração com fluorocromos base específicos segundo Schweizer (1980). A hibridação *in situ* seguiu o protocolo de Pinkel et al. (1986), com modificações, utilizando-se as sonda de DNAr 18S, obtido de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2005) e sonda de DNA 5S de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI, 1999).

## RESULTADOS

Os números diploides e fórmulas cariotípicas das espécies analisadas foram descritas por Venturelli et al. (2014) em preparação.

A espécie *Rineloricaria pentamaculata* do rio Jacucaca e ribeirão Quexada, bacia do alto Paraná, apresentou o primeiro par subtelo-acrocêntrico com constrição secundária no braço curto com heteromorfismo de tamanho e portador da AgRON, sendo esta região rica nos pares de base GC. A FISH com sonda de DNAr 18S confirmou o padrão da RON e a sonda de DNAr 5S foi evidenciado na região terminal de 12 cromossomos subtelo-acrocêntrico (figura 1 e 2 a).

A espécie *Rineloricaria parva* do rio Miranda (MS), bacia do rio Paraguai apresentou o primeiro par meta-submetacêntrico com constrição secundária terminal no braço curto, diferindo das outras espécies. Este par apresentou-se portador da AgRON e CMA<sub>3</sub> positivo. A heterocromatina esteve localizada nas regiões pericentroméricas e no mesmo local da constrição. A FISH com sonda de DNAr 18S confirmou a localização de RON simples e a sonda de DNAr 5S hibridou em um único par (figura 1 e 2 b).

A espécie *Rineloricaria cf. reisi*, do arroio Chimiray, bacia do rio Uruguai, apresentou o primeiro par portador da constrição secundária, da RON e CMA<sub>3</sub> positivo. A FISH com sonda da DNAr 18S confirmou o padrão de RON simples e a FISH com DNAr 5S ainda não foi obtido (figura 1 e 2 c).

As espécies estudadas na bacia do rio Tramandaí (RS) foram:

- *Rineloricaria aequalicuspis* apresentou o oitavo par é o portador da constrição secundária, da AgRON, sendo esta região rica nos pares de base CG. A FISH com DNAr 18S confirmou a RON simples e a com sonda de DNAr 5S evidenciou 16 cromossomos marcados (figura 1 e 2d).
- *Rineloricaria strigilata* apresentou o primeiro par subtelo-acrocêntrico mostrou-se portador da constrição secundária, da AgRON e sendo esta região CMA<sub>3</sub> positivo. O bandamento C evidenciou as regiões pericentroméricas e o par da constrição como heterocromáticas. A localização da RON foi confirmado pela FISH com DNAr 18S e a FISH com sonda de DNAr 5S evidenciou 6 cromossomos (figura 1 e 2 e).
- *Rineloricaria quadrensis* apresentou o quinto par portado da constrição secundária, da AgRON, sendo esta região CMA<sub>3</sub> positivo. A FISH com DNAr 18S confirmou o padrão de RON simples e a FISH com DNAr 5S evidenciou 7 cromossomos marcados (figura 1 e 2 f).

As espécies estudadas na bacia da Laguna dos Patos (RS) foram:

- *Rineloricaria cadeae* apresentou o nono par com constrição secundária no braço curto, sendo este portador da AgRON e CMA<sub>3</sub> positivo. No bandamento C, somente as regiões pericentroméricas apresentaram-se heterocromáticas. A localização dos genes ribossômicos por meio da técnica de hibridação *in situ* utilizando sonda de DNAr 18S confirmou a localização da RON e resultados com sonda de DNAr 5S evidenciara 4 cromossomos marcados (figura 1e 2 g).
- *Rineloricaria microlepidogaster* apresentou o nono par portador da constrição secundária, portador da AgRON, sendo esta região CMA<sub>3</sub> positivo. Quanto ao padrão da distribuição da heterocromatina, tanto as regiões pericentroméricas quanto o par da constrição apresentaram-se heterocromáticos. A FISH com

sonda 18S confirmou o padrão de RON simples e a FISH com sonda de DNAr 5S evidenciou 3 cromossomos (figura 1 e 2 h).

