Raquel Maria Rodrigues

Estudos cromossômicos e moleculares em
Loricariinae com ênfase em espécies de
Rineloricaria (Siluriformes, Loricariidae): uma
perspectiva evolutiva.

São Paulo

2010

Raquel Maria Rodrigues

Estudos cromossômicos e moleculares em
Loricariinae com ênfase em espécies de
Rineloricaria (Siluriformes, Loricariidae): uma
perspectiva evolutiva.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Biologia-Genética.

Orientadora: Prof^ª Dra. Lurdes Foresti
de Almeida-Toledo

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Rodrigues, Raquel Maria

Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva.
218pp.

Dissertação de Mestrado
Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Loricariinae 2. Evolução Cariotípica 3. Relações Filogenéticas

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Prof^a Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo

Para Rita.

Pelo Sonho é que vamos

Comovidos e mudos.

Chegamos? Não chegamos?

Haja ou não frutos

Pelo Sonho é que vamos.

Sebastião da Gam

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas e instituições que contribuíram para a realização dessa dissertação, tornando o trabalho mais fácil e agradável. A todos, meus sinceros agradecimentos:

- À professora Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo, pela oportunidade oferecida, pela orientação sábia e exigente, pelo incentivo e entusiasmo contagiante, pela confiança, profundo carinho e amizade sincera, pelas alegrias intensas e pelos abraços apertados.
- À professora Dra. Caroline Garcia, por me ensinar na pesquisa desde a técnica mais básica até a mais complexa, por ter me apresentado à senhora *Rineloricaria* e seus problemas, por participar de minha formação acadêmica, por contribuir intensamente para a realização desse projeto e por ser essa amiga tão querida e amada, que faz a saudade doer no peito e nos provoca choro no saguão do aeroporto.
- Ao professor Dr. Artur Antônio Andreatta, por ser um exemplo de profissionalismo, caráter e ética, por acreditar em mim, pela amizade ofertada e por fazer parte de minha formação como bióloga e docente.
- Ao professor Dr. Carlos Ribeiro Vilela, pelos ensinamentos didáticos e acadêmicos, por me apresentar à heurística e ao mutante *White*, por me fazer lembrar meu sobrenome e minha profissão todos os dias, pela amizade e pelo convívio agradável.
- À Dra. Ilana Fischberg e ao Dr. Osvaldo T. Oyakawa, pelo auxílio na identificação dos exemplares e pelas tardes descontraídas no Museu de Zoologia da USP.
- Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências da USP/São Paulo, pela infraestrutura e oportunidade de realização deste trabalho.

- Ao Governo do Estado de São Paulo pela bolsa parcial concedida durante a realização desta dissertação.
- À Dirigente de Ensino Vera Lúcia de Jesus Curriel, pela oportunidade oferecida ao aceitar minha designação como bolsista na Diretoria de Ensino Guarulhos Norte.
- À Deisy e Helenice, por toda ajuda burocrática, por sempre estar disponível, pelas conversas divertidas e pelo carinho dispensado a minha pessoa.
- Ao Eduardo, Leandro e Mário, pela ajuda e orientação quanto ao trâmite de pedido de auxílio à PROAP para idas em congressos e coletas.
- Aos amigos e colegas do Laboratório de Ictiogenética, Soraia, Daniella, Rubens, Fred, Sabrina, Rivi, Vânia, Pupis, Karine, Ricardo, Carol, Pedrinho, Claudinha, Felipe, Mari e Keila, pelas discussões acadêmicas, favores prestados, recados anotados, ensinamentos e, principalmente, pelas toneladas de bobagens compartilhadas, que muito nos fizeram rir.
- Ao técnico Carlos Eduardo Lopes, pelo perfil de liderança e dedicação empregadas nas coletas, por se arriscar nas corredeiras mais escorregadias, só para ir em busca de nosso material de trabalho, por me deixar comprar “maria mole” nos botequinhos beira-rio em dias de muito frio e por nunca deixar as abelhas o pegar, pois, do contrário, a coleta estaria acabada.
- Aos motoristas do IB, pela disponibilidade nas coletas. Aos técnicos do CEPTA, Benedito, Dalton e Jairo, pelo auxílio nas coletas em Cachoeira de Emas. Ao Dr. José Senhorini, pelo apoio nas coletas do rio Mogi Guaçu. Aos amigos de coleta Maurão e Pedro, pela companhia, por só me deixarem entrar na água em último caso e por conseguirem pegar os peixinhos para mim.

- A todos os meus companheiros de trabalho da Diretoria de Ensino, em especial, aos colegas da Oficina Pedagógica e do Planejamento de Ensino, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pelo apoio, principalmente em relação ao mestrado.
- À minha grande amiga mãe adotiva japonesa paraguaia, Myrian Taeko, pelo grande apoio, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e pelos almoços agradáveis.
- Aos amigos mestrando, Andréia, Jorge, Nilton, Ergos, Maria Lúcia e Rogério, por compartilharem as alegrias e tristezas de um professor mestrando da rede estadual.
- Às grandes amigas que conquistei na USP, Carol, Keila, Pupis, Karine, Marcinha e Claudinha, pelo que cada uma me ensinou, por cada sorriso aberto ou cada lágrima derramada, pelas palhaçadas, apoio, conversas fora de hora e tão oportunas.
- Aos colegas do departamento, Thiago, Luís, Paulo Henrique, Tatiana, Gustavo, Beatriz, Alysson e Artur, pelas conversas de corredor, pela companhia no café da tarde e pelas discussões filosóficas e político-partidárias apreciadas no CA.
- Ao amigo Ary Bressane e a amiga Marcinha, pelas ajudas técnicas e teóricas oferecidas para o andamento dessa dissertação, pelos programinhas de computador que facilitaram meu cotidiano e pelas revisões dos textos, sempre com muita disposição.
- Aos amigos Jorge, Alexandre e Andréia, pela prontidão em revisar os textos em inglês.
- Aos meus irmãos e irmã, sobrinhos e sobrinhas, cunhadas e cunhados, pelos bons momentos que me fizeram esquecer um pouco dos afazeres do mestrado.
- Aos meus pais, em especial minha mãe, que mesmo sem entender o que é um mestrado, foi, ao seu modo, batalhadora e persistente para que eu chegasse até aqui.
- À Rita, por tudo. Sem as pessoas que citei acima o mestrado seria mais difícil. Sem você, Rita, o mestrado sequer seria.

Sumário

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabela.....	xvi
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
1. Introdução Geral.....	01
1.1. A Bacia do Alto Paraná e as drenagens do Leste: passado e presente.....	02
1.2. A Ordem Siluriformes e a família Loricariidae.....	06
1.3. A subfamília Loricariinae.....	11
1.4. Marcadores moleculares e sua aplicabilidade em peixes.....	14
1.5. Objetivos.....	33
2. Materiais e Métodos.....	35
2.1. Locais de coleta e Material utilizado.....	36
2.2. Procedimentos metodológicos.....	39
2.2.2. Procedimentos citogenéticos.....	39
2.2.3. Procedimentos moleculares.....	45
Capítulo I - O uso de ferramentas citogenéticas no entendimento dos mecanismos de evolução cromossômica em <i>Rineloricaria</i> (Siluriformes, Loricariidae) e suas implicações taxonômicas.....	54
Capítulo II - Caracterização cromossômica de <i>Harttia</i> , <i>Loricaria</i> e <i>Loricariichthys</i> (Siluriformes, Loricariidae): considerações sobre a evolução cariotípica de Loricariinae.....	93
Capítulo III - Mapeamento físico comparativo dos genes ribossomais 5S e 18S em doze espécies de Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae).....	114
Capítulo IV - DNA <i>barcoding</i> como aliado na redução dos conflitos taxonômicos existentes no gênero <i>Rineloricaria</i> (Siluriformes,	

Loricariidae).....	139
Capítulo V - Relações evolutivas entre espécies de <i>Rineloricaria</i> (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste brasileiro.....	160
Conclusões Gerais.....	188
Referências Bibliográficas.....	195
Anexo I.....	212
Anexo II.....	216

Lista de Figuras

Figura 1.1: Mapa evidenciando a distribuição geográfica dos números diplóides já descritos para o gênero <i>Rineloricaria</i>	22
Figura 1.2: Árvore de consenso, baseada em dados morfológicos e moleculares, representando a hipótese das relações filogenéticas de integrantes da subfamília Loricariinae proposta por Covain <i>et al.</i> (2008). Legenda: 1 = Tribo Harttiini, 2 = Tribo Loricariini, A = Subtribo Sturisomina, B = Subtribo Loricariina.....	32
Figura 2.1: Mapa evidenciando os locais de coleta em bacias hidrográficas de três estados brasileiros.....	36
Figura 2.2: Exemplares ilustrativos dos quatro gêneros estudados. Os exemplares que, nessa figura, ilustram os gêneros <i>Harttia</i> , <i>Loricaria</i> , <i>Loricariichthys</i> e <i>Rineloricaria</i> , apresentam um comprimento corporal de 9,4 cm, 12,3 cm, 20,5 cm e 9,7 cm, respectivamente. As fotos ilustrativas foram extraídas dos trabalhos de 1) Provenzano R. <i>et al.</i> (2005), 2) Thomas e Rapp Py-Daniel (2008), 3) Reis e Pereira (2000) e 4) Rodríguez e Miquelarena (2005)	37
Figura 3.1: Cariótipos de <i>R. latirostris</i> corados com Giemsa. A: População A. B: População B. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS.....	82
Figura 3.2: Cariótipo de <i>R. pentamaculata</i> corado com Giemsa (A). Cariótipo corado com Giemsa das populações A e B de <i>Rineloricaria</i> sp. (B). Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies.....	83
Figura 3.3: Cariótipos corados com Giemsa de <i>Rineloricaria</i> sp. 2. Em A: Citótipo A. Em B: Citótipo B. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambos os citótipos.....	84

Figura 3.4: Em A: Citótipo C corado com Giemsa de *Rineloricaria* sp. 2. Em B: Cariótipo corado com Giemsa de *Rineloricaria* sp. 3. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies..... 85

Figura 3.5: Cariótipo de *Rineloricaria* sp. 4 corado com Giemsa (A). Cariótipo de *Rineloricaria* sp. 5 corado com Giemsa (B). Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies..... 86

Figura 3.6: Cariótipos de *Rineloricaria* sp. n. corado com Giemsa. A: Citótipo A da população A. B: Citótipo B da população A. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambos os citótipos..... 87

Figura 3.7: Em A: Cariótipo corado com Giemsa da população B de *Rineloricaria* sp. n. Em B: Cariótipo de *R. cf. nigricauda* corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies. Destaque também para as RONS heteromórficas em b' e homomórficas b'', encontradas na população da espécie *R. cf. nigricauda*. 88

Figura 3.8: Metáfases somáticas submetidas ao bandamento C em A: População A de *R. latirostris*, B: População B de *R. latirostris*, C: *R. pentamaculata*, D: População A de *Rineloricaria* sp. 1, E: População B de *Rineloricaria* sp. 1, F: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, G: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, H: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2, I: *Rineloricaria* sp. 3, J: *Rineloricaria* sp. 4, K: *Rineloricaria* sp. 5, L: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n., M: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n., N: População B de *Rineloricaria* sp. n., O: *R. cf. nigricauda*..... 88

Figura 3.8: Metáfases somáticas com sondas teloméricas em A: População A de *R. latirostris*, B: População .B de *R. latirostris*, C: População A de *Rineloricaria* sp. 1, D: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, E: *Rineloricaria* sp. 4, F: *Rineloricaria* sp. 5, G: População B de *Rineloricaria* sp. n. e H: *R. cf. nigricauda*. Em A, as setas indicam as ITSs encontradas no cariótipo da população A de *R. latirostris*..... 89

Figura 3.9: Metáfases somáticas de A: População A de *R. latirostris*, B: *R. pentamaculata*, C: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, D: Citótipo B de

<i>Rineloricaria</i> sp. 2, E: <i>Rineloricaria</i> sp. 3, F: <i>Rineloricaria</i> sp. 5, G: Citótipo A da população A de <i>Rineloricaria</i> sp. n. e H: <i>R. cf. nigricauda</i> . As setas indicam as associações cromossômicas que estabelecem a configuração radial.....	90
Figura 3.10: Metáfases somáticas submetidas ao bandejamento C em A: <i>R. pentamaculata</i> e B: Citótipo B da população A de <i>Rineloricaria</i> sp. n. As setas indicam blocos heterocromáticos conspícuos próximos às regiões centroméricas dos cromossomos envolvidos na configuração radial... ..	91
Figura 3.11: Mapa hidrográfico com a distribuição geográfica dos números diplóides encontrados para o gênero <i>Rineloricaria</i> . Os algarismos em preto representam os números diplóides encontrados na literatura. Os algarismos em vermelho representam os números diplóides descritos no presente trabalho.....	91
Figura 4.1: Em A: Cariótipo de <i>Harttia</i> sp. n. corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS. Em B: A mesma metáfase somática utilizada na montagem do cariótipo de <i>Harttia</i> sp. n. submetida ao bandejamento C. Em C: Metáfase somática de <i>Harttia</i> sp. n. com sondas teloméricas.....	92
Figura 4.2: Em A: Cariótipo de <i>Loricaria prolixa</i> corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS e os pares que apresentaram marcações de ITSs. Em B: Metáfase somática de <i>Loricaria prolixa</i> submetida ao bandejamento C. Em C: Metáfase somática de <i>Loricaria prolixa</i> com sondas teloméricas. As setas indicam as ITSs encontradas no cariótipo da espécie.....	110
Figura 4.3: Em A: Cariótipo de <i>Loricariichthys platymetopon</i> corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS. Em B: Metáfase somática de <i>Loricariichthys platymetopon</i> submetida ao bandejamento C. Em C: Metáfase somática de <i>Loricariichthys platymetopon</i> com sondas teloméricas.....	112
Figura 4.4: Em A: Metáfase somática de <i>Loricaria prolixa</i> com sondas teloméricas. As setas indicam as ITSs encontradas no cariótipo da espécie.	

Em B, a mesma metáfase em imagem invertida e em escala cinza, para uma melhor visualização da morfologia cromossômica. As setas indicam os cromossomos que apresentaram as ITSs.....

113

Figura 5.1: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de A: *Harttia* sp. n., B: *Loricaria prolixa*, C: *Loricariichthys platymetopon*, D: População A de *Rineloricaria latirostris*, E: População B de *Rineloricaria latirostris*, F: *Rineloricaria pentamaculata*, G: População A e B de *Rineloricaria* sp. 1, H: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, I: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.....

131

Figura 5.2: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de A: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2, B: *Rineloricaria* sp. 3, C: *Rineloricaria* sp. 4, D: *Rineloricaria* sp. 5, E: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n, F: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n, G: População B de *Rineloricaria* sp. n, H: *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.....

132

Figura 5.3: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de A: *Harttia* sp. n., B: *Loricariichthys platymetopon*, C: População A de *Rineloricaria latirostris*, D: População B de *Rineloricaria latirostris*, E: *Rineloricaria pentamaculata*, F: População A e B de *Rineloricaria* sp. 1, G: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, H: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, I: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.....

133

Figura 5.4: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de A: *Rineloricaria* sp. 3, B: *Rineloricaria* sp. 4, C: *Rineloricaria* sp. 5, D: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n, E: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n, F: População B de *Rineloricaria* sp. n, G: *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.....