- *Rineloricaria malabarbai* apresentou o décimo par portador da constrição secundária, da AgRON e CMA<sub>3</sub> positivo. O bandamento C evidenciou as regiões pericentroméricas e o par da constrição como sendo heterocromáticos. A FISH com DNAr 18S confirmou o padrão de RON simples e a sonda de DNAr 5S evidenciou 7 cromossomos (figura 1 e 2 j). Estes dados encontram-se na tabela 1.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho foram realizados bandamentos cromossômicos em nove espécies do gênero *Rineloricaria*. A análise da região organizadora de nucléolo (RON) revelou a presença de um par cromossômico, portanto um sistema de RON simples. Em todas as espécies, o organizador nucleolar foi coincidente com a constrição secundária em posição terminal do braço curto em cromossomos do tipo subtelo-acrocêntrico, exceto *R. parva*, que apresentou a constrição e a RON em posição terminal de um par meta-submetacêntrico, diferindo da maioria dos Loricariinae.

Há descrição de RONs múltiplas em *R. pentamaculata* (PORTO; PORTELA; CASTRO, 2011) e RONs intersticiais em *R. latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998), porém RONs em cromossomos meta-submetacêntrico na região terminal é exclusivo até o momento para *R. parva*, sendo portanto um bom marcador para a espécie, confirmando os dados de Venturelli et al (2014) em preparação. Em todas as espécies, foi observado heteromorfismo de tamanho no par portador da RON, o que é comum no gênero, e este pode ser gerado por *crossing-over* desigual, por duplicações e/ou deleções gênicas (LYCKEGAARD; CLARK, 1991).

A família Loricariidae apresenta uma diversidade em quantidade de heterocromatina, porém a subfamília já apresenta uma quantidade de heterocromatina semelhante (ARTONI; BERTOLLO, 2001). As espécies aqui estudadas apresentaram heterocromatina na região pericentromérica e na região portadora da constrição secundária que é coincidente com a AgRON, sendo este mesmo par CMA<sub>3</sub> positivo, ou seja, esta região apresenta-se rica em bases GC, o

que é bastante comum para o gênero e já tem sido relatado por outros autores (MAIA *et al.*, 2010 entre outros). Somente *R. cadeae* diferiu, pois não apresentou heterocromatina associada à região da AgRON, este padrão nunca foi descrito e não é comum para o gênero, podendo ser um marcador cromossômico para a espécie (figura 1g). Esta mesma espécie foi analisada por Maia *et al.* (2010) e Alves, Oliveira e Foresti (2003), coletados no Lago Guaíba, onde a RON encontra-se associado à heterocromatina. Estas diferenças entre o número diploide e fórmula cariotípica podem sugerir que não se tratam da mesma espécie.

Todas as espécies de *Rineloricaria* analisadas neste trabalho apresentaram um par marcado para o gênero com a sonda DNAr 18S, confirmando o padrão de RON simples. Quanto ao DNAr 5S, ao contrário, vários cromossomos apresentam este sítio e todos eles localizados em cromossomos subtelo-acrocêntricos, porém cada espécie apresentou quantidade de marcações diferentes, demonstrando uma variabilidade numérica no gênero (figura 2). Essa constância nos sítios de 18S e a variabilidade nos sítios de 5S já têm sido relatadas desde os primeiros estudos com essa sonda no gênero *Rineloricaria* (MENDES-NETO, 2008; ROSA *et al.*, 2012).

Não foram encontrados sítios intersticiais como os encontrados por Rosa *et al.* (2012), segundo os autores dois sítios de DNAr 5S são necessários para gerar pontos de fusão e assim explicariam algumas das variações cariotípicas encontrada em *R. lima*. No presente trabalho, *R. pentamaculata* apresentou 12 cromossomos, um par a mais do que descrito por Rodrigues (2010), *R. aequalicuspis* apresentou 16 cromossomos; *R. malabarbai* 7 cromossomos; *R. strigilata* 6 cromossomos; *R. cadeae* 4 cromossomos; *R. microlepidogaster* 3 cromossomos; *R. quadrensis* 8 cromossomos e *R. parva* 2 cromossomos. Podemos inferir que cada espécie apresenta um padrão de distribuição do DNAr 5S. Os resultados apontam a variação no número de sítios do DNAr 5S como um marcador citogenético útil na identificação de espécies. As espécies de *Rineloricaria* da bacia do alto do rio Paraná e das bacias do Atlântico Sul apresentaram alto número de sítios, enquanto a espécie da bacia do rio Paraguai apresentou um único par portador da sequência.

A localização sintênica dos genes ribossomais 45S-5S é uma situação rara em peixes e em *Rineloricaria* nunca foi descrito. Em *Rineloricaria parva* foi encontrado um único sítio de 5S e como não se obteve o double FISH, não foi possível detectar se há ou não sintênia. Já com *Rineloricaria pentamaculata* a técnica de double FISH foi obtida com sucesso e os 12 cromossomos hibridados

com a sonda de DNAr 5S estiveram localizados em cromossomos st-a e não colocalizados com o 18S. Essa característica fica bem evidente quando observamos o núcleo. Nele, a localização dos genes DNAr 18S e 5S estão em lados opostos (figura 2a). Alguns autores defendem que a localização dos genes em cromossomos separados seja uma característica ancestral, enquanto outros defendem que a característica ancestral seria quando os genes estivessem ligados (FONTANA et al., 2003; GROMICHO et al., 2006). Segundo Rodrigues (2010) a sintênia dos genes ribossomais 45S-5S encontrado em *Harttia* e *Loricariichthys* pode representar uma autopomorfia para ambos e teria surgido de modo independente na subfamília, pois *Harttia* é considerado mais basal em estudos filogenéticos e *Loricariichthys* como um dos gêneros mais derivados. Entretanto, caso essa sintênia seja encontrado em todas as espécies de *Harttia*, a hipótese de essa característica ser uma característica ancestral pode ser válida para Loricariinae e poderia ter se mantido em algumas espécies, desaparecendo nos gêneros mais derivados como *Rineloricaria* (RODRIGUES, 2010).

A localização da RON em *R. parva* pode ser considerada uma característica derivada quando se analisa o histórico do gênero. Como já dito, a RON geralmente é localizada em cromossomos subtelo-acrocêntricos, sendo considerada como uma característica ancestral. Quando observamos *R. pentamaculata* e *Rineloricaria* cf. *reisi*, a AgRON está localizada no maior par subtelo-acrocêntrico do complemento. Este par poderia dar origem, por inversão pericêntrica, a um cromossomo meta-submetacêntrico maior do complemento e portador da AgRON em *Rineloricaria parva*. Esta evidência corrobora com a história geológica da bacia do Prata, província Parano-Plantece, significando que as bacias do Paraguai, Paraná e Uruguai tiveram uma relação histórica e a atual ictiofauna apresenta diferenças devido ao isolamento que levou à especiação.

## CONCLUSÃO

Em síntese, os dados aqui obtidos de espécies nunca estudadas e a localização do gene DNAr 5S intensificam a diversidade cariotípica do gênero. Além de serem apresentados marcadores específicos para algumas espécies, como o par da RON em *R. parva*, o par não heterocromático em *R. cadeae* e a distribuição do DNAr 5S, como excelentes marcadores para as espécies de *Rineloricaria*.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, p. 201-210, 2001.
- FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; CHICCA, M. ROSSI, R. Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. **Genome**, v. 46, p.473-477, 2003.
- GIULIANO-CAETANO, Lucia. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pices, Loricariinae)**. Apresentado originalmente como tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.
- GROMICHO M.; COELHO, M.M.; ALVES, M.J.; COLLARES-PEREIRA A. Cytogenetic analysis of *Anaecypris hispânica* and its relationship with the paternal ancestor of the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex. **Genome**, v. 49, p. 1621-1627, 2006.
- LYCKEGAARD E.M.; CLARK A.G. Evolution of ribosomal RNA gene copy number on the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **Mol Biol Evol.** v.8, p. 458–474, 1991.
- MAIA, T.P.A.; GIULIANO-CAETANO, L.; RODRIGUES, M.; RUBERT, M.; TAKAGUI, F.H.; DIAS, A.L. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyol Res.**, v.57, p.209–213, 2010.
- MENDES-NETO, Ernani de Oliveira. Estudos citogenéticos em algumas espécies de Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) da região de transposição para o rio Piumhi para o rio São Francisco. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.
- PORTO Fernanda Errero. **Diversidade Cromossômica em duas espécies da subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraguai-MS**. Apresentado originalmente como tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.
- PORTO F.E.; PORTELA-CASTRO A.L.B; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Parana´ River basin. **Ichthyol Res** 10.1007/s10228-011, 2011.
- 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. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v. 22, p. 739-749, 2012.