134

Figura 5.5: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em

metáfases de A: População A de *Loricaria prolixa*, B: População B de *Loricaria prolixa*, C: População C de *Loricaria prolixa*. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado..... 135

Figura 5.6: Em A: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de *Loricariichthys platymetopon*. Em B: A mesma metáfase submetida à técnica de impregnação por nitrato de prata. As setas indicam o par de cromossomos portador de um dos sítios de DNAr 5S e do sítio de DNAr 18S, indicando a sintenia entre esses dois genes..... 135

Figura 5.7: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de A: *Rineloricaria* sp. 5 e B: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n. Em C, hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de *Rineloricaria pentamaculata*. As setas indicam genes ribossomais localizados nas regiões pericentroméricas dos cromossomos envolvidos na configuração radial..... 135

Figura 5.8: Idiograma de A: *Harttia* sp. n., B: *Loricaria prolixa*, C: *Loricariichthys platymetopon*, D: População A de *Rineloricaria latirostris*, E: População B de *Rineloricaria latirostris*, F: *Rineloricaria pentamaculata*. As barras em preto representam a localização do DNAr 18S. As barras em cinza representam a localização do DNAr 5S. M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico, *par com heteromorfismo de tamanho, **só um dos homólogos apresentou o gene..... 136

Figura 5.9: Idiograma de A: População A e B de *Rineloricaria* sp. 1, B: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, C: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, D: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2, E: *Rineloricaria* sp. 3, F: *Rineloricaria* sp. 4. As barras em preto representam a localização do DNAr 18S. As barras em cinza representam a localização do DNAr 5S. M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico..... 137

Figura 5.10: Idiograma de A: *Rineloricaria* sp. 5, B: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n, C: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n, D: População B de *Rineloricaria* sp. n, E: *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As barras em preto representam a localização do DNAr 18S. As barras em cinza representam a localização do DNAr 5S. M =

metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A =
acrocêntrico, *par com heteromorfismo de tamanho, **só um dos
homólogos apresentou o gene..... 138

Figura 6.1: Árvore de *neighbour-joining* utilizando modelo de distância
K2P para sequências de COI pertencentes a espécies de Loricariinae. A
topologia da árvore foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50. As
barras e as letras maiúsculas, colocadas do lado direito da topologia da
árvore, delimitam os cinco clados monofiléticos propostos no presente
trabalho para as espécies de *Rineloricaria*..... 156

Figura 6.2: Árvore de *neighbour-joining* em escala, com modelo de
distância K2P em sequências de COI pertencente a espécies de Loricariinae.
A topologia foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50..... 156

Figura 6.3: Árvore de *neighbour-joining* utilizando modelo de distância
K2P em sequências de COI pertencentes a espécies de Loricariinae. A
topologia foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50. As barras e os
nomes científicos, colocados do lado direito da topologia da árvore,
delimitam os cinco clados monofiléticos propostos no presente trabalho para
as espécies de *Rineloricaria* e denominados segundo o BOLD..... 157

Figura 6.4: Árvore de *neighbour-joining*, com modelo de distância K2P, em
sequências de COI pertencentes a todos os indivíduos analisados de cada
população (ou populações) que representa(m) as espécies de Loricariinae
estudadas no presente trabalho. A topologia foi gerada com valores de
bootstrap acima de 50. Ao lado do nome das espécies está relacionado o
número de tombo do Laboratório de
Ictiogenética..... 158

Figura 7.1: Mapas de restrição construídos com base nos sítios de cortes
apresentados para cada enzima utilizada. As letras representam os haplótipos
atribuídos para cada padrão de restrição encontrado..... 182

Figura 7.2: Árvore UPGMA construída com base nos haplótipos
conjugados obtidos pela técnica de PCR-RFLP dos genes mitocondriais
ATPase 6 e 8..... 183

Figura 7.3: Gráficos da frequência observada de transições e transversões <i>versus</i> a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para os genes (A) ATPase 6 e 8, (B) Citocromo b, (C) todas as regiões gênicas concatenadas.....	184
Figura 7.4: Topologia de Neighbor-Joining obtida para as duas regiões gênicas concatenadas. Os valores de <i>bootstrap</i> para 10000 replicações encontram-se acima dos ramos.....	185
Figura 7.5: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas. Os valores em preto correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> para 1000 replicações, e os valores em vermelho aos valores de índice de Bremer.....	185
Figura 7.6: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas e com a sobreposição dos possíveis eventos vicariantes. Os valores em preto correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> para 1000 replicações, e os valores em vermelho aos valores de índice de Bremer.....	186
Figura 7.7: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas e com a sobreposição dos dados citogenéticos. Os valores em preto correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> para 1000 replicações, e os valores em vermelho aos valores de índice de Bremer.....	187
Figura 8.1: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima <i>Alu I</i> ...	213
Figura 8.2: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima <i>Eco RI</i>	213
Figura 8.3: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima <i>Hae III</i>	214
Figura 8.4: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima <i>Hinf I</i> .	214
Figura 8.5: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima <i>Mbo I</i> .	215
Figura 8.6: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima <i>Rsa I</i> .	215
Figura 9.1: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor	

Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 10000 réplicas. 216

Figura 9.2: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 10000 réplicas. 216

Figura 9.3: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas..... 217

Figura 9.4: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas..... 217

Lista de Tabela

Tabela 1: Estudos citogenéticos na subfamília Loricariinae.....	21
Tabela 2: Localização de RONS em espécies de Loricariinae.....	24
Tabela 3: Lista das espécies analisadas, com os dados dos locais de coleta e as técnicas utilizadas em cada população.....	38
Tabela 4: Dados cromossômicos das espécies de <i>Rineloricaria</i> estudadas no presente trabalho e suas respectivas populações.....	62
Tabela 5: Número e localização dos sítios ribossomais 18S e 5S em Loricariinae.....	121
Tabela 6: Divergência genética do gene COI, baseada no modelo de distância K2P, entre as espécies de Loricariinae estudadas no presente trabalho.....	159
Tabela 7: Frequências absoluta e relativa dos haplótipos conjugados encontrados para as populações/espécies analisadas no presente trabalho.....	171
Tabela 8: Caracterização da informação filogenética contida em cada um dos genes mitocondriais estudados.....	174

Os loricariíneos são Siluriformes altamente derivados e contabilizam cerca de 210 espécies, apresentando uma irradiação adaptativa bem sucedida, tendo representantes na Costa Rica, no Panamá e em toda a América do Sul, e ocorrendo também em ambos os lados dos Andes. Discussões taxonômicas conflituosas são encontradas sobre esta subfamília, envolvendo muitos de seus gêneros, principalmente os mais numerosos, como é o caso de *Rineloricaria*. O elevado número de espécies (64), a ampla distribuição geográfica e a presença de características diagnósticas válidas para todos os gêneros da subfamília, levam à discussão a proposta de uma subdivisão no gênero *Rineloricaria*, além de indicar as dificuldades de identificação apresentadas pelo gênero. Em relação às características citogenéticas, Loricariinae apresenta-se como uma subfamília heterogênea e diversificada, com o número diplóide variando de $2n=36$ cromossomos a $2n=74$ cromossomos. O gênero *Rineloricaria* contribui intensamente para essa variação, com números cromossômicos variando de $2n=36$ a $2n=70$ cromossomos. A participação de rearranjos Robertsonianos na evolução cariotípica de *Rineloricaria* é algo claro, mas evidências que confirmem a ordenação desses eventos não existem. No presente trabalho, técnicas citogenéticas e moleculares foram utilizadas com a finalidade de estabelecer relações evolutivas entre os integrantes da subfamília Loricariinae, em especial do gênero *Rineloricaria*, entender a evolução cariotípica dessa subfamília e identificar marcadores citogenéticos e moleculares úteis na identificação e descrição de espécies de *Rineloricaria*. Foram analisados os cromossomos de doze espécies de Loricariinae, pertencentes aos gêneros *Harttia*, *Loricariia*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria*, coletadas na Bacia do Alto Paraná e nas drenagens do Leste brasileiro. Três regiões do genoma mitocondrial (ATPase 6 e 8, Citocromo b e Citocromo c

Oxidase I) foram investigadas nessas espécies no presente trabalho. As análises filogenéticas recuperaram o gênero *Rineloricaria* como um grupo monofilético. Os dados citogenéticos permitiram o estabelecimento de tendências de evolução cromossômica em Loricariinae e no gênero *Rineloricaria*. O presente trabalho reforça a importância da utilização de diferentes abordagens na realização de estudos taxonômicos e evolutivos, sugerindo uma nova revisão do gênero *Rineloricaria* que leve em consideração os dados genéticos obtidos.

Loricariinae are Siluriformes highly derivative and account for about 210 species, with a successful adaptive radiation and representatives can be seen in Costa Rica, Panama and throughout South America, and also occurring on both sides of the Andes. Conflicting taxonomic discussions are found on this subfamily, involving many of its genera, especially the most numerous, as *Rineloricaria*. The high number of species (64), the wide geographic distribution and the presence of valid diagnostic features for all genera of the subfamily, leads to a discussion of a proposed subdivision in the genus *Rineloricaria*, besides indicating the difficulties of identification presented by the genus. With respect to cytogenetic characteristics, Loricariinae is presented as a heterogeneous and diverse subfamily, varying diploid number of $2n = 36$ chromosomes to $2n = 74$ chromosomes. The genus *Rineloricaria* contributes strongly to this variation, with chromosome numbers ranging from $2n = 36$ to $2n = 70$ chromosomes. The involvement of Robertsonian rearrangements in the karyotype evolution of *Rineloricaria* is something unclear, but evidences that confirm the ordination of these events does not exist. In this study, cytogenetic and molecular techniques were used in order to establish evolutionary relationships among members of the subfamily Loricariinae, especially the genus *Rineloricaria*, and also to understand the karyotype evolution of this subfamily and to identify cytogenetic and molecular markers useful in identifying and describing species of *Rineloricaria*. We analyzed the chromosomes of twelve species of Loricariinae from genera *Harttia*, *Loricariia*, *Loricariichthys* *Rineloricaria* from the Upper Paraná Basin and the drainages of eastern Brazil. Three regions of the mitochondrial genome (ATPase 6 and 8, Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase I) were investigated in these species of this study. The phylogenetic analysis

recovered the genus *Rineloricaria* as a monophyletic group. The cytogenetic data allowed us to establish trends in chromosomal evolution in Loricariinae and in the genus *Rineloricaria*. The present study underscores the importance of using different approaches in carrying out taxonomic and evolutionary studies, suggesting a further revision of the genus *Rineloricaria* that takes into account the genetic data obtained.

1. Introdução Geral

1.1 A Bacia do Alto Paraná e as drenagens do Leste: passado e presente

O contexto de tectônica de placa da América do Sul foi estabelecido no início do Cretáceo, há aproximadamente 112 milhões de anos, com a sua separação da África e a abertura do Atlântico Sul. Esse continente tem permanecido num estado de compressão oeste – leste do qual os Andes são o principal resultado. O processo de formação dos Andes foi um importante evento geológico na evolução dos rios da América do Sul e seus peixes, pois muitos grupos monofiléticos são representados nos rios que tiveram seus cursos atuais definidos pelo soerguimento que resultou nessa cordilheira (Lundberg *et al.*, 1998).

A Bacia do Paraná, originada no início do Devoniano ou no fim do Siluriano, apresentou, no passado, uma ligação com a Bacia do Amazonas (Petri e Fúlfaro, 1983). Essa ligação pretérita, ocorrida numa época em que os continentes americano e africano ainda estavam unidos (Menezes, 1972), pode ser corroborada pela íntima relação encontrada entre as ictiofaunas que compõem essas duas bacias hidrográficas (Bonetto e Drago, 1968). Estudos paleogeográficos e de paleo-drenagens da América do Sul indicam que o divisor moderno entre as drenagens do Paraná e do Amazonas foi estabelecido há cerca de 30 Ma (Lundberg *et al.*, 1998).

A atual configuração da Bacia do Rio Paraná deve-se ao soerguimento que resultou na formação da Serra do Mar, no final do Terciário, e tal evento teria separado os rios das bacias costeiras, cujas águas vão diretamente para o Oceano Atlântico, daqueles que drenam para o interior do continente (Oyakawa *et al.*, 2006). Formada pela confluência dos rios Paranaíba e Grande, a Bacia do Rio Paraná é a segunda maior rede de drenagens da América do Sul, com uma área de 3,2 milhões km², que inclui o sistema dos rios da Prata-Uruguai-Paraná-Paraguai, e um curso de aproximadamente

4000 km de extensão (Castro *et al.*, 2003; Petri e Fúlfaro, 1983). Castro *et al.* (2005) destacam em seu trabalho a ocorrência de um inequívoco endemismo nesta bacia.

O Alto Paraná corresponde à porção da Bacia do Rio Paraná situada a montante de Sete Quedas (agora inundada pelo Reservatório de Itaipu), abrigando grandes tributários como o rio Grande, o rio Paranaíba, o rio Tietê e o rio Paranapanema (Castro *et al.*, 2003). O último levantamento da ictiofauna desse sistema hidrográfico, feito por Langeani *et al.* (2007), aponta que o Alto Paraná possui 310 espécies de peixes, sendo a grande maioria representada por Siluriformes e Characiformes (41% e 37,4%, respectivamente).

O sistema de drenagens do Leste, que se estende da foz do rio São Francisco até o rio Itajaí, pode ser dividido em três principais drenagens: a Bacia do Rio Paraíba do Sul, a Bacia do Rio Ribeira do Iguape e o conjunto de drenagens independentes da região costeira (Kavalco, 2008). A Bacia do Rio Paraíba do Sul é uma das maiores bacias desse sistema de drenagens (Deffontaines, 1945; Long, 1953), ocupando uma área de aproximadamente 57000 km² entre os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Simões, 1977). O rio Paraíba do Sul nasce na Serra da Bocaina, no Estado de São Paulo, e deságua no norte fluminense, tendo o seu leito inserido no vale formado pelas elevações da Serra da Mantiqueira e da Serra do Mar. A composição de sua ictiofauna inclui cerca de 160 espécies de peixes de água doce e estuarina, com uma predominância de Siluriformes e Characiformes, sendo algumas espécies endêmicas dessa bacia (Bizerril, 2001).

O rio Ribeira do Iguape, único grande rio do Estado de São Paulo que corre direto para o oceano Atlântico, nasce no Estado do Paraná, na região de Ponta Grossa e tem sua foz no litoral paulista, na cidade de Iguape, região da Ilha Cumprida. Essa drenagem, que possui uma área de aproximadamente 25000 km², está inteiramente

inserida no maior remanescente de Mata Atlântica do Sul e Sudeste do Brasil. Segundo Castro e Menezes (1996), existem cerca de 150 espécies de peixes nesse sistema hidrográfico, algumas endêmicas dessa região, mas acredita-se que este número esteja subestimado. Ainda segundo esses autores, 58% dessas espécies são representantes da Ordem Siluriformes.

As bacias costeiras da Serra do Mar são caracterizadas como pequenas e médias drenagens independentes. Apesar de isoladas entre si, diversas espécies são comuns a esses sistemas, evidenciando uma história evolutiva comum. A ictiofauna dessas bacias apresenta, de modo geral, baixa riqueza (48 espécies) e elevado endemismo, com algumas espécies exclusivas de uma ou mais bacias e o predomínio de Siluriformes se repetindo nessas drenagens (Castro e Menezes, 1996; Buckup, 1999). A origem dessas drenagens independentes está relacionada à origem e evolução da Serra do Mar, e, de acordo com Menezes (1988) e Weitzman *et al.* (1988), o isolamento geográfico nessas bacias deve estar associado a variações do nível do mar nos últimos 300.000 anos.

A existência de conexões pretéritas entre o rio Tietê e as drenagens costeiras através de uma conformação antiga do vale do rio Paraíba, ou por meio de eventos de captura de cabeceiras como o ocorrido entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (Ab'Saber, 1998; Malabarba, 1998; Castro *et al.*, 2003), foram responsáveis pela distribuição de algumas espécies de ambas as bacias em drenagens vizinhas, tais como: rios Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e algumas drenagens litorâneas menores (Langeani, 1989; Weitzman e Malabarba, 1999; Ribeiro, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2007). Essa hipótese de conexão pretérita é bem suportada com exemplos de espécies como *Hollandichthys multifasciatus*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon reticulatus*, *Pseudocorynopoma heterandria* e *Gymnotus pantherinus*, que são encontradas atualmente no rio Tietê e nas drenagens costeiras do Atlântico (Langeani,

1989), drenagens estas que não apresentam atualmente qualquer tipo de conexão devido principalmente aos soerguimentos que resultaram na Serra do Mar, no Terciário, e na Serra da Mantiqueira, no Quaternário.

Tanto a bacia do Alto Paraná quanto o sistema de drenagens do Leste, apesar de apresentarem importantes rios de grande porte e alta vazão, tais como o rio Tietê, o rio Paraíba do Sul e o rio Ribeira do Iguape, têm em sua principal formação pequenos riachos que abastecem esses rios de grande porte. Segundo Lowe-McConnell (1969), sistemas de rios tropicais de grande porte admitem que algumas espécies de peixes se isolem geograficamente nas cabeceiras de seus tributários, através de barreiras intrapopulacionais físicas, químicas ou bióticas, permitindo que estas evoluam dentro do próprio sistema. Dessa maneira, o isolamento de populações pode se dar tanto pelo surgimento de novas montanhas, como a Cordilheira dos Andes ou a Serra do Mar, quanto pelos próprios sistemas hidrográficos e suas particularidades, impedindo o fluxo gênico e permitindo que essas populações evoluam de forma independente.

A ordem Siluriformes é predominante nos ambientes de cabeceiras da maioria das bacias hidrográficas da América do Sul (Oyakawa *et al.*, 2006), indicando que os representantes dessa ordem se adaptaram perfeitamente a este tipo de ambiente. A predominância de Siluriformes na ictiofauna das bacias do Leste e do Alto Paraná é algo notável nos principais trabalhos de levantamento ictiofaunístico nessas bacias (Castro e Menezes, 1996; Buckup, 1999; Bizerril, 2001; Langeani *et al.*, 2007). Além disso, muitas espécies de Siluriformes encontradas nessas drenagens são endêmicas do sistema hidrográfico em que se encontram, como por exemplo, *Harttia kronei*, espécie endêmica da Bacia do Rio Ribeira do Iguape (Oyakawa *et al.*, 2006). Como os Siluriformes são peixes extremamente adaptados a ambientes de cabeceiras e as drenagens do Leste e do Alto Paraná fomentam este tipo de ambiente, o predomínio de Siluriformes na

composição da ictiofauna dessas bacias é um resultado esperado. Desse modo, estudos evolutivos com representantes da ordem Siluriformes, encontrados nessas bacias, tornam-se um recurso importante para compreender como a história geológica das bacias do Leste e do Alto Paraná e sua conformação atual, atuaram e continuam atuando na história evolutiva das espécies que compõem sua ictiofauna.

1.2 A ordem Siluriformes e a família Loricariidae

Os peixes são animais favoráveis para estudos evolutivos pois, além de representarem aproximadamente 50% de todos os Vertebrados (Nelson, 2006), eles se encontram em uma posição basal na filogenia desse grupo (Pough, 2008), sendo um excelente modelo utilizado na compreensão da origem e diversificação dos Vertebrados. Além disso, os peixes sofrem as maiores restrições quanto à sua dispersão, já que estão confinados à ambientes aquáticos, e, no caso de peixes de água doce, o seu confinamento aos sistemas hidrográficos resulta num estreito relacionamento entre a história das bacias e a história natural-evolutiva destes animais.

A ictiofauna da região Neotropical é a mais diversificada do mundo com cerca de 4500 espécies descritas das quase 13000 espécies de peixes de água doce conhecidas (Reis *et al.*, 2003; Nelson, 2006). Esta diversidade taxonômica pode ser explicada pelas complexas drenagens localizadas na América do Sul e suas interessantes histórias geológicas (Ribeiro, 2006). Os Siluriformes, conhecidos popularmente como peixes de couro, mandis, bagres, cascudos, entre outros, representam mais de 35% do total de espécies neotropicais, com 1647 espécies descritas (Reis *et al.*, 2003).

Das 62 ordens de peixes existentes, Siluriformes é a terceira maior, perdendo apenas para Perciformes e Cypriniformes (Nelson, 2006). De acordo com um levantamento feito por Ferraris (2007), Siluriformes tem 36 famílias, 477 gêneros e

3088 espécies distribuídas por todos os continentes, inclusive na Antártica, na qual é representada pela forma fóssil do gênero *Hypsidoris*.

Quanto à sua posição filogenética, os Siluriformes são os teleósteos mais derivados da Superordem Ostariophysi. Juntamente com Cypriniformes, Characiformes e Gymnotiformes, os Siluriformes formam um clado denominado série Otophysi, compreendendo um grupo de peixes ósseos diagnosticado pela presença do aparelho de Weber, um complexo formado por um conjunto de ossículos fundidos que conectam a bexiga natatória ao ouvido interno (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1996). A análise filogenética de Fink e Fink (1996), baseada em dados de morfologia externa e interna, propõe que Cypriniformes seja grupo-irmão dos demais Otophysi, e Characiformes apareça como grupo-irmão de Siluriformes mais Gymnotiformes.

Os Siluriformes apresentam uma grande variedade de formas, cores e tamanhos. Entretanto, existem algumas características comuns a todos os Siluriformes, que sustentam seu monofiletismo e são usadas na identificação de indivíduos dessa ordem. Entre elas, as referentes à morfologia externa são: corpo nu, com total ausência de escamas e revestido por uma pele espessa ou ainda, coberto total ou parcialmente por placas ósseas; nadadeiras raiadas e bem separadas; presença de nadadeira adiposa que, de modo geral, é bem desenvolvida; presença de barbilhões sensitivos e frequentemente acúleos fortes e pungentes à frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais, que podem inocular um veneno produzido por células glandulares localizadas no tecido epidérmico que cobre estes acúleos (Alexander, 1965; Mees, 1974; Burgess, 1989; Paxton e Eschmeyer, 1995; Paxton e Eschmeyer, 1998).

Esses peixes possuem, de modo geral, hábitos crepusculares e noturnos, habitando o fundo dos rios e permanecendo entre rochas e a vegetação (Ferraris, 1998 e 2007). São em sua maioria onívoros, mas existem representantes herbívoros,

planctófagos e carnívoros. Existem espécies com hábitos alimentares peculiares, como os representantes de duas subfamílias de Trichomycteridae: os Vandelliinae, que se alimentam do sangue das brânquias de outros peixes (Kelley e Atz, 1964; Machado e Sazima, 1983) e os Stegophilinae, que são “comedores de escamas” (Nelson, 2006). Na Amazônia, Vandelliinae e Stegophilinae são popularmente conhecidos como “candirus” e a penetração acidental de Vandelliinae na uretra de humanos e outros mamíferos tem sido reportada há muitos anos (Gudger, 1930).

Ainda que sejam predominantemente de ambiente dulcícola, os Siluriformes apresentam formas marinhas, como é caso das famílias Ariidae e Plotosidae (Lowe-McConnel, 1975), sendo esta uma característica derivada dentro da ordem. Espécies adaptadas a ambientes estuarinos, pertencentes às famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangassiidae, também são encontradas no grupo (de Pinna, 1998). Assim, os Siluriformes têm se adaptado a uma série de condições ambientais, refletindo em sua morfologia e habitats (de Pinna, 1993) e conferindo à ordem a condição de apresentar uma distribuição cosmopolita. Entretanto, a distribuição da maioria dos Siluriformes parece estar limitada pela temperatura, uma vez que boa parte de seus representantes habita as regiões Tropical e Neotropical e poucos são aqueles que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 2006).

A ampla distribuição dos Siluriformes, associada à grande variedade de formas e hábitos apresentados por estes animais, os torna um interessante grupo de pesquisa para estudos ecológicos, evolutivos e filogeográficos (Lundberg e Freil, 2003). Entretanto, os estudos com Siluriformes apontam ainda inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos. A própria classificação das famílias de Siluriformes ainda não é

consensual. Assim, por exemplo, o número de famílias citadas para a ordem é de 36 segundo Ferraris (2007), 34 segundo Nelson (2006) e 33 segundo Eschmeyer (1998).

Na filogenia proposta por Sullivan *et al.* (2006), baseadas em dados moleculares de dois genes nucleares (*Rag1* e *Rag2*), a ordem Siluriformes encontra-se dividida em três superfamílias. Nessa filogenia, a superfamília Loricarioidea aparece numa posição basal, sendo grupo-irmão de todos os outros Siluriformes, os quais aparecem divididos em Diplomystidae e Siluroidea.

A superfamília Loricarioidea apresenta cerca de 1200 espécies (Ferraris, 2007) e é exclusiva da região neotropical. Ela diferencia-se dos demais Siluriformes basicamente por apresentar odontódios (dentes tegumentares que recobrem o corpo), dentes mandibulares com duas cúspides e ossos do aparelho de Weber encapsulados (Peyer, 1922; Pinna, 1998; Britto, 2002). Esse grupo é formado por seis famílias, sendo elas Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae. Um dos estudos mais recentes das relações filogenéticas desse grupo, feito por Britto em 2002 com base em dados morfológicos, mostra as seguintes relações para o grupo: (Nemathogenyidae + Trichomycteridae (Callichthyidae (Scoloplacidae (Astroblepidae (Loricariidae)))))). De acordo com essa topologia, Loricariidae configura-se como o grupo mais derivado dentro da superfamília.

Loricariidae é a maior família em número de espécies entre todos os Siluriformes e uma das maiores dentre todas as famílias de peixes do mundo (Nelson, 2006). Em 2007, Ferraris contabilizou 716 espécies distribuídas em 96 gêneros na família, número certamente já ultrapassado, pois, em 2008, só o gênero *Rineloricaria* teve 16 novas espécies descritas. Essa família apresenta uma irradiação adaptativa bem sucedida, tendo representantes na Costa Rica, Panamá e em toda a América do Sul, com espécies nos lados cis- e trans- Andinos (Rapp Py-Daniel, 1997). Os representantes

dessa família são conhecidos como cascudos, devido à carapaça de placas ósseas que possuem na região da cabeça e dorsal. Apresentam uma importância econômica considerável, sendo um apreciado item alimentar e um belo ornamento para a aquariorfilia.

Os peixes desta família são caracterizados pelo corpo deprimido coberto por placas ósseas e boca ventral em forma de ventosa, sendo, por isso, considerados animais de fundo, hábeis para aderir ao substrato em rios de forte correnteza, raspando o alimento no fundo dos rios. Apresentam ainda um par de barbilhões maxilares, lábios ventrais papilosos e intestino alongado (Nelson, 2006; Covain e Fish-Muller, 2007; Fichberg, 2008). Por ocupar habitats variados, os loricariídeos demonstram um alto valor adaptativo, incluindo a capacidade de se manterem fora da água por um longo período de tempo devido à presença de paredes vascularizadas no estômago (Reis *et al.*, 2003).

Quanto à sua biologia reprodutiva, os Loricariidae apresentam uma baixa fecundidade, com desovas com poucos ovos, os quais são adesivos e grandes (Fávaro, 1999; Nakatani, 2001). Em algumas espécies há um marcante cuidado parental, como ocorre em *Loricaria typus*, no qual os machos incubam os ovos em uma “bolsa de incubação” formada pelo desenvolvimento exacerbado do lábio inferior durante a época reprodutiva (Menezes, 1949). O dimorfismo sexual é uma característica notável em muitas espécies e foi causa de muitas interpretações taxonômicas incorretas no passado, contribuindo para a discrepância na sistemática do grupo (Rapp Py-Daniel, 1991; Isbrücker e Nijssen, 1992). No gênero *Ancistrus*, os machos possuem um conjunto de tentáculos alongados no focinho que, possivelmente, mimetizam o movimento de larvas, atraindo a fêmea madura (Sabaj *et al.*, 1999).

Apesar de seu monofiletismo estar bem estabelecido, muitos conflitos taxonômicos encontrados nessa família atingem as subfamílias que a compõem. Os trabalhos morfológicos vêm mostrando, nos últimos 30 anos, uma falta de consenso entre os taxonomistas especializados em loricariídeos. Isbrücker (1980) e Ferraris (2003) dividiram Loricariidae em seis subfamílias: Ancistrinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae. Em 2004, Armbruster reconheceu cinco subfamílias ao considerar Ancistrinae como uma tribo dentro de Hypostominae. Em 2006, Reis *et al.* voltaram a dividir Loricariidae em seis subfamílias, ao manter a classificação de Armbruster (2004) e descrever a nova subfamília Delturinae. Ainda nesse trabalho, Reis *et al.* propõem a hipótese de relacionamento filogenético representada na topologia de árvore a seguir: (Lithogeneinae (Delturinae (Neoplecostominae + Hypoptopomatinae (Loricariinae (Hypostominae)))). Nessa topologia, a subfamília Loricariinae aparece como um dos clados mais distais de Loricariidae, mostrando-se mais relacionada com a subfamília Hypostominae.

1.3 A subfamília Loricariinae

Os loricariíneos, Siluriformes altamente derivados, conhecidos popularmente como cascudos-chinelo, representam a segunda maior subfamília de Loricariidae, com cerca de 210 espécies, distribuídas em 30 ou 32 gêneros, dependendo da classificação de cada autor. Quanto à sua distribuição biogeográfica, essa subfamília tem representantes na Costa Rica, no Panamá e em toda a América do Sul, com espécies ocorrendo em ambos os lados dos Andes. Treze gêneros de Loricariinae são monotípicos, como é caso de *Aposturisoma*, *Dentectus*, *Limatulichthys* e *Planiloricaria*. Os gêneros com maior número de espécies incluem *Farlowella* (25 espécies), *Harttia* (21 espécies), *Loricaria* (15 espécies), *Loricariichthys* (17 espécies) e *Rineloricaria* (64 espécies). Destes gêneros, somente *Farlowella* e *Loricaria* passaram por revisões

taxonômicas (Rapp Py-Daniel e Oliveira, 2001; Ferraris, 2003; Covain e Fisch-Muller, 2007; Ferraris, 2007).

A subfamília Loricariinae difere dos outros loricariídeos por apresentar o pedúnculo caudal deprimido, ausência de nadadeira adiposa e o dimorfismo sexual expresso por odontódios hipertrofiados nas nadadeiras peitorais, na margem do focinho e área pré-dorsal, em machos maduros (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008). A grande maioria dos representantes desse grupo é de tamanho pequeno a médio (Ferraris, 2003). Não são grandes migradores, possuem hábitos sedentários e habitam pequenos riachos com pouca profundidade, forte correnteza, geralmente com pedregulhos ou arenosos (Covain *et al.*, 2008). Esses peixes não despertam muito interesse econômico, sendo algumas espécies de médio porte utilizadas como item alimentar somente por populações ribeirinhas e um pequeno número de espécies servindo de ornamento para a aquarofilia (Ferraris, 2003).

A classificação moderna de Loricariinae, baseada em dados morfológicos e com inferência cladística, iniciou com Isbrücker em 1979. Este autor propôs que a subfamília estaria dividida em quatro tribos: Acestridiini, Harttiini, Farlowellini e Loricariini. Em 1987, Schaefer estabeleceu o monofiletismo de Loricariinae e considerou a tribo Acestridiini como pertencente à outra subfamília de Loricariidae, a subfamília Hypoptopomatinae. Rapp Py-Daniel, em 1997, confirmou o monofiletismo da subfamília e da tribo Loricariini, e redefiniu Harttiini considerando Farlowellini como uma subtribo dentro de Harttiini. Mais recentemente, Covain e Fisch-Muller (2007), baseados em análises de morfologia externa, confirmaram parcialmente a separação da subfamília em duas tribos (Harttiini e Loricariini) e propuseram quatro grupos morfológicos dentro de Loricariini: grupo *Pseudohemiodon*, grupo *Loricaria*, grupo *Rineloricaria* e grupo *Loricariichthys*.