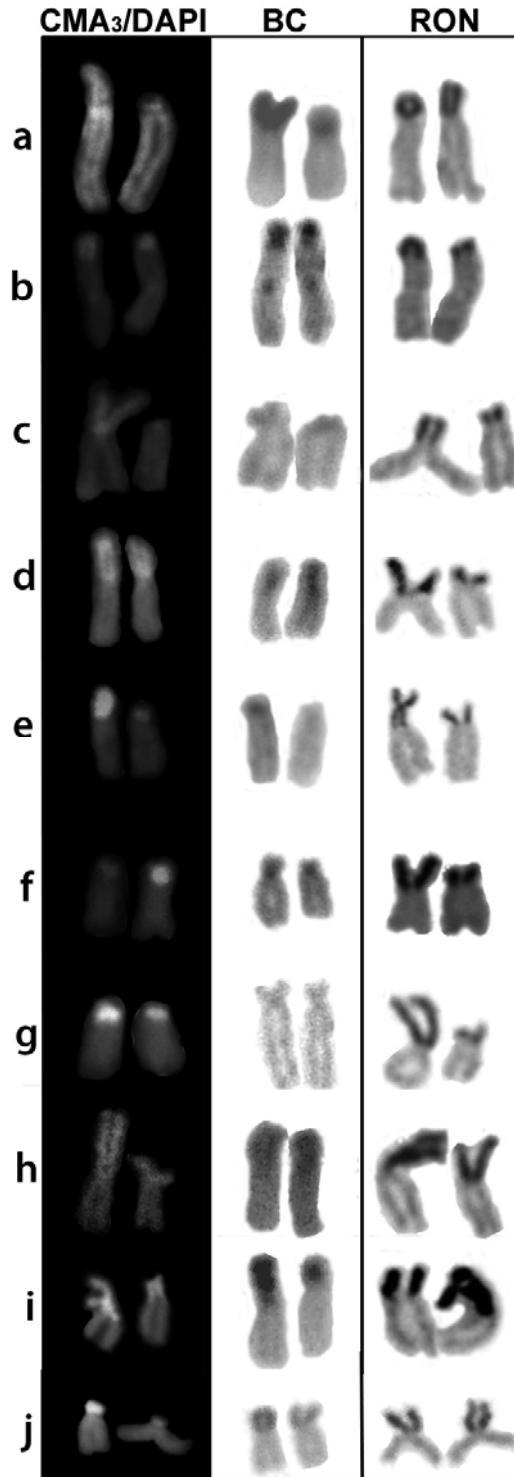
RODRIGUES, Raquel Maria. **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae):** uma perspectiva evolutiva. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2010

**Tabela 1** – Dados cromossômicos das espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho e seus respectivos locais de origem