1.3.1 Conflitos taxonômicos

A subfamília Loricariinae desperta discussões taxonômicas conflituosas em relação a muitos de seus gêneros. Os gêneros que apresentam maiores discordâncias na literatura são aqueles que apresentam o maior número de espécies, gerando redundância nas características diagnósticas utilizadas na descrição das espécies ou um alto grau de similaridade entre elas (espécies crípticas) devido à falta dessas características diagnósticas. Conflitos taxonômicos envolvendo a classificação entre os gêneros levam à discussão a descrição de novos grupos como sendo ou não sinonímia de outros já existentes. Desse modo, torna-se difícil a tarefa de contabilizar o número exato de gêneros que compõem a subfamília. Entre os gêneros que passam por conflitos taxonômicos estão *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria*.

1.3.1.1 Gênero *Harttia*

Com 22 espécies distribuídas nas drenagens da Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e nas drenagens do Norte e do Sudeste do Brasil (Rapp Py-Daniel e Oliveira, 2001; Ferraris, 2007), o gênero *Harttia* inclui loricariíneos típicos de ambientes de corredeiras, que se diferenciam à primeira vista dos demais loricariíneos basicamente por apresentarem um focinho romboidal, além dos olhos diametralmente grandes (cerca de 20% do comprimento da cabeça) (Oyakawa *et al.*, 2006; Covain e Fisch-Muller, 2007). Muitas espécies de *Harttia* são endêmicas da região em que ocorrem, como por exemplo, a espécie tipo do gênero, *H. loricariformis*, endêmica da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Com um comprimento corporal entre 5 e 18 cm, os representantes desse gênero são morfologicamente similares e poucas proporções corporais podem ser usadas como diagnose. Uma das poucas características de morfologia externa usadas na diferenciação das espécies é baseada nas placas ósseas que recobrem o corpo, bem como os caracteres a elas associados (Langeani *et al.*, 2001; Ferraris, 2003).

O gênero *Harttia* está incluído na tribo Harttiini e alguns problemas taxonômicos apontam que este gênero necessita de uma revisão. A sinonímia de *Cteniloricaria* com *Harttia*, por exemplo, é questionada, pois algumas características exclusivas de *Harttia fowleri* foram deixadas de fora na descrição da espécie tipo de *Cteniloricaria* (Covain e Fisch-Muller, 2007). Ainda segundo estes autores, o gênero *Quiritixys*, posicionado também em sinonímia com *Harttia*, é possivelmente válido. Para eles, apesar da descrição de *Quiritixys* ser baseada num dimorfismo sexual incomum encontrado somente em machos maduros de *Harttia leiopleura*, a adição de outras características, tais como a ausência do subpré-opérculo, suporta a validade do gênero. Os autores ainda ressaltam que *Harttia novalimensis* pode pertencer a *Quiritixys*, pois esta espécie também perdeu o subpré-opérculo, embora nenhum dimorfismo sexual tenha sido encontrado.

1.3.1.2 Gênero *Loricaria*

O gênero *Loricaria* Linnaeus, 1758, foi o primeiro táxon a ser descrito na família Loricariidae, com a descrição da espécie *Loricaria cataphracta* (Isbrücker, 1981). Consequentemente, este grupo tornou-se o gênero nominal da família Loricariidae e da subfamília Loricariinae. Embora mais da metade das espécies da subfamília Loricariinae tenha sido considerada como pertencente ao gênero *Loricaria* no passado, muitas espécies foram transferidas para outros gêneros após uma revisão feita por Isbrücker (1981) no gênero. Atualmente, *Loricaria* é composto por 15 espécies distribuídas nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco, Paraguai, Paraná, e pequenos rios costeiros que drenam os escudos brasileiros e da Guiana (Thomas e Rapp Py-Daniel, 2008; Thomas e Pérez, 2010).

Em relação à sua morfologia externa, o gênero *Loricaria* é caracterizado pela presença de filamentos longos e delgados nos lábios e um baixo número de dentes

bicúspides pré-maxilares (Thomas e Pérez, 2010). As espécies desse gênero vivem em substrato arenoso ou turvo de pequenas corredeiras ou rios de maior vazão e apresentam em média 25 cm de comprimento corporal (Ferraris, 2003; Covain e Fisch-Muller, 2007).

Esse gênero pertence à tribo Loricariini e suas relações filogenéticas com outros membros dessa tribo permanecem incertas, pois apresenta poucos caracteres externos derivados compartilhados com outros grupos, tornando difícil a comparação com os demais gêneros (Covain e Fisch-Muller, 2007). Em 2001, Isbrücker *et al.* descrevem o novo gênero *Proloricaria* dentro da subfamília Loricariinae, e esse gênero é considerado como válido na catalogação realizada por Ferraris (2007). Entretanto, Covain e Fisch-Muller (2007) não reconhecem o gênero, alegando falta de características diagnósticas claras e considerando o grupo como sinonímia júnior de *Loricaria*.

1.3.1.3 Gênero *Loricariichthys*

Com 17 espécies descritas (Ferraris, 2003) distribuídas nas bacias dos rios Amazonas, Paraná e pequenos rios costeiros que drenam os escudos brasileiros e da Guiana, o gênero *Loricariichthys* tem como espécie tipo *L. maculatus*. Estes peixes diferenciam-se dos demais loricariíneos principalmente por apresentarem o lábio inferior bilobado com um sulco mediano, com a superfície dos lábios mais ou menos lisa ou levemente papilosa (Covain e Fisch-Muller, 2007). Eles vivem em ambientes similares aos ambientes habitados por *Loricaria* e apresentam uma variação no comprimento corporal de 11 a 46 cm.

Mesmo reconhecendo que *Loricariichthys* é um gênero bem diagnosticado que faz parte da tribo Loricariini, Covain e Fisch-Muller (2007) apontam dificuldades na identificação das espécies devido ao seu alto grau de similaridade. Segundo estes

autores, a falta do holótipo e da localidade tipo tem levado várias espécies do gênero a uma incerteza taxonômica, indicando que este gênero também necessita de uma revisão. Ainda conforme Covain e Fisch-Muller (2007), *Loricariichthys* tem sido visto como um intermediário entre *Limatulichthys* e *Pseudoloricaria* de um lado, e *Furcodontichthys* e *Hemiodontichthys* do outro.

1.3.1.4 Gênero *Rineloricaria*

O gênero *Rineloricaria* é constituído por 64 espécies distribuídas desde a Costa Rica até o Norte da Argentina, em ambos os lados dos Andes, e pelo menos metade desse número ainda está por ser descrita (I. Fichberg, com. pessoal), o que deve aumentar consideravelmente o tamanho do gênero. O monofiletismo de *Rineloricaria* é sustentado por 12 sinapomorfias (Fichberg, 2008), e seu caráter mais marcante é a presença de um sulco na parte posterior dos olhos, seguido de outras características como o focinho geralmente pontiagudo, o pedúnculo caudal bastante alongado e o espinho superior da nadadeira caudal dos machos continuando-se num longo filamento. Os representantes deste gênero têm em média 15 cm de comprimento corporal e são encontrados em ambientes de corredeiras, fixados nas rochas e troncos, ou em remansos com fundo arenoso, ficando enterrados sob a areia (Oyakawa *et al.*, 2006).

Integrante da tribo Loricariini, *Rineloricaria* é o maior gênero da subfamília Loricariinae e por consequência, é o gênero que apresenta as maiores confusões taxonômicas dentro da subfamília. Com a perda do holótipo da espécie tipo (*R. lima*) e a falta de informações concretas sobre a localidade tipo (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008), faz-se necessária a descrição de um neótipo e uma revisão taxonômica para o gênero. Segundo Covain e Fisch-Muller (2007), embora as descrições dadas por Kner (1853) para o gênero sejam bem detalhadas, muitas características são válidas para todos os gêneros da subfamília. Essas falhas na descrição do grupo dão margem a

discussões quanto às espécies que compõem o gênero. Rodriguez e Reis (2008), por exemplo, dividem *Rineloricaria* ao reconhecer a revalidação do gênero *Hemiloricaria*, feita por Isbrücker *et al.* (2001). Estes autores consideram que gênero *Hemiloricaria* corresponderia ao grupo de espécies de *Rineloricaria* distribuídas por toda a América do Sul, exceto a bacia do Alto Paraná e as drenagens costeiras do Atlântico. Quanto às espécies pertencentes ao gênero *Rineloricaria*, estas sim estariam restritas à bacia do Alto Paraná e às drenagens costeiras do Atlântico. Entretanto, além de algumas características diagnósticas de *Hemiloricaria* estarem presentes em espécies de *Rineloricaria*, reconhecidas pelos próprios autores como sendo *Rineloricaria*, Fichberg (2008), em um estudo filogenético incluindo 181 caracteres morfológicos e 36 espécies de *Rineloricaria* (dentre as quais aquelas consideradas pelos outros autores como sendo *Hemiloricaria*), recupera o gênero *Rineloricaria* como um grupo monofilético.

Conflitos taxonômicos, tais como a redundância na descrição de novos grupos, levando a casos de sinonímias ou à ocorrência de complexos de espécie e/ou espécies morfológicamente crípticas, demonstram a necessidade de revisões taxonômicas nos grupos em que ocorrem. As revisões taxonômicas são de extrema importância para a ciência, já que o conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida, e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las, é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995).

Os problemas taxonômicos que atingem alguns gêneros da subfamília Loricariinae indicam que os dados morfológicos nem sempre são eficazes ou suficientes na resolução desses problemas. Ao contrário disso, muitos dados têm gerado mais confusões, ao invés de tentar elucidar a sistemática filogenética desses gêneros. A

associação de dados morfológicos a marcadores citogenéticos e moleculares pode ser útil na separação de espécies consideradas *a priori* a mesma unidade taxonômica, colaborando na resolução de conflitos taxonômicos envolvendo os gêneros de Loricariinae. Além disso, a citogenética e a biologia molecular têm mostrado nos últimos anos serem excelentes ferramentas na resolução de questões referentes às relações evolutivas dos grupos de organismos.

1.3.2 Estudos citogenéticos

A hereditariedade é uma força conservadora que confere estabilidade a sistemas biológicos (Dobzhansky, 1970). Essa estabilidade pode ser eventualmente afetada por mutações, que não se restringem basicamente a uma mudança na sequência de bases de um gene, mas incluem também modificações cromossômicas (Futuyma, 1998), podendo gerar variações cariotípicas. A variabilidade cromossômica, por sua vez, funciona como um eficiente substrato para novidades evolutivas, podendo resultar em evolução adaptativa, no caso de haver diferenças de adaptabilidade, ou levar à diferenciação populacional, caso essas diferenças atuem como uma barreira ao fluxo gênico.

Os primeiros trabalhos citológicos não abordavam o número e a forma dos cromossomos das espécies com uma inferência evolutiva, estando mais interessados nos genes que eles continham (White, 1954). Hoje se sabe que o interesse dos estudos cromossômicos está nas relações evolutivas, filogenéticas e taxonômicas dos grupos de organismos, já que o polimorfismo cromossômico ocorre em quase todas as populações naturais, sendo adaptativo ao permitir à população responder geneticamente às mudanças ambientais de modo mais eficiente, em comparação a um monomorfismo cromossômico (White, 1973; John e Lewis, 1979; Pazza, 2005).

Das cerca de 4500 espécies de peixes neotropicais, somente 15% tiveram alguma caracterização citogenética e, dessas espécies, 318 são Siluriformes. Entre os

loricariídeos, 124 espécies tiveram seus cariótipos estudados, representando 17% do total de espécies dessa família (Reis *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2007). Apesar de Loricariinae possuir cerca de 210 espécies, apenas 20 passaram por alguma caracterização citogenética, representando seis gêneros da subfamília: *Brochiloricaria*, *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* e *Sturisoma*.

O primeiro trabalho a relatar o número diplóide de um loricariíneo é o de Post em 1965, seguido por Michelle *et al.* em 1977. Em 1980, Della-Rosa faz a primeira e única descrição cariotípica de um loricariíneo pertencente à região Amazônica, e somente 13 anos depois os estudos citogenéticos com loricariíneos foram retomados. Entretanto, é a partir de 1998 que a produção científica voltada para a citogenética de loricariíneos se intensifica, provavelmente motivada pelo trabalho de Giuliano-Caetano (1998), que propõe como causa das variações cromossômicas numéricas encontradas no gênero *Rineloricaria*, os rearranjos Robertsonianos.

Os dados citogenéticos disponíveis na literatura indicam que a subfamília Loricariinae é heterogênea e diversificada (Artoni e Bertollo, 2001), com o número diplóide variando de $2n=36$ cromossomos em *Rineloricaria latirostris*, a $2n=74$ cromossomos em *Sturissoma cf. nigrirostrum* (Giuliano-Caetano, 1998; Artoni e Bertollo, 2001). Para se ter uma ideia da magnitude dessa variação, Gymnotiformes, uma ordem de peixes que é grupo-irmão da ordem Siluriformes, tem uma variação do número diplóide de $2n=24$ a $2n=54$ cromossomos (Almeida-Toledo *et al.*, 2007), ou seja, a variabilidade cariotípica nessa subfamília supera variações encontradas em clados de peixes com hierarquias taxonômicas mais elevadas.

Dos gêneros pertencentes à Loricariinae que tiveram mais de uma espécie estudada citogeneticamente, somente *Loricariichthys* parece manter um número diplóide constante, com $2n=54$ cromossomos, apresentando uma variação na

macroestrutura cromossômica entre as espécies do gênero (Tabela 1). Nos demais gêneros com várias espécies cariotipadas, há uma variação numérica interessante, e destes, *Rineloricaria* se destaca por apresentar o menor número diplóide com $2n=36$ cromossomos, em *R. latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998), e o maior número diplóide com $2n=70$ cromossomos, em *Rineloricaria* sp. n. e *R. strigilata* (Alves *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2010). A figura 1.1 apresenta a distribuição geográfica dos números diplóides disponíveis na literatura para o gênero *Rineloricaria* e é importante destacar que as espécies da região costeira apresentam um número diplóide maior que 60 cromossomos, enquanto que as espécies das drenagens que correm para o interior do continente apresentam um número diplóide abaixo de 60 cromossomos.

Polimorfismos numéricos e estruturais são frequentes na subfamília Loricariinae. Giuliano-Caetano (1998), em sua tese de doutoramento, evidenciou polimorfismos cromossômicos numéricos com até 14 citótipos diferentes na espécie *Rineloricaria latirostris*, sugerindo uma marcante participação de eventos de fusão e fissão cromossômica na evolução deste gênero. Errero-Porto (2007) encontrou em *Rineloricaria pentamaculata* o número diplóide igual a 56 cromossomos em todos os indivíduos, mas duas fórmulas cariotípicas foram evidenciadas ($8\ m/sm + 48\ st/a$ e $9\ m/sm + 47\ st/a$) e a autora associou essa variação estrutural à presença de um cromossomo supranumerário. Maia (2008) encontrou para *Loricariichthys anus* um polimorfismo estrutural de tamanho, com um cromossomo acrocêntrico maior e outro de tamanho menor, propondo que uma deleção teria originado o polimorfismo. Outros polimorfismos estruturais e numéricos relacionados a cromossomos supranumerários, tamanho de RONS e cromossomos sexuais também podem ser identificados em Loricariinae.

Tabela 3: Estudos citogenéticos na subfamília Loricariinae

Espécie	Localidade	2n	Constituição Cariotípica	NF	Referência
<i>Brochiloricaria macrodon</i>	Rio Paraná, PR	58	18m, 2sm, 38a	78	Michelle <i>et al.</i> , 1977
<i>Harttia carvalhoi</i>	Rio Paraíba do Sul, SP	♀52	18m, 18sm, 8st, 8a	96	Centofante <i>et al.</i> , 2006
		♂53	17m, 18sm, 8st, 10a	96	
<i>Harttia kronei</i>	Rio Betari, SP	58	40m/sm, 18st	116	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Harttia loricariformis</i>	Rio Grande, SP	52	32m/sm, 20st/a	84	Alves <i>et al.</i> , 2003
	Rio Paraíba do Sul, SP	56	16m, 22sm, 10st, 8a	104	Kavalco <i>et al.</i> , 2004a
<i>Loricaria cataphracta</i>	Rio Paraná, PR	64	?	?	Roncati <i>et al.</i> , 1999
<i>Loricaria proluxa</i>	Rio Paraná, PR	62	20m, 4sm, 38a	86	Scavone e Ferreira Julio, 1994
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Paraná, PR	64	10m, 6sm, 4st, 44a	84	Scavone e Ferreira Julio, 1994
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Solimões, AM	62	?	?	Della-Rosa <i>et al.</i> , 1980
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Guaíba, RS	66	2m, 2sm, 62a	70	Alves, 2000
<i>Loricariichthys anus</i>	Rio Guaíba, RS	54	8m, 16sm, 4st, 26a	82	Maia, 2008
<i>Loricariichthys maculatus</i>	Rio Paraná, Argentina	56	?	?	Roncati <i>et al.</i> , 1999
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Rio Paraná, PR	♀54	7m, 20sm, 4st, 23a	85	Scavone e Julio Jr., 1995
		♂54	6m, 20sm, 4st, 24a	84	
	Rio Paraná, Argentina	54	?	?	Roncati <i>et al.</i> , 1999
	Rio Paranapanema, SP	54	6m, 18sm, 4st, 26a	82	Maia, 2008
<i>Loricariichthys</i> sp.	Rio Paraná, Argentina	54	6m, 26sm, 4st, 18a	90	Fenocchio, 1993
<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Guaíba, RS	62	2sm, 2st, 58a	66	Maia <i>et al.</i> , 2010
		66	2m, 64st/a	68	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Rineloricaria kronei</i>	Rio Itapocu, SC	64	6m/sm, 58st/a	70	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Mogi-Guaçu	36-40	-	-	Giuliano-Caetano, 1998
	Rio Passa Cinco, SP	44-47	-	-	
	Ribeirão Três Bocas, PR	43-48	-	-	
	Ribeirão Maringá, PR	46	14m/sm, 32st/a	60	Errero-Porto, 2007
	Rio São Francisco, MG	48	14m/sm, 34st/a	62	Mendes-Neto, 2008
<i>Rineloricaria parva</i>	Rio Paraná, PR	48	?	?	Post, 1965
		48	?	?	Scavone e Julio Jr., 1994
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Rio Paranapanema, SP	56	2m, 6sm, 48a	64	Maia <i>et al.</i> , 2010
	Rio Keller	56	8m/sm, 48st/a	64	Giuliano-Caetano <i>et al.</i> , 1999
	Córregos Tatupeba e Tauá, PR	56	8m/sm, 48st/a	64	Errero-Porto, 2007
<i>Rineloricaria</i> sp. n.	Rio Betari, SP	70	2sm, 68a	72	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Rineloricaria strigilata</i>	Rio Guaíba, RS	70	4sm, 2st, 64a	76	Maia <i>et al.</i> , 2010
<i>Sturisoma</i> cf. <i>nigrirostrum</i>	Rio Araguaia, MT	74	20m, 18sm, 18st/a	94	Artoni e Bertollo, 2001

2n = número diplóide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, ? = dados não informados no trabalho

Figura 1.1: Mapa evidenciando a distribuição geográfica dos números diplóides já descritos para o gênero *Rineloricaria*.

A presença de cromossomos supranumerários é observada em quatro espécies da família Loricariidae e destas, três são loricariíneos: *Loricaria prolixa*, *Loricaria* sp e *Rineloricaria pentamaculata*. Nas duas espécies de *Loricaria*, estes cromossomos são microcromossomos e estão presentes em 100% dos indivíduos analisados, com uma variação intra e interindividual de 0-5 cromossomos (Scavone e Ferreira Julio, 1994). Já em *Rineloricaria pentamaculata*, os cromossomos supranumerários são acrocêntricos pequenos, totalmente heterocromáticos e estão presentes em 50% dos indivíduos analisados, com uma variação intra e interindividual de 0-3 cromossomos (Errero-Porto, 2007).

Quanto às regiões organizadoras de nucléolo, somente doze espécies de Loricariinae tiveram suas RONS evidenciadas, sendo que na maioria dessas espécies estas regiões foram localizadas em posição terminal (Tabela 2). Um único caso de

RONs múltiplas foi relatado em uma população de *Rineloricaria pentamaculata* (Errero-Porto, 2007), e em metade das espécies, as RONs apresentaram um heteromorfismo de tamanho. Cromossomos do tipo submetacêntrico e acrocêntrico foram os que mais frequentemente apareceram portando essa região (85% das espécies estudadas tiveram as RONs localizadas em cromossomos desses tipos). Apesar de poucos estudos terem identificado regiões heterocromáticas, de maneira geral, os cariótipos de Loricariinae apresentam pouca heterocromatina, distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos e associada às RONs.

A aplicação de fluorocromos base-específicos tem sido pouco explorada em Loricariinae e, de modo geral, a coloração GC-específica utilizando o fluorocromo CMA₃ indica marcações fluorescentes coincidentes com as RONs, enquanto a coloração AT-específica, com a utilização do fluorocromo DAPI, apresenta marcações fluorescentes em todo o complemento cromossômico, com exceção das RONs (Scavone e Júlio Jr., 1995; Kavalco *et al.*, 2004b; Kavalco, 2005; Errero-Porto, 2007; Maia, 2008; Mendes-Neto, 2008; Maia *et al.*, 2010).

Dois casos de sistemas de cromossomos sexuais diferenciados foram relatados na subfamília Loricariinae. O primeiro deles ocorre em *Loricariichthys platymetopon*, caracterizando-se como um sistema cromossômico sexual simples do tipo ZZ/ZW, sendo o cromossomo Z o maior acrocêntrico de ambos os complementos cromossômicos e o W representado pelo maior metacêntrico do cariótipo das fêmeas (Scavone e Júlio Jr., 1995). O segundo caso relativo a esses sistemas, descrito em *Harttia carvalhoi*, caracterizou-se como um sistema sexual múltiplo do tipo XX, XY₁Y₂, com o cromossomo X correspondendo ao maior metacêntrico do complemento cromossômico de ambos os sexos e o Y₁ e Y₂ correspondendo a dois acrocêntricos adicionais no cariótipo dos machos (Centofante *et al.*, 2006).

Tabela 4: Localização de RONS em espécies de Loricariinae

Espécie	RONS (Localização)	Heteromorfismo de Tamanho	Referência
<i>Brochiloricaria macrodon</i>	?	?	Michelle <i>et al.</i> , 1977
<i>Harttia carvalhoi</i>	Intersticial (Par 23/a/Braço Longo)	Presente	Centofante <i>et al.</i> , 2006
<i>Harttia kronei</i>	Terminal (Par 11/m+sm/Braço Curto)	Ausente	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Harttia loricariformis</i>	Intersticial (Par 17/a/Braço Longo)	Ausente	Alves <i>et al.</i> , 2003
	Terminal (Par 25/a/Braço Longo)	Ausente	Kavalco <i>et al.</i> , 2005
<i>Loricaria cataphracta</i>	?	?	Roncati <i>et al.</i> , 1999
<i>Loricaria proluxa</i>	?	?	Scavone e Ferreira Julio, 1994
<i>Loricaria</i> sp.	?	?	Scavone e Ferreira Julio, 1994
<i>Loricaria</i> sp.	?	?	Della-Rosa <i>et al.</i> , 1980
<i>Loricaria</i> sp.	?	?	Alves, 2000
<i>Loricariichthys anus</i>	Intersticial (Par 21/a/Braço Longo)	Presente	Maia, 2008
<i>Loricariichthys maculatus</i>	?	?	Roncati <i>et al.</i> , 1999
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Terminal (Par 14/st/Braço Curto)	Ausente	Scavone e Júlio Jr., 1995
	?	?	Roncati <i>et al.</i> , 1999
	Terminal (Par 16/a/Braço Curto)	Ausente	Maia, 2008
<i>Loricariichthys</i> sp.	?	?	Fenocchio, 1993
<i>Rineloricaria cadeae</i>	Terminal (Par 09/st+a/Braço Curto)	Ausente	Maia <i>et al.</i> , 2010
	Terminal (Par 02/st/Braço Curto)	Ausente	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Rineloricaria kronei</i>	Terminal (Par 05/st/Braço Curto)	Presente	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Intersticial (Par 03/m+sm/Braço Curto)	Presente	Giuliano-Caetano, 1998
	Intersticial (Par 02/m+sm/Braço Curto)	Ausente	Errero-Porto, 2007
	Terminal (Par 10/st+a/Braço Curto)	Ausente	Mendes-Neto, 2008
<i>Rineloricaria parva</i>	?	?	Post, 1965
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Terminal (Par 05/st+a/Braço Curto)	Presente	Maia <i>et al.</i> , 2010
	Terminal (Par 05/st+a/Braço Curto)	Presente	Giuliano-Caetano <i>et al.</i> , 1999
	Terminal (Par 05/st+a/Braço Curto) Terminal (2 cromossomos st+a/Braço Curto)	Presente Ausente	Errero-Porto, 2007
<i>Rineloricaria</i> sp. n.	Terminal (Par 01/sm/Braço Curto)	Ausente	Alves <i>et al.</i> , 2003
<i>Rineloricaria strigilata</i>	Terminal (Par 09/st+a/Braço Curto)	Presente	Maia <i>et al.</i> , 2010
<i>Sturisoma</i> cf. <i>nigrirostrum</i>	Terminal (Par 24/st+a/Braço Curto)	?	Artoni e Bertollo, 2001

RONS = regiões organizadoras de nucléolo, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, ? = dados não informados no trabalho

O uso da hibridação *in situ* fluorescente em loricariíneos está, até o momento, restrito à aplicação de sondas de DNAr 18S e 5S. Embora incipiente, esta técnica tem mostrado resultados interessantes nos estudos citogenéticos da subfamília. Kavalco *et al.* (2004a e 2005) realizaram a primeira localização de genes por meio dessa técnica em uma espécie de Loricariinae, determinando a localização exata dos genes ribossomais

DNAr 5S e 18S no cariótipo de *Harttia loricariformes*. Nestes trabalhos, os autores encontraram os dois genes em sintenia no par 25 do cariótipo dessa espécie, e, posteriormente, Centofante *et al.* (2006), utilizando a mesma técnica, encontraram os mesmos genes também em sintenia no 23º par do complemento cromossômico de *Harttia carvalhoi*. A localização do gene DNAr 18S também foi identificada nas espécies *Rineloricaria latirostris* e *Rineloricaria pentamaculata* (Errero-Porto, 2007; Mendes-Neto, 2008) e evidenciou sítios correspondentes às marcações com Nitrato de Prata. Mendes-Neto (2008) localizou ainda o gene ribossomal DNAr 5S no cariótipo de *Rineloricaria latirostris* e encontrou marcações nas regiões pericentroméricas de dois pares de acrocêntricos, um de tamanho médio e outro pequeno. Entretanto, esses dois genes não estão em sintenia nessa espécie. Essa é a única espécie de *Rineloricaria* que teve a localização do gene ribossomal DNAr 5S determinada.

A grande variabilidade cromossômica encontrada em Loricariinae faz deste grupo um excelente modelo para estudos de evolução cromossômica, e esses estudos, por sua vez, podem levar ao entendimento do sucesso da irradiação adaptativa nessa subfamília. Esta variabilidade pode estar relacionada com o padrão de distribuição geográfica da subfamília, uma vez que o isolamento das bacias hidrográficas, com a consequente formação de populações alopátricas, favorece o processo de especiação (Futuyma e Mayer, 1980).

1.4 Marcadores moleculares e sua aplicabilidade em peixes

Os marcadores moleculares são definidos como macromoléculas biológicas, como as proteínas e ácidos nucléicos, contendo informações hereditárias que podem elucidar questões acerca do comportamento, parentesco e filogenia dos organismos. Entre as vantagens que o emprego dos marcadores moleculares oferece aos estudos biológicos, destacam-se: 1) os dados moleculares fornecem informações genéticas, 2) os

métodos moleculares acessam um número elevado de variabilidade genética, 3) os dados moleculares podem distinguir homologias de analogias, 4) os marcadores moleculares evidenciam um número muito maior de novidades evolutivas, quando comparados aos marcadores citogenéticos e Mendelianos (Avise, 2004).

Do mesmo modo que a Citogenética, os marcadores moleculares têm se mostrado eficientes em análises intra e interespecíficas de muitos grupos de organismos. Esses marcadores moleculares podem estar associados tanto ao genoma nuclear como ao genoma mitocondrial, e entre suas possíveis aplicações incluem-se estimativas do grau de variabilidade genética, análise de zonas de contato e de fluxo gênico, estudos de biogeografia histórica e caracterização de estrutura populacional, além do seu emprego crescente no campo da Sistemática e da Taxonomia, para a inferência de relações filogenéticas e em estudos de conservação genética.

Diversas técnicas de laboratório têm sido empregadas, ao longo dos anos, para revelar marcadores moleculares. Os anos 60 inauguraram os primeiros estudos com marcadores moleculares a partir do isolamento de proteínas imunológicas e eletroforéticas, e a interpretação das informações contidas em sua configuração (Avise, 2004). Os primeiros estudos baseados em sequências de DNA iniciaram-se no final da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição. Anos mais tarde, os marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) deram impulso ao desenvolvimento da genética de populações. Entretanto, foi com o surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), nos anos 80, que os estudos moleculares ganharam considerável expressão (Avise, 1994). O advento da técnica de PCR (Mullis e Faloona, 1987) permitiu que mais ferramentas pudessem ser desenvolvidas para a análise dos genomas. Entre os marcadores moleculares baseados em PCR podemos citar a técnica de PCR-RFLP e as análises de sequências gênicas.

Os RFLPs são fragmentos polimórficos gerados pela clivagem com enzimas de restrição, que cortam o DNA em sequências específicas, reconhecidas por essas enzimas. Variações no tamanho desses fragmentos, geradas por mutações (inserções, deleções, translocações ou inversões) nessas sequências específicas, fornecem um número elevado de marcadores numa análise populacional (Matioli, 2001). A associação da técnica RFLP (Grodzicker *et al.*, 1974) com a técnica de PCR, caracterizando uma terceira técnica, a PCR-RFLP, permitiu o acesso às regiões específicas do genoma nuclear e do genoma mitocondrial, em especial o genoma mitocondrial. Isso trouxe uma vantagem em relação à técnica de RFLP utilizando o genoma mitocondrial completo, devido ao baixo custo e à minimização da presença de artefatos nos resultados obtidos, já que a PCR-RFLP constitui uma técnica mais simples e rápida (Garcez, 2006).

As análises de sequenciamento permitem a visualização de sequências moleculares de alta resolução, quando comparada com outras técnicas moleculares tais como a PCR-RFLP, podendo auxiliar na elucidação dos processos que geram a variabilidade observada nas moléculas de DNA. Apesar de ainda apresentar um alto custo, o acesso às sequências de bases nitrogenadas fornece, em relação a outros marcadores moleculares, uma quantidade muito maior de informações quanto às variações encontradas em determinadas regiões de um genoma, permitindo uma comparação dessas variações intra e interpopulacional, intra e interespecífica, ou dentro e entre grupos superiores de organismos, dependendo da escolha do gene ou região a ser sequenciada e o quanto esse gene ou região gênica são variáveis (Awise, 2004).