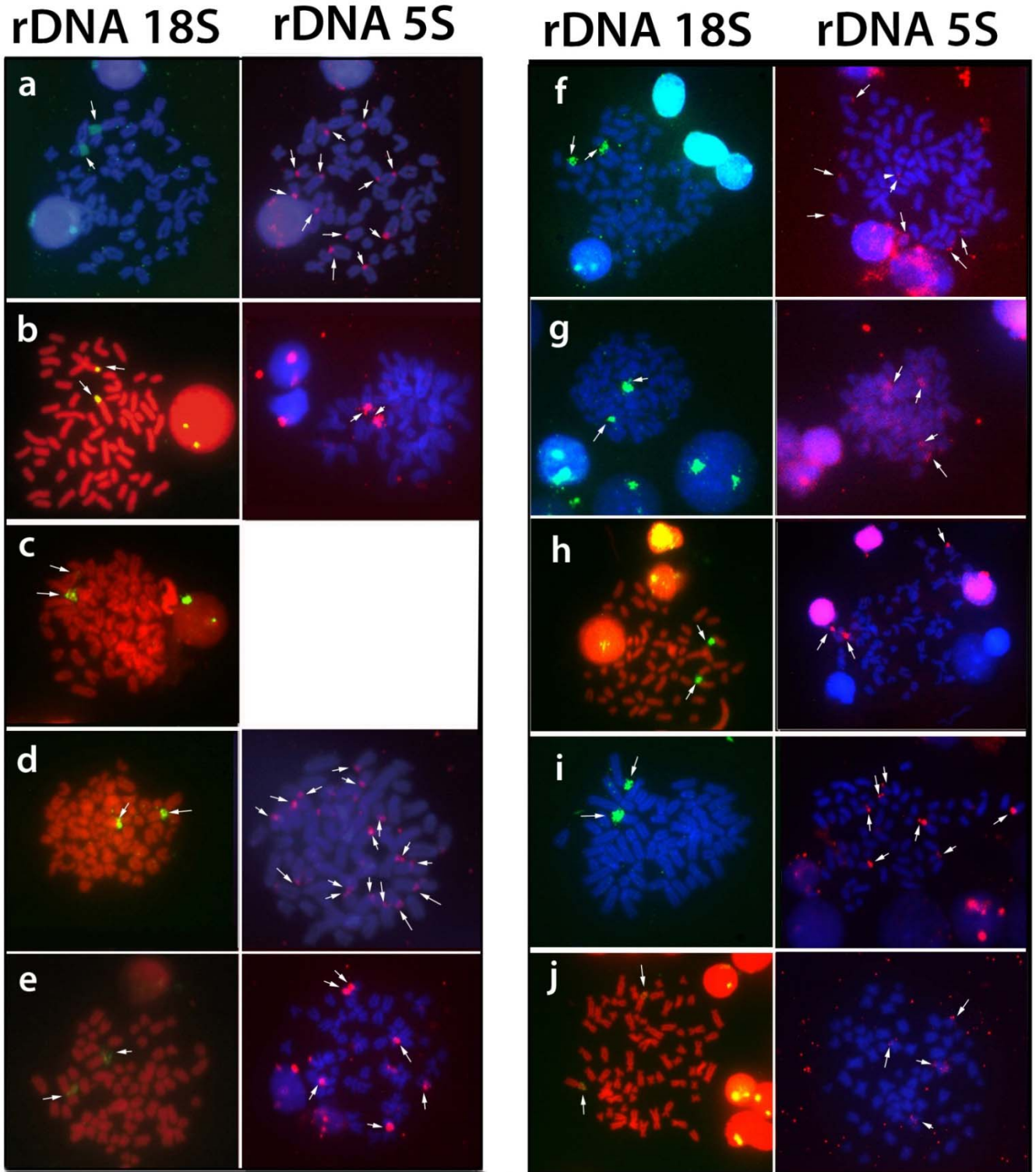
Espécie	Local	2n	Fórmula Cariotípica	BC	RON	DNAr 18S	DNAr 5S
<b>Bacia da Laguna dos Patos</b>							
<i>Rineloricaria cadeae</i>	rio Forquetinha	64	64st-a	RP	Terminal st-a	par 9 st-a	4 sítios
<i>Rineloricaria microlepidogaster</i>	rio Forquetinha	68	68st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 9 st-a	3 sítios
<i>Rineloricaria malabarbai</i>	rio Forquetinha	64	2m-sm+62st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 10 st-a	7 sítios
<b>Bacia do rio Tramandaí</b>							
<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	rio Maquiné	68	68st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 8 st-a	16 sítios
<i>Rineloricaria strigilata</i>	lagoa da Cerquinha	70	8m-sm+62st-a	RP, CS	Terminal st-s	par 1 st-a	6 sítios
<i>Rineloricaria quadrensis</i>	lagoa dos Quadros	70	8m-sm+62st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 5 st-a	8 sítios
<b>Bacia do rio Paraguai</b>							
<i>Rineloricaria parva</i>	rio Miranda	60	6m-sm+54st-a	RP, CS	Terminal m-sm	par 1 m-sm	2 sítios
<b>Bacia do alto rio Paraná</b>							
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	rio Jacucaca	56	8m-sm+48st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 1 st-a	12 sítios
	rio Quexada	56	8m-sm+48st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 1 st-a	12 sítios
<b>Bacia do rio Uruguai</b>							
<i>Rineloricaria cf. reisi</i>	arroio Chimiray	60	60st-a	RP, CS	Terminal st-a	par 1 st-a	---

2n=número diploide, BC=bandamento C, PR=região pericentromérica, CS=constrição secundária, RON=região organizadora de nucléolo

**Figura 1** – Bandamentos cromossômicos: fluorocromos CMA<sub>3</sub> positivo/DAPI negativo, banda C e região organizadora de nucléolo (RON). Em 1: *R. pentamaculata*; 2: *R. parva*; 3: *Rineloriaria* cf. *reisi*.; 4: *R. aequalicuspis*; 5: *R. strigilata*; 6: *R. quadrensis*; 7: *R. cadeae*; 8: *R. microlepidogaster*; 9: *R. malabarbai*; 10: *S. robustum*.