Métodos estatísticos de análises, tais como os que calculam distâncias genéticas ou saturação nas sequências, puderam acompanhar o desenvolvimento das técnicas utilizadas na análise dos genomas, permitindo a manipulação de uma gama muito maior

de dados (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esses modelos estatísticos proporcionaram às análises dos dados um viés regido pelas principais teorias biológicas, como por exemplo, a estimativa de filogenias. Embora existam divergências sobre qual a melhor técnica a ser utilizada, alguns métodos para estimar filogenias tais como Máxima Verossimilhança, Máxima Parcimônia, Neighbor-Joining e Análise Bayesiana são constantemente aplicados e seus resultados comparados (Holder e Lewis, 2003).

1.4.1 O genoma mitocondrial

Entre os genes mais comumente utilizados em análises moleculares estão os genes que compõem o genoma mitocondrial (mtDNA). O mtDNA animal apresenta-se como uma molécula circular, fechada e pequena (14-26 kb) e com um conteúdo gênico conservado representado por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16S), 22 genes que codificam RNAs transportadores e 13 genes que codificam proteínas envolvidas na respiração celular, atuando no transporte de elétrons e na produção de ATP (Billington e Hebert, 1991).

Inúmeras vantagens fazem do genoma mitocondrial uma fonte interessante para estudos genéticos e evolutivos. Entre essas vantagens quatro se destacam: 1) herança predominantemente materna; 2) genoma compacto com estrutura e organização simples; 3) alta taxa de evolução e 4) ausência de recombinação (Lewin, 1994). Quanto aos artefatos das técnicas moleculares, o genoma mitocondrial tem outra vantagem marcante sobre o genoma nuclear: apresenta entre 500 a 1000 cópias de moléculas por célula, proporcionando facilidade na técnica de isolamento e extração dessa molécula.

O genoma mitocondrial tem se mostrado um excelente marcador utilizado no estudo da dinâmica das populações, em comparações interespecíficas e em reconstruções filogenéticas. Entre os estudos populacionais e interespecíficos, o gene Citocromo c Oxidase I (COI) apresenta-se como uma região gênica eficaz para o

cálculo de distâncias genéticas e tem sido apontado como o sistema de DNA *barcoding* a ser utilizado na identificação de espécies animais (Hebert *et al.*, 2003). Entre os genes utilizados no estudo das relações evolutivas dos organismos, o gene Citocromo b e os genes ATPase 6 e 8 têm se mostrado excelentes marcadores, já que recuperam relações filogenéticas entre espécies relacionadas até níveis filogenéticos superiores (Hrbek *et al.*, 2002; Obermiller e Pfeiler, 2003).

1.4.2 PCR-RFLP e sequenciamento genético em peixes: análises populacionais, filogenéticas e taxonômicas

A combinação das técnicas de PCR e RFLP é muito utilizada nas pesquisas de variabilidade genética de populações de peixes, bem como na identificação de espécies, na identificação de híbridos e em estudos filogenéticos (Wolf, 2000). Machado (2006), utilizando o gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 2, diferenciou, por meio da técnica de PCR-RFLP, duas espécies de peixes da região antártica (*Notothenia rossi* e *Notothenia coriiceps*). Triantafyllidis *et al.* (1999), explorando os genes Citocromo b, *D-loop*, ND5 e ND6, em sete populações de *Silurus glanis* e três populações de *Silurus aristotelis* (Siluridae), encontraram uma estruturação geográfica significativa, com a separação das espécies em clados diferentes, com várias populações apresentando haplótipos restritos, podendo ser úteis como marcadores moleculares para programas de conservação e identificação de estoques em programas de piscicultura.

O uso de sequências de DNA pode ser muito bem explorado para estudos populacionais, filogenéticos, filogeográficas e taxonômicos. Um trabalho completo e multidisciplinar a abranger todos esses estudos é o de Dergam *et al.* (2002). Estes autores, utilizando sequências do gene mitocondrial 16S, interpretaram as diferenças genéticas observadas em *Hoplias malabaricus* da bacia do rio Doce, sudeste do Brasil, como o resultado de processos evolutivos diversos, como pressão de seleção, deriva

genética, vicariância e efeito fundador, e constatarem uma complexa história filogeográfica envolvendo a bacia do rio Doce e outras bacias adjacentes. Os achados desse trabalho permitiram aos autores concluir que a bacia do rio Doce compartilha uma história comum com as vertentes das bacias dos rios Paraíba do Sul e Grande, corroborando a hipótese de separação dessas bacias pela formação da Serra da Mantiqueira, durante o período Plio-Pleistoceno.

As técnicas moleculares são ferramentas importantes nos casos em que a identificação de espécies com base em características morfológicas e citogenéticas sejam difíceis, bem como na separação de populações próximas geograficamente (Marques, 2002). O uso de sequências gênicas têm se popularizado no estudo taxonômico de peixes. Entre essas sequências, o gene COI é o mais explorado, justamente por ser adotado como o sistema de DNA *barcoding* a ser utilizado na identificação de espécies animais, devido, principalmente, à sua alta variação interespecífica, à baixa variação intraespecífica e a existência de *primers* universais que podem amplificar essa mesma região em grupos taxonômicos distintos (Hebert *et al.*, 2003; Ivanova *et al.*, 2007). Ward *et al.* (2005), diferenciaram 207 espécies de peixes australianos a partir dos valores de divergência das sequências do COI, corroborando os dados morfológicos já encontrados para essas espécies. Ardura *et al.* (2010), utilizaram sequências do gene COI para distinguir sete espécies de peixes amazônicos, popularmente conhecidos como acarás, numa tentativa de melhorar o manejo pesqueiro e a comercialização dessas espécies, já que muitas são comercializadas ilegalmente devido à generalização feita pelos próprios profissionais da pesca, chamando todas as espécies pelo nome de acará.

1.4.3 Estudos moleculares em Loricariinae

Os estudos moleculares na subfamília Loricariinae, embora escassos, têm apresentado discussões interessantes quanto à história evolutiva desse grupo. Existem apenas quatro trabalhos abordando este tipo de estudo na subfamília, voltados para análises filogenéticas, populacional e de taxonomia molecular.

Em 2000, Zawadzki e colaboradores utilizaram dados de alozimas para diferenciar três espécies de *Loricariichthys*, numa tentativa de amenizar os problemas encontrados na identificação das espécies do gênero devido ao seu alto grau de similaridade. Nesse trabalho, eles discriminaram, a partir do padrão de corrida de isozimas em gel de eletroforese, as espécies *L. anus*, *L. platymetopon* e *Loricariichthys* sp., demonstrando que as isozimas eletroforéticas podem ser uma excelente ferramenta utilizada na sistemática de peixes neotropicais.

Montoya-Burgos *et al.* (1998) propuseram a primeira filogenia molecular da família Loricariidae, com base na sequência de genes mitocondriais. Nessa filogenia, Loricariinae foi a única subfamília que teve seu monofiletismo recuperado. Os autores confirmaram a posição de Farlowellini dentro de Harttiini na subfamília, posição esta proposta por Py-Daniel, em 1997, com base em dados morfológicos. Esses autores forneceram ainda em seu trabalho a primeira evidência da separação da subfamília em duas linhagens, com um grupo formado pelo gênero *Harttia* e outro envolvendo os demais loricariíneos, sendo que esta proposta foi reforçada na filogenia apresentada por Covain e Fisch-Muller (2007), com base em dados de morfologia externa. A filogenia proposta por Montoya-Burgos *et al.* (1998) aponta ainda que os gêneros *Farlowella* e *Sturisoma* formam um grupo-irmão de Loricariini. Mais recentemente, Covain *et al.* (2008), numa associação de dados morfológicos e moleculares, utilizando genes mitocondriais, confirmaram mais uma vez a divisão de Loricariinae nas tribos Harttiini,

composta somente pelo gênero *Harttia*, e Loricariini, composta pelas subtribos Strurisomina e Loricariina (Figura 1.2). Dentro de Loricariina, esses autores confirmaram ainda a divisão proposta por Covain e Fisch-Muller (2007), reconhecendo os grupos *Pseudohemiodon*, *Loricaria* e *Loricariichthys*. Entretanto, os autores não consideraram nessa topologia o grupo *Rineloricaria*, proposto anteriormente como um componente de Loricariini, como um grupo natural.

Figura 1.2: Árvore de consenso, baseada em dados morfológicos e moleculares, representando a hipótese das relações filogenéticas de integrantes da subfamília Loricariinae proposta por Covain *et al.* (2008). Legenda: 1 = Tribo Harttiini, 2 = Tribo Loricariini, A = Subtribo Strurisomina, B = Subtribo Loricariina.

Em 2009, Limeira *et al.* realizaram comparações de morfologia externa e aloenzimáticas entre duas populações de *Rineloricaria pentamaculata* do Alto Rio Paraná, isoladas geograficamente. Como resultado, os autores encontraram diferenças morfológicas e na frequência alélica dos dados polimórficos e explicaram que os morfotipos gerados podem indicar que haja duas espécies em *statu nascendi*.

Esses quatro trabalhos demonstram que os dados moleculares, ainda que incipientes, têm se mostrado marcadores eficientes na resolução de diversos problemas biológicos, e sua aplicação em Loricariinae pode auxiliar na compreensão dos processos evolutivos que ocorrem nesse grupo de peixes.

1.5 Objetivos

A história geológica das bacias do Leste e do Alto Paraná e sua conformação atual, atuaram e continuam atuando na história evolutiva das espécies que compõem sua ictiofauna. Essas drenagens, caracterizadas pelo alto grau de endemismo, apresentam em sua ictiofauna uma predominância de representantes da Ordem Siluriformes, e dentre estes, os gêneros *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria* são os maiores representantes da subfamília Loricariinae nessas bacias. A subfamília Loricariinae, por sua vez, aponta diversos problemas taxonômicos e os caracteres morfológicos não têm sido suficientes para resolvê-los. Apesar de escassos, os estudos citogenéticos em Loricariinae têm mostrado que essa subfamília é heterogênea e diversificada. Estudos utilizando dados moleculares, ainda que incipientes, apontam os marcadores moleculares como ferramentas eficientes na resolução de diversos problemas biológicos dessa subfamília.

Com isso, fica claro que a subfamília Loricariinae é um excelente modelo para estudos de evolução cromossômica, e a aplicação de marcadores moleculares em representantes dessa subfamília pode auxiliar na compreensão dos processos evolutivos

correntes nesse grupo de peixes. Além disso, os estudos citogenéticos e moleculares em espécies de Loricariinae que ocorrem nas bacias do Leste e do Alto Paraná, podem ser úteis na resolução dos conflitos taxonômicos que atingem algumas dessas espécies e apontar de que forma a história dessas bacias atuou na história natural-evolutiva desses animais. Assim sendo, o presente trabalho propõe uma maior abordagem citogenética e molecular de espécies de Loricariinae pertencentes às bacias do Alto Paraná e do Leste, com a finalidade de propor soluções para os problemas taxonômicos, bem como melhor compreender a evolução biológica ocorrida nessa subfamília.

Como objetivos específicos, buscou-se:

1. Caracterizar citogeneticamente espécies dos gêneros *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria*, que ocorrem nas bacias do Leste e do Alto Paraná, e estabelecer comparações com os dados disponíveis na literatura;
2. Efetuar o mapeamento físico comparativo dos genes ribossomais DNAr 5S e 18S em espécies de Loricariinae;
3. Utilizar o DNA *Barcoding* no auxílio à identificação e descrição de espécies pertencentes ao gênero *Rineloricaria*;
4. Investigar as relações filogenéticas entre espécies de *Rineloricaria* pertencentes às bacias do Leste e do Alto Paraná, por meio das técnicas de sequenciamento e PCR-RFLP e utilizando sequências mitocondriais;
5. Relacionar os dados cromossômicos e moleculares obtidos para as populações e/ou espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho, buscando estabelecer os principais eventos envolvidos na divergência cromossômica do gênero.

2 Materiais e Métodos

2.1 Locais de coleta e material utilizado

Exemplares dos gêneros *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria*, das bacias do Alto Paraná, Ribeira do Iguape, Paraíba do Sul e pequenas drenagens independentes do Leste, foram coletados e analisados no presente trabalho, num total de doze espécies de Loricariinae. A figura 2.1 ilustra os locais de coletas dos espécimes estudados, e a figura 2.2 apresenta exemplares ilustrativos dos quatro gêneros aqui estudados. Após as coletas, os exemplares foram encaminhados ao Laboratório de Ictiogenética da Universidade de São Paulo (LIUSP), onde foram processados, sendo posteriormente armazenados em etanol 100%, identificados pela Dra. Ilana Fichberg e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), sendo registrados com os números de tombo MZUSP 105259 a MZUSP 105278. A lista das espécies estudadas e suas respectivas localidades de coleta, bem como os procedimentos metodológicos aplicados a cada uma dessas espécies, são apresentadas na tabela 3.

Figura 2.1: Mapa evidenciando os locais de coleta em bacias hidrográficas de três estados brasileiros.

Figura 2.2: Exemplos ilustrativos dos quatro gêneros estudados. Os exemplares que, nessa figura, ilustram os gêneros *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria*, apresentam um comprimento corporal de 9,4 cm, 12,3 cm, 20,5 cm e 9,7 cm, respectivamente. As fotos ilustrativas foram extraídas dos trabalhos de 1) Provenzano R. *et al.* (2005), 2) Thomas e Rapp Py-Daniel (2008), 3) Reis e Pereira (2000) e 4) Rodríguez e Miquelarena (2005).

Tabela 3: Lista das espécies analisadas, com os dados dos locais de coleta e as técnicas utilizadas em cada população.