**Figura 2** – Localização do genes ribossômicos com sondas de DNAr 18S e DNAr 5S. Em a: *R. pentamaculata*; b: *R. parva*; c: *Rineloricaria* cf. *reisi*; d: *R. aequalicuspis*; e: *R. strigilata*; f: *R. quadrensis*; g: *R. cadeae*; h: *R. microlepidogaster*; i: *R. malabarbai*; j: *S. robustum*.



#### 4 CONCLUSÃO GERAL

O estudo citogenético realizado em 9 espécies de *Rineloricaria* determinou:

1. O número diploide é um bom marcador cromossômico para *Rineloricaria pentamaculata* que, atualmente, é a única que apresenta 56 cromossomos;
2. Os dados citogenéticos das espécies *R. strigilata*, *R. aequalicuspis* e *R. microlepidogaster* corroboram com os dados da sistemática que consideram estas espécies como de um mesmo clado;
3. A RON em *Rineloricaria parva* é um marcador para esta espécie e existe evidências que ela é derivada e tenha sido originado por inversão pericêntrica em um subtelo-acrocêntrico maior do complemento e portador da RON que ocorre em *Rineloricaria pentamaculata* e *Rineloricaria* cf. *reisi*;
4. A marcação do gene DNAr 5S mostrou-se um bom marcador para: *R. pentamaculata*, *R. microlepidogaster*, *R. malabarbai*, *R. cadeae*, *R. aequalicuspis*, *R. strigilata*, *R. quadrensis* e *R. parva*.
5. O maior número diploide para *Rineloricaria* é 70 cromossomos como já descrito para *Rineloricaria* cf. *lima* (bacia do Paraná) e no presente estudo para *Rineloricaria strigilatta* e *R. quadrensis* (Bacia do Tramandaí).
6. Aparentemente a variação no número diploide no gênero não segue um padrão de distribuição ao longo das bacias. Altos números diploides foram encontrados tanto no interior quanto no litoral do continente, é necessário estudos citogenéticos nas bacias do norte e nortes para ajudar a elucidar a distribuição do número diploide no gênero.

## REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J. R. The value of biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p.1115- 1118, 2008.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.
- \_\_\_\_\_. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genética**, v.124, p.127-136, 2005.
- 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**, n. 141, p. 1–80, 2004.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, n. 134, p. 201-210, 2001.
- BENNEMANN, S.T.; SHIBATTA, O.A.; GARAVELLO, J.C. **Peixes do rio Tibagi: uma abordagem ecológica**. Londrina: Eduel, 2000.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**. v. 2, p. 103-120, 1978.
- BRITO, P. M.; MEUNIER, F.; LEAL, M. E. Origine et diversification de l'ichtyofaune Néotropical: une revue. **Cybium**, v. 31, n.2, p. 139-153, 2007.
- CAMACHO, J.P.; SHARBEL, T.F. BEUKEBOOM, L.W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science**, v. 355, n.1394, p. 163-178, 29 feb.2000.
- CARVALHO, L.; LACERDA, C.; GRIEP, G. *Mapa de sensibilidade ambiental da lagoa dos patos e região costeira oceânica do Rio Grande do Sul, Brasil: histórico e perspectivas*. Trabalho apresentado no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, no período de 2 a 5 de outubro de 2005.
- CHIACHIO, Marcio Cesar. Estudos Filogenéticos na subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriforme: Loricariidae) com base em sequências de DNA. Apresentado originalmente como tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2009.
- \_\_\_\_\_; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 606-617, 2008.

CONEJO, G.L.J.; COSTA, P.M.; SILVA, C.A.; BURNETT, B.A.J.; ACSELRAD, V.M. Panorama da qualidade das águas superficiais do Brasil. **Cadernos técnicos**, Brasília, Agência Nacional das Águas, n.1, 2005.

COPATII, C.E.; ZANINI, L.G.; VALENTE, A. Ictiofauna da microbacia do rio Jaguari, Juaguari/RS, Brasil. **Biota Neotropical**, v.9, n. 2. 2009.

COVAIN, R. **Estude Morphologique et Phylogenetique des poissons chats cuirasses Neotropicaux de la sous-famille des Loricariinae**. 2005. Dissertação de mestrado, Universidade de Genebra, 2005.

COVAIN, R., FISCH-MULLER, S. The genera of neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): practical key and synopsis. **Zootaxa**, n.1462, p.1-40, 2007.