Espécie	P	N	Localidade/Bacia	Localização de GPS	Citogenética	PCR-RFLP	ATPase 6 e 8	Cyt B	COI
<i>Harttia</i> sp. n.	A	1♀, 1♂	Rio Passa Cinco (Médio Tietê), Ipeúna, SP/ Alto Paraná	S 22° 25' 50,7" W 47° 41' 47,16"	X	-	X	X	-
<i>Loricaria proluxa</i>	A	2♀	Rio Pardo (Médio Rio Grande), Terra Roxa, SP/ Alto Paraná	S 20° 47' 12,00" W 48° 19' 28,20"	X	X	X	X	X
	B	5♀, 3♂	Rio Mogi-Guaçu (Médio Rio Grande), Porto Ferreira, SP/ Alto Paraná	S 21° 52' 21,48" W 47° 24' 42,3"	X	X	X	X	X
	C	13♀, 5♂, 2J	Rio Mogi-Guaçu (Médio Rio Grande), Descalvado, SP/ Alto Paraná	S 21° 44' 30,6" W 47° 39' 57,29"	X	X	X	X	X
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	A	10♀, 5♂	Rio do Peixe, Mariápolis, SP/ Alto Paraná	S 20° 30' 36,42" W 42° 58' 04,02"	X	X	X	X	X
<i>Rineloricaria latirostris</i>	A	1♀	Rio Mogi-Guaçu (Médio Rio Grande), Descalvado, SP/ Alto Paraná	S 21° 44' 30,60" W 47° 39' 57,29"	X	-	-	-	-
	B	6♀, 2♂, 5J	Rio Passa Cinco (Médio Tietê), Ipeúna, SP/ Alto Paraná	S 22° 25' 50,7" W 47° 41' 47,16"	X	X	X	X	X
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	A	4♀, 2♂	Rio Taquaral (Alto Paranapanema), São Miguel Arcanjo, SP/ Alto Paraná	S 24° 02' 50,58" W 48° 01' 42,96"	X	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 1	A	6♀, 5♂	Rio São José, Vassouras, RJ/ Médio Paraíba do Sul	S 22° 29' 24,06" W 43° 36' 20,76"	X	X	X	X	X
	B	1J	Rio Paraíba do Sul, Itaocara, RJ/ Baixo Paraíba do Sul	S 21° 38' 04,26" W 42° 02' 01,92"	X	-	X	X	X
	C	3♀, 4♂	Rio Macacu, Cachoeiras do Macacu, RJ/ Pequenas drenagens independentes do Rio de Janeiro	S 22° 32' 17,52" W 42° 39' 21,36"	-	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 2	A	3♀, 2♂	Rio Barra Mansa, Barra Mansa, RJ/ Médio Paraíba do Sul	S 22° 36' 01,14" W 44° 10' 13,68"	X	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 3	A	5♀, 2♂	Córrego Passa Vinte, Cruzeiro, SP/ Médio Paraíba do Sul	S 22° 32' 52,44" W 45° 01' 19,44"	X	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 4	A	4♀, 3♂, 3J	Rio Jurumirim, Angra dos Reis, RJ/ Pequenas drenagens independentes do Rio de Janeiro	S 22° 53' 11,40" W 44° 16' 24,18"	X	X	X	X	X
	B	2♀, 2♂	Rio Pirai, Rio Claro, RJ/ Médio Paraíba do Sul	S 22° 41' 55,26" W 44° 05' 42,72"	-	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 5	A	4♀, 4♂, 1J	Riacho da Baía de Paranaguá, Morretes, PR/ Pequenas drenagens independentes do Paraná	S 25° 31' 22,44" W 48° 44' 33,90"	X	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. n.	A	12♀, 20♂, 1J	Rio Jacupiranga, Cajati, SP/ Baixo Ribeira do Iguaçu	S 24° 46' 50,30" W 48° 5' 19,80"	X	X	X	X	X
	B	1♂	Rio Betari, Iporanga, PETAR, SP/ Médio Ribeira do Iguaçu	S 24° 33' 01,56" W 48° 40' 52,5"	X	-	-	-	-
	C	1♀, 1♂	Rio Jacupiranga, Registro, SP/ Baixo Ribeira do Iguaçu	S 24° 36' 01,56" W 47° 52' 32,64"	-	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> cf. <i>nigricauda</i>	A	10♀, 21♂, 4J	Ribeirão Bonito, São José do Vale do Rio Preto, RJ/ Médio Paraíba do Sul	S 22° 9' 9,56" W 43° 0' 2,40"	X	X	X	X	X

P = População, N = tamanho da população, J = Jovem, X = estudo realizado, - = ausência de dados.

2.2 Procedimentos metodológicos

2.2.1 Procedimentos citogenéticos

2.2.1.1 Preparação de cromossomos mitóticos (Gold *et al.*, 1990)

Quarenta e oito horas antes da preparação de cromossomos mitóticos, uma solução de fermento biológico e açúcar, numa proporção de 1:1, foi injetada nos espécimes estudados (100 µL de solução para 10 g de peso corpóreo) a fim de estimular divisões mitóticas no animal. Após essas 48 horas, os cromossomos mitóticos foram obtidos e preparados segundo a técnica de Gold *et al.* (1990), como descrito a seguir:

1. Sacrificar o animal, previamente anestesiado em uma solução de benzocaína, e retirar porções dos rins anterior e posterior com o auxílio de pinças;
2. Transferir o tecido para uma cuba de vidro contendo de 2 a 8 mL de solução de Hank's, dependendo da quantidade de tecido retirado, e dissociar o material com auxílio de uma pinça de dissecação e de uma seringa de vidro desprovida de agulha;
3. Adicionar uma gota de colchicina a 0,025% para cada 2 mL de solução celular e ressuspender com o auxílio de uma pipeta Pasteur;
4. Incubar em estufa a 37° C por cerca de 20 minutos;
5. Ressuspender o material e centrifugá-lo por 10 minutos a 1000 rpm;
6. Remover o sobrenadante, acrescentar de 2 a 8 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M, ressuspender o material e incubá-lo, cerca de 25 minutos, em estufa a 37° C;
7. Adicionar 1 mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético), ressuspender o material e centrifugá-lo por 10 minutos a 1000 rpm;
8. Retirar o sobrenadante, acrescentar 8 ml de fixador e centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm;
9. Repetir o passo 8 mais duas vezes;

10. Após a retirada do sobrenadante da última centrifugação, adicionar 1,5 ml de fixador, ressuspender o material, transferi-lo para tubos de plástico com capacidade de volume de 1,5 a 2 mL e armazená-los em freezer a cerca de - 4° C.

2.2.1.2 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos por impregnação com Nitrato de Prata (Ag-RONs) (Howell e Black, 1980)

1. Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 2 gotas de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 mL para cada 100 mL de solução) mantida em frasco escuro e em geladeira. Alternativamente, pode-se utilizar gelatina comercial sem sabor e incolor;
2. Adicionar sobre cada gota de gelatina, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% mantida em frasco escuro e em geladeira;
3. Cobrir com uma lamínula e incubar em estufa ou banho-maria a 60° C, sobre um suporte, até que a lâmina adquira uma coloração “caramelo”;
4. Lavar a lâmina em água destilada, para retirar a lamínula;
5. Corar com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6,8), por um período de 20 a 30 segundos, e lavar em água corrente.

2.2.1.3 Detecção da Heterocromatina Constitutiva (Banda-C) (Sumner, 1972)

1. Tratar o material preparado, segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N à temperatura ambiente durante 12 a 15 minutos;
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar;
3. Colocar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de Bário (Ba(OH).28H₂O) 5%, recém-preparada e filtrada, a 42°C, durante 1 a 2,5 minutos;

4. Para interromper a ação da solução de hidróxido de Bário e evitar precipitação, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
5. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C durante 25 minutos;
6. Lavar a lâmina em água corrente, secar ao ar e corar com solução de Giemsa 5% durante 10 minutos.

2.2.1.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel, 1986)

As sondas de DNAr 18S aqui utilizadas foram obtidas nos trabalhos de Hatanaka e Galetti Jr. (2004). As sondas de DNAr 5S e as sondas teloméricas, aqui também utilizadas, foram obtidas no presente trabalho, e o procedimento metodológico da obtenção dessas sondas é descrito no item *Estudos moleculares*, nessa mesma seção.

Marcação da Sonda de DNA com Biotina (*Kit Bionick Labeling System* – *Invitrogen*®):

1. Pipetar em um tubo de 1,5 mL no gelo (caso use termociclador, use tubo de 0,2 mL):
 - Adicionar 5 µL de dNTP mix 10x;
 - Adicionar ____ µL (1 µg) de DNA;
 - Adicionar ____ µL de água destilada (q.s.p. 45 µL);
 - Adicionar 5 µL de Enzima mix 10x.
2. Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g);
3. Incubar a 16° C por uma hora (para sondas pequenas, o tempo de incubação pode ser de até duas horas);
4. Adicionar 5 µL de Stop Buffer;
5. Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (5 µL) e etanol absoluto gelado (110 µL);

6. Misturar invertendo o tubo. Levar a freezer -20° C por duas horas ou overnight (ou uma hora a -80° C);
7. Centrifugar a 15000g por 10 minutos;
8. Cuidadosamente, remover o sobrenadante e secar o *pellet*;
9. Ressuspender o *pellet* em 50 µL de água destilada;
10. Repetir os passos 5 e 6;
11. Ressuspender em 80 µL de TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) – 1 mM EDTA) e armazenar a -20° C. Caso a sonda seja utilizada no mesmo dia, pode-se usar água destilada (do próprio kit).

Preparação das lâminas

Tratamento com RNase

1. Incubar as lâminas em 90 µL de RNase 10mg/mL 0,4% em 2xSSC, por uma hora, em câmara úmida a 37° C;
2. Lavar três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada;
3. Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

Pós-fixação

1. Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50nM de cloreto de magnésio durante 10 minutos, em temperatura ambiente;
2. Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente;
3. Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70% (sob agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada.

Pré-hibridação

1. Desnaturar o DNA das lâminas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70°C;
2. Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada;

3. Deixar secar ao ar, enquanto prepara-se a solução de hibridação.

Solução de Hibridação

Adicionar aos 80 μ L de sonda marcada:

1. 200 μ L de formamida pura;
2. 80 μ L de sulfato dextrano 50% (concentração final 10%);
3. 40 μ L de 20xSSC.

Hibridação

1. Levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois;
2. Colocar 40 μ L da solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina seca sobre a lamínula;
3. Deixar as lâminas com material voltado para baixo em câmara úmida a 37° C *overnight*.

Lavagens (sempre em agitação, sem deixar as lâminas secarem)

1. Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos, apenas para soltar as lamínulas;
2. Lavar duas vezes em formamida 20% em 0,1xSSC a 42° C, durante 5 minutos cada;
3. Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42° C durante 5 minutos cada;
4. Lavar uma vez em 2xSSC a 42° C durante 5 minutos;
5. Lavar em Tween 20/20xSSC durante 5 minutos, em temperatura ambiente.

Obs: No momento da lavagem, pode-se aumentar a estringência da sonda com a diminuição na concentração de SSC e a elevação da temperatura, seguidas do aumento na concentração de formamida. De maneira oposta, se a intenção é diminuir a estringência, então é preciso aumentar a concentração de SSC e reduzir a temperatura, diminuindo também a concentração de formamida.

Deteção do Sinal

1. Incubar as lâminas em tampão NFDm por 15 minutos;
2. Lavar duas vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
3. Incubar as lâminas com 90 µL de solução de FITC-avidina (preparada 30 minutos antes), durante 30 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
4. Lavar 3 vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
5. Incubar as lâminas com 90 µL de solução de anti-avidina conjugada com biotina (preparada 30 minutos antes), durante 30 minutos em câmara úmida escura, em temperatura ambiente;
6. Repetir passo 4 (lavagem);
7. Repetir passo 3 (FITC-avidina);
8. Repetir passo 4 (lavagem);
9. Repetir passo 5 (anti-avidina);
10. Repetir passo 4 (lavagem);
11. Repetir passo 3 (FITC-avidina);
12. Repetir passo 4 (lavagem);
13. Desidratar as lâminas em série alcoólica de etanol 70% (sob agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada, e deixar secar ao ar.

Montagem das lâminas

1. Monte as lâminas com solução de iodeto de propídio (PI) e antifade, na proporção de 200 µL de antifade para 8 µL de PI a 50 µg/mL, com lamínula longa (60x24);

2. Caso use *Vectashield Mounting Medium with PI* (1,5 $\mu\text{L/mL}$) da marca Vector®, acrescentar mais PI:
 - 200 μL de antifade com PI;
 - 2 μL de PI (50 $\mu\text{L/mL}$).

2.2.1.5 Captura de imagens

As preparações foram analisadas em microscópio ótico ou microscópio de epifluorescência, e capturadas com 5Mp de definição por meio do sistema de análise de imagens *CoolSnap Pro*, com a utilização do programa *Image Pro® Plus* (Media Cybernetics).

2.2.1.6 Montagem dos cariótipos e construção dos idiogramas

Para a medição dos braços cromossômicos, utilizou-se o programa *MicroMeasure* 3.3 (Reeves, 2001). A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. As imagens foram recortadas e os cariótipos montados utilizando o programa Adobe Photoshop CS2. Os idiogramas dos cariótipos analisados foram construídos a partir do programa computacional IDIOGRAMA.exe, desenvolvido pelo Msc. Ary Bressane, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

2.2.2 Procedimentos moleculares

2.2.2.1 Extração salina de DNA total (Aljanabi e Martinez, 1997)

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de fígado, músculo ou nadadeiras, por meio da técnica de extração salina de DNA descrita a seguir:

1. Retirar uma amostra de tecido e colocar em tubo tipo *eppendorf* estéril. Deixar secar em estufa a 37° C até a evaporação do álcool (5 a 10 min.);
2. Homogeneizar bem a amostra com auxílio de uma tesoura, ou pinça, em 400 µL de tampão salino;
3. Adicionar 40 µL de SDS 20% (concentração final 2%) e 5 a 8 µL de proteinase K (10mg/mL). Misturar bem;
4. Incubar por cerca de 1 hora a 65° C ou *overnight*;
5. Esperar a amostra atingir a temperatura ambiente e adicionar 10 µL de RNase (10 mg/mL) e deixar cerca de 1 hora a 37° C;
6. Adicionar 300 µL de NaCl 6M e vortexar em alta velocidade por cerca de 1 minuto;
7. Centrifugar a 10.000g por 30min;
8. Transferir o sobrenadante para *eppendorf* estéril;
9. Adicionar 600 µL de isopropanol gelado e misturar bem, vertendo o tubo delicadamente;
10. Incubar a -20° C por 1 hora ou *overnight*;
11. Centrifugar 20 minutos a 10.000g (4° C);
12. Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* em 600 µL de etanol 70%, centrifugando por 10 minutos a 10.000G (4°C);
13. Secar o pellet em estufa até evaporação de álcool ou deixar a temperatura ambiente *overnight*;
14. Adicionar 50 µL de TE ou água estéril. Deixar as amostras 24 h a 4° C. Armazenar em freezer (-20° C).

Para confirmar as extrações, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizadas em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa *Electrophoresis Documentation*

and Analysis System (Kodak®) e a quantidade de DNA foi avaliada por comparação com um marcador de peso molecular (*Low DNA Mass* - Invitrogen®).

2.2.2.2 Obtenção de sondas de DNAr 5S

As sondas de DNAr 5S foram obtidas via PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), a partir do DNA molde de *Rineloricaria latirostris* e utilizando o par de *primers* 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' + 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3', que foi desenvolvido para a região de DNAr 5S de truta arco-íris (Komiya e Takemura 1979). Cada PCR apresentou um volume final de 25 µL contendo: 1 µL de DNA molde (10ng/µL), 1 µL de cada primer (10 pM), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão (10x), 2,5 µL de dNTP (10 µM), 0,25 µL (5U) de Taq polimerase - Fermentas® e 15,25 µL de água destilada. As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research® e as condições da PCR foram as seguintes: 5 minutos a 94° C, trinta ciclos de: 1 minuto a 95° C, 30 segundos a 58° C e 1 minuto a 72° C, um período de extensão final de 10 minutos a 72° C e um período de resfriamento a 4° C. Para confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System). Produtos de PCR com cerca de 200 pares de bases foram purificados utilizando o Kit IlustraTM GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK).

2.2.2.3 Obtenção de sondas teloméricas

As sondas de sequências teloméricas foram obtidas por meio da PCR, na ausência de DNA molde, utilizando os *primers* degenerados (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅, conforme descrito por Ijdo *et al.* (1991). A solução de reação apresentou

um volume final de 25 µL contendo: 1 µL de cada primer (10 pM), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão (10x), 2,5 µL de dNTP (10 µM), 1 µL de Tris-HCl (pH 8.3, 10mM), 0,25 µL (5U) de Taq polimerase - Fermentas® e 15,25 µL de água destilada. A amplificação consistiu em 10 ciclos, sendo 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de 30 ciclos sendo 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C e um passo final de 5 minutos a 72°C. Para confirmação da qualidade dos produtos de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

2.2.2.4 Reação de amplificação dos genes mitocondriais

As regiões mitocondriais das espécies do presente trabalho foram amplificadas via PCR, utilizando para tanto os seguintes pares de *primers*:

- a) ATPase 6 e 8: ATP8.2-L8331 (5'-AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC-3') + CO3.2-H9236 (5'-GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C-3') (Sivasundar *et al.*, 2001), que amplificam um segmento de aproximadamente 950pb, correspondente às sequências das subunidades 6 e 8 do gene da ATPase e à sequência parcial da subunidade 3 do gene da citocromo-oxidase (CO3);
- b) Citocromo b: GluDG.L (5'-TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG-3') + H16460 (5'-CGAYCT TCG GAT TAC AAG ACC G-3') (Perdices *et al.*, 2002), que amplificam um segmento de aproximadamente 1100pb, correspondente às sequências dos genes de tRNA da glutamina e treonina;
- c) Citocromo c oxidase I (COI): FishF2_t1 (5'- TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC -3') + FishR2_t1 (5'- ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA

-3') (Ward *et al.*, 2005), que amplificam um segmento de aproximadamente 650pb, correspondente às sequências da subunidade 2 do COI.