CUNHA, S.B., GUERRA, A.J.T. **Geomorfologia do Brasil**. 4.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2006.

EIGENMANN, Carl H.; EIGENMANN, Rosa S. **South America Nematognathi**. PhD thesis, California Academy of Science, 1890.

ESCHMEYER, W. N. Genera, species, references. **Catalog of fishes**. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em: 16 out. 2013.

FERRARIS JUNIOR, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriform), and catalogue of primary types. **Zootaxa**, v. 1418, 2007.

\_\_\_\_\_. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

FICHBERG, I. **Relações filogenéticas das espécies do gênero *Rineloricaria* Bleeker, 1862** (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). Apresentado originalmente como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

\_\_\_\_\_; CHAMON, C.C. *Rineloricaria osvaldoi* (Siluriformes: Loricariidae): a new species of armored catfish from rio Vermelho, Araguaia basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n. 3, p.347-354, 2008.

FLORES-LOPES, Fábio. **Monitoramento ambiental da bacia hidrográfica do Lago Guaíba – RS – Brasil, através da utilização de diferentes metodologias aplicadas a taxocenoses e peixes**. RS, Brasil. Originalmente apresentado como tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006, 234 p.

FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R. Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. **Genome**, n. 46, p. 473-477, 2003.

\_\_\_\_\_; MALABARBA, L.R.; PEREIRA, E.H.L.; SILVA, J.F.P. Alterações histológicas em placas ósseas do peixe cascudo *Rineloricaria strigilata* (Hensel) (Teleostei,

Loricariidae) e sua frequência no lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 3, p. 699 - 709, 2001.

FREITAS, H.E.A. **Descrição cariotípicas de exemplares de *Sturisoma robustum* (Loricariidae, Loricariinae), do córrego do Onça, afluente do rio Taquari, Município de Coxim.** Apresentado originalmente como trabalho de conclusão de curso na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Coxim, Coxim, MS. 2007.

GALVES, W.; SHIBATTA, O. A.; JEREP, F. C. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto Paraná: uma revisão histórica. **Semina**, v. 30, n. 2, p. 141-154, 2009.

GHAZZI, M. S. Nove espécies novas do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Uruguai, do sul do Brasil. **Iheringia. Série Zool.**, Porto Alegre, v. 98, n. 1, p.100-122, 2008.

GINDRI, B.S. **Contribuição ao estudo citogenético em Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da região do alto Taquari.** Apresentado originalmente como dissertação de Mestrado, Universidade estadual de Maringá. Maringá, 2009.

GROMICHO M.; COELHO, M.M.; ALVES, M.J.; COLLARES-PEREIRA A. Cytogenetic analysis of *Anaecypris hispânica* and its relationship with the paternal ancestor of the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex. **Genome**, v. 49, p.1621-1627, 2006.

INGENITO, L.F.S.; GHAZZI, M.S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V. Two new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Iguaçu basin, southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n. 3, p. 355-366, 2008.

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

\_\_\_\_\_; SEIDEL, P.; MICHELS, E.; SCHRAML, E. ; WERNER, A. Diagnose vierzehn neuer Gattungen der Familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi). **Datz-Sonderheft**, v. 2, p. 17-24, 2001.

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

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

LANGANI, F.; CORRÊA E CASTRO, R.M.; 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**, v.7, n. 3, 2007.

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

LIMA, F. C. T.; RIBEIRO, A. C. Continental scale tectonic controls of biogeography and ecology. In: REIS, Roberto E.; ALBERT, James. (Org.). **Historical Biogeography of Neotropical. Freshwater Fishes**. Los Angeles: University of California Press, 2011. p. 145-164.

LIMEIRA, D. M.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C. H. Allozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí, upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 431-435, 2009.

MAACK, Reinhard. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 3. ed. Curitiba, Ed. Imprensa Oficial, 2002.

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

MALABARBA, L.R. Histórico sistemático e lista comentada das espécies de peixes de água doce do sistema da Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. **Série Zool.**, v. 2, n. 8, p. 107-179, 1989.

\_\_\_\_\_.; ISAIA, E. A. The fresh water fish fauna of the Rio Tramandaí drainage, Rio Grande do Sul, Brazil, with a discussion of its historical origin. **Série Zool.**, v. 5, n.12, p.197-223, 1992.

\_\_\_\_\_.; PEREIRA, E.H.L.; SILVA, J.F.P. da; BRUSCHI JÚNIOR.W.; FLORES-LOPES, F. Avaliação da qualidade da água através da frequência de anomalias morfológicas em peixes: estudo de caso no lago Guaíba. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. Série Zool.**, PUCRS, v. 17, n. 2, p. 97-128, 2004.

MALABARBA, L.R. **Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí**. Porto Alegre: Via Sapiens, 2013.

MENDES-NETO, Ernani de Oliveira. Estudos citogenéticos em algumas espécies de Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) da região de transposição para o rio Piumhi para o rio São Francisco. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.

MILANI, E.J.; FACCINI, U.F.; SCHERER, C.M.S.; ARAÚJO, L.M.; CUPERTINO, J.A. Sequences and stratigraphy ichierarchy of the Paraná Basin (Ordovician to Cretaceous), Southern Brazil. **Boletim IG-USP. Série Científica**, São Paulo, n. 29, p. 125-173, 1998.

MONTOYA-BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships of the *Loricariidae* (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: MALABARBA, L.R., R.E. REIS, R.P.,

PETRY, P.; RODRIGUES, S. T.; NETO, M. B. R.; MATSUMOTO, M. H.; KIMURA, G.; BECKER, M.; REBOLLETO, P.; ARAÚJO, A.; OLIVEIRA, B.; SOARES, M. S.; OLIVEIRA, M., G.; GUIMARÃES, J. Análise de Risco Ecológico da Bacia do Rio Paraguai: Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai. **The Nature Conservancy**, Brasília, DF, 2011. WWF-Brasil. The Nature Conservancy do Brasil.

NEIFF, J.J. Aspects of primary productivity in the lower Paraná and Paraguay riverine system. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 3, Tomo I, p. 77-133, 1990.

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.

PORTO Fernanda Errero. **Diversidade Cromossômica em duas espécies da subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraguai-MS**. Apresentado originalmente como tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

\_\_\_\_\_; PORTELA-CASTRO, A.L.B; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Parana River basin. **Ichthyol Res**, v. 10, 2011.

\_\_\_\_\_; Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1654-1659, 2010.

PY-DANIEL, L.H.R. **Phylogeny of the neotropical armored catfishes of the subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae)**. PhD. Thesis, University of Arizona, 1997.

\_\_\_\_\_; FICHBERG, I. A new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae: Loricariinae) from rio Daraá, rio Negro basin, Amazon, Brasil). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 3, p. 339-346, 2008.

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

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

RIBEIRO, A. C.; LIMA, F. C. T.; MENEZES, N. A. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. In: CARVALHO, Claudio; ALMEIDA, Eduardo. (Org.). **Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos**. São Paulo: Roca, 2011. p. 261-276.

\_\_\_\_\_; JACOB, R. M.; SILVA, R. R. S. R.; LIMA, F. C. T.; FERREIRA, D. C.; FERREIRA, K. M.; MARIGUELA, T. C.; PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C. Distributions and phylogeographic data of rheophilic freshwater fishes provide evidences on the geographic extension of a central-brazilian amazonian palaeoplateau in the área of the presente day Pantanal Wetland. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 319-326, 2013.

RODRIGUES, Raquel Maria. **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2010.

- 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**, n. 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. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v. 22, p. 739-749, 2012.
- RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v.6, p. 93-100, 2008.
- SCHÄFER, A. **Fundamentos de ecologia e biogeografia das águas continentais**. Porto Alegre: Ed. Da Universidade UFRGS, 1984.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes. **Cytogenet Cell Genet.**, n. 27, p.190-193,1980.
- SLIJEPCEVIC, P. X. I. A. O. Y.; NATARAJAN, A. T.; BRYANT, P. E. Instability of CHO chromosomes containing interstitial telomeric sequences originating from Chinese hamster chromosome 10. **Cytogenet Cell Genet.**, n. 76, p. 58–60, 1997.
- VERA-ALCARAZ, H. S.; PAVANELLI, C. S.; ZAWADZKI, C. H., Taxonomic revision of the *Rineloricaria* species (Siluriformes: Loricariidae) from the Paraguay River basin. **Neotropical Ichthyology**, v.10, n.2, p 285-311, 2012.
- VIEIRA, A.L. Aspectos do metabolismo lipídico do curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) no estágio de repouso gonadal. **Bol. Inst. Pesca**, v. 11, n.1, p. 63-68, 1984.