Cada PCR apresentou um volume final de 25 µL contendo: 1 µL de DNA molde (10ng/µL), 1 µL de cada primer (10 pM), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão (10x), 2,5 µL de dNTP (10 µM), 0,25 µL de Taq polimerase - Fermentas® (5U) e 15,25 µL de água destilada. As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research®. As condições de amplificação dos genes Citocromo b e do COI foram as seguintes: 4 minutos a 94° C, cinco ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 50° C e 90 segundos a 72° C, 40 ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 53° C e 90 segundos a 72° C, um período de extensão final de 10 minutos a 72° C e um período de resfriamento a 4° C. As condições de amplificação dos genes ATPase 6 e 8 foram as seguintes: 4 minutos a 94° C, cinco ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 53° C e 90 segundos a 72° C, 40 ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 56° C e 90 segundos a 72° C, um período de extensão final de 10 minutos a 72° C e um período de resfriamento a 4° C.

Para a confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizadas em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

2.2.2.5 PCR-RFLP

Um mix de solução com enzima de restrição, contendo 1,0 µl de tampão específico, 0,3 µl de enzima e 5,7 µl de água destilada, foi adicionado a 3,0 µl do produto de amplificação do gene mitocondrial ATPase 6 e 8, a fim de digeri-lo. As enzimas utilizadas foram *Alu* I, *Eco* RI, *Hae* III, *Hind* III, *Mbo* I e *Rsa* I, que

reconhecem os sítios de corte AG/CT, G/AATTC, GG/CC, A/AGCTT, /GATC, GT/AC, respectivamente.

Os produtos das digestões (10 µl da reação de digestão+1,0 µl de azul de bromofenol) foram separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo e um ladder de 50 pb foi adicionado ao gel para uma verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados com a digestão. Os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta, fotografados e digitalizados pelo programa Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak®).

Cada padrão dos polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição obtido para cada enzima foi nomeado com uma letra, sendo que cada haplótipo foi representado por um conjunto de letras baseado nas enzimas de restrição.

A partir da matriz obtida, foram calculados os valores de diversidade e divergência nucleotídica observados entre as populações e espécies. Também foram calculados os valores de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica dentro das amostras, segundo o modelo de Nei e Tajima (1981) utilizando o programa REAP (Restriction Enzyme Analysis Package) (McElroy et al., 1992). Com base nesses dados, foi construído um fenograma de Evolução Mínima utilizando o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007) para a determinação das relações entre as espécies e populações estudadas.

2.2.2.6 Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando-se o sequenciador modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems, marca HITACHI®. Para realização da reação de sequenciamento foi utilizado o kit “BigDye Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems). Cada reação apresentou um volume final de 10 µL contendo: 1,0 µl da reação de PCR, 2µl

Sequencing Buffer, 0,5µl de primer [10pM], 5,5 µl de água destilada, 1µl BigDye® Terminator v3.1. As condições de amplificação consistiram em 25 ciclos de: 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após término do ciclo de Big Dye, os produtos foram precipitados conforme o protocolo descrito a seguir:

- Adicionar 80 µl de um mix, composto por 3µl de acetato de sódio 3M pH 5,5; 62,5 µl de etanol absoluto; 14,5 µl de água destilada, por tubo de reação;
- Homogeneizar cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta e deixar os tubos no escuro por no mínimo 15 minutos;
- Centrifugar por 20 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente;
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta;
- Adicionar 200 µl de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente;
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta e deixar os tubos durante 3 minutos a 95°C (com a tampa aberta) para evaporação do álcool;
- Manter a -20° C até o momento da aplicação das amostras no sequenciador.

2.2.2.7 Obtenção e análise das sequências

Posteriormente ao sequenciamento, dois tipos de arquivos foram obtidos, um contendo a sequência propriamente dita, e outro contendo o eletroferograma (representação gráfica do sinal cromatográfico gerado pela passagem de cada nucleotídeo pelo detector do sequenciador). As sequências foram visualizadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e para obtenção das sequências consenso entre as sequências da cadeia leve e pesada do DNAm^t, fez-se uso do programa Geneious 3.8.5. Todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W v1.6 (Thompson *et al.*, 1994), com o auxílio do programa

Geneious 3.8.5, aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (10) e extensão de *gaps* (0,2).

Após o alinhamento e com a ajuda, ainda, do programa Geneious 3.8.5, o quadro de leitura foi verificado, uma vez que a tradução dos códons das sequências codificadoras possibilita a detecção de erros. As sequências foram verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do programa “BlastN”, que investiga a similaridade de sequências “blastadas” com sequências de DNAm de outros peixes. Para verificação da ocorrência de saturação nos genes foi utilizado o programa DAMBE (Xia e Xie, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), que possibilitou a construção de gráficos que explanam a quantidade de transições (TS) e transversões (TV) com relação à distância genética entre os táxons.

2.2.2.8 Análises filogenéticas e distâncias genéticas

Para as análises filogenéticas baseadas nos genes citocromo b e ATPase 6 e 8, foram escolhidos dois indivíduos de cada população. As espécies *Harttia* sp. n., *Loricaria prolixa* e *Loricariichthys platymetopon* foram escolhidas como grupos externos e as análises filogenéticas foram realizadas com as regiões gênicas separadas e concatenadas. A construção de dendrogramas baseados no algoritmo de agrupamento de vizinhos “Neighbor Joining”- NJ (Saitou e Nei, 1987) foi feita por meio do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007) associado ao modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), que considera as diferenças entre as taxas de transição e transversões, assim como as diferenças quanto ao conteúdo de bases CG. Testes de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) de 1000 replicações foram efetuados para a árvore NJ construída, sendo que os valores inferiores a 50% foram desconsiderados.

As análises baseadas no método de Máxima Parcimônia (MP) foram realizadas por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística (adição

de passos – *stepwise addition*) com algoritmo “tree bisection and reconnection” (TBR), sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram considerados como dados ausentes. Foram calculados os índices de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência reescalado (CR) por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002). O programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999) foi empregado para a obtenção do índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994). A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado foi realizada pelo programa MODELTEST 3.0 (Posada e Crandall, 1998). Para a determinação dos valores de *bootstrap* foram utilizadas 1000 replicações, respectivamente, com retenção de grupos com frequência maior que 50%.

Para as análises do COI, os valores de divergência das sequências foram calculados usando o modelo de distância Kimura dois parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), considerando como substituições as transições e as transversões. A árvore de Neighbor-joining (NJ) foi construída também com base no modelo de distância K2P, com os valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) calculados no programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007), utilizando 10000 réplicas. Para a construção dessa árvore, os grupos externos escolhidos foram *Loricaria prolixa* e *Loricariichthys platymetopon*.

Em todas as análises, o grupo interno foi formado por espécies de *Rineloricaria* de drenagens do sul e sudeste do Brasil. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram considerados muito fracos, valores entre 50 e 70 foram considerados fracos, entre 70 e 90 bons e valores iguais ou superiores a 90 foram considerados fortes (Schneider, 2007).

Capítulo I

O uso de ferramentas citogenéticas no entendimento dos mecanismos de evolução cromossômica em *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) e suas implicações taxonômicas.

Palavras-chave: Bacia do Alto Paraná, Drenagens do Leste Brasileiro, variações cromossômicas, rearranjos Robertsonianos, tendências evolutivas.

Abstract

Rineloricaria is the largest genus of Loricariinae and presents the greatest conflicts taxonomic of subfamily with 64 species distributed throughout South America and parts of Central America. Although only seven species have been studied cytogenetically, this genus shows a wide variation in chromosome number, with the diploid number ranging from $2n = 36$ to $2n = 70$ chromosomes. The occurrence of numerical chromosomal intrapopulation variations without changing the fundamental number found in populations of *R. latirostris*, suggest a significant participation of Robertsonian rearrangements in the chromosome of this species and the karyotypic diversity identified in the genus. The taxonomic conflicts found in *Rineloricaria* indicate that morphological data are not always effective or sufficient in solving taxonomic problems and the association of morphological data on cytogenetic markers may be useful in elucidating these conflicts. Based on data obtained from techniques of classical and molecular cytogenetics, this study aimed to highlight the main features of the species of cytogenetic *Rineloricaria* from the Upper Paraná Basin and the drainage system of the East. This work contributed to the number of species of the genus studied

cytogenetically doubled, and new diploid numbers and new karyotypes formulas have been identified. The results support the proposal of the involvement of Robertsonian rearrangements in the evolutionary history of *Rineloricaria*, in addition to reaffirming the chromosomal variation identified in the genus. The taxonomic implications of cytogenetic data and the factors and processes that drive the variability of karyotype *Rineloricaria* are discussed.

Resumo

Com 64 espécies distribuídas por toda a América do Sul e parte da América Central, *Rineloricaria* é o maior gênero de Loricariinae e apresenta os maiores conflitos taxonômicos da subfamília. Embora apenas sete espécies tenham sido estudadas citogeneticamente, esse gênero apresenta uma ampla variação cromossômica numérica, com o número diplóide variando de $2n=36$ a $2n=70$ cromossomos. A ocorrência de variações cromossômicas numéricas intrapopulacionais sem a alteração do número fundamental, encontradas em populações de *R. latirostris*, sugere uma expressiva participação de rearranjos Robertsonianos na evolução cromossômica desta espécie e na diversidade cariotípica identificada no gênero. Os conflitos taxonômicos encontrados em *Rineloricaria* indicam que dados morfológicos nem sempre são eficazes ou suficientes na resolução de problemas taxonômicos e a associação de dados morfológicos a marcadores citogenéticos pode ser útil na elucidação desses conflitos. Com base em dados obtidos a partir de técnicas de citogenética clássica e molecular, o presente estudo teve por objetivo realçar as principais características citogenéticas das espécies de *Rineloricaria* provenientes da Bacia do Alto Paraná e do sistema de drenagens do Leste. O presente trabalho contribuiu para que o número de espécies do gênero estudadas citogeneticamente dobrasse, e novos números diplóides, bem como novas fórmulas cariotípicas, foram identificadas. Os resultados obtidos corroboram a

proposta da participação dos rearranjos Robertsonianos na história evolutiva de *Rineloricaria*, além de reafirmarem a variação cromossômica identificada no gênero. As implicações taxonômicas dos dados citogenéticos e os fatores e os processos que fomentaram a variabilidade cariotípica de *Rineloricaria* são aqui discutidos.

Introdução

Rineloricaria é o maior gênero da subfamília Loricariinae com 64 espécies distribuídas desde a Costa Rica até o Norte da Argentina e em ambos os lados dos Andes (Covain e Fisch-Muller, 2007; Ferraris, 2007). Dos espécimes desse gênero depositados nas coleções de museus de zoologia, apenas cerca de 30% estão identificados e muitas espécies esperam, nas prateleiras dos museus, para serem descritas (Fichberg, 2008), o que deve aumentar consideravelmente o número de espécies atribuídas ao gênero.

O caráter mais marcante entre as espécies de *Rineloricaria* é a presença de um sulco na parte posterior dos olhos. Esse caráter é seguido de outras características como o focinho geralmente pontiagudo e nu (sem placas), o pedúnculo caudal bastante alongado e o espinho superior da nadadeira caudal dos machos continuando-se num longo filamento. Os representantes deste gênero têm em média 15 cm de comprimento corporal e são encontrados em ambientes de corredeiras, fixados nas rochas e troncos, ou em remansos com fundo arenoso, ficando enterrados sob a areia (Oyakawa *et al.*, 2006).

A perda do holótipo da espécie tipo (*Rineloricaria lima*), a ausência de parátipos e a falta de informações concretas sobre a localidade tipo (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008), torna necessária a descrição de um neótipo e uma revisão taxonômica para o gênero. Segundo Covain e Fisch-Muller (2007), embora as descrições elaboradas

por Kner (1853) para o gênero sejam bem detalhadas, muitas características são válidas para todos os gêneros da subfamília.

Rodriguez e Reis (2008) propõem a divisão do gênero *Rineloricaria* ao reconhecer a revalidação do gênero *Hemiloricaria*, feita por Isbrücker *et al.* (2001), considerando que este gênero corresponderia ao grupo de espécies de *Rineloricaria* distribuídas por toda a América do Sul, enquanto que o gênero *Rineloricaria*, propriamente dito, estaria restrito à bacia do Alto Paraná e às drenagens costeiras do Atlântico. Entretanto, além de algumas características diagnósticas de *Hemiloricaria* estarem presentes em espécies de *Rineloricaria* (Covain e Fisch-Muller, 2007), Fichberg (2008), em um estudo filogenético incluindo 181 caracteres morfológicos e 36 espécies de *Rineloricaria* (dentre as quais aquelas consideradas pelos outros autores como sendo *Hemiloricaria*), recupera o gênero *Rineloricaria* como um grupo monofilético.

Diante de conflitos taxonômicos como esses, reconhecer qualquer revalidação ou realocação das espécies em ambos os gêneros torna-se uma tarefa difícil. As únicas conclusões claras obtidas com esses exemplos mostram que dados morfológicos nem sempre são eficazes ou suficientes na resolução desses problemas e que a associação de dados morfológicos a marcadores citogenéticos e moleculares podem ser útil na elucidação desses conflitos.

Das 64 espécies descritas para *Rineloricaria*, somente sete passaram por alguma caracterização citogenética, sendo todas estas provenientes das drenagens do rio Paraná, do rio São Francisco e das drenagens costeiras do Atlântico (Tabela 1 – Introdução Geral). Ainda que poucos estudos citogenéticos tenham sido conduzidos no gênero, *Rineloricaria* revela uma expressiva variação de número cromossômico. O menor número diplóide registrado é de $2n=36$ cromossomos em *R. latirostris* (Giuliano-

Caetano, 1998), e o maior número diplóide é $2n=70$ cromossomos, em *Rineloricaria* sp. n. (Alves *et al.*, 2003) e *R. strigilata* (Maia *et al.*, 2010).

Apesar dessa variação numérica, o número fundamental não difere muito entre as espécies estudadas, indicando que as translocações Robertsonianas foram os rearranjos mais marcantes na história evolutiva dos cariomorfos deste grupo, já que esses estudos demonstram uma correlação entre o número diplóide e a fórmula cariotípica, evidenciando que quanto maior o número diplóide, maior o número de cromossomos com um braço cromossômico e menor o número de cromossomos com dois braços. Embora pontuais, polimorfismos estruturais, polimorfismos no tamanho das RONS e a presença de cromossomos supranumerários também têm sido registrados no gênero (Alves *et al.*, 2003; Errero-Porto; 2007; Maia *et al.*, 2010), aumentando ainda mais sua variabilidade cariotípica.

Neste capítulo são apresentados dados citogenéticos referentes a espécies de *Rineloricaria* coletadas na Bacia do Alto Paraná e no sistema de drenagens do Leste. O presente estudo tem por finalidade realçar as principais características citogenéticas das espécies de *Rineloricaria* dessas bacias e discutir suas implicações taxonômicas, além de identificar os fatores e os processos que fomentaram a variabilidade cariotípica típica do gênero.

Materiais e Métodos

Foram analisados exemplares de 12 populações referentes a nove espécies de *Rineloricaria*. Dessas nove espécies, duas são provenientes do Alto Paraná e sete são oriundas das drenagens do Leste Brasileiro. Informações completas sobre o tamanho populacional e as localidades de coleta de cada espécie estão disponíveis na tabela 3. Entre as sete espécies provenientes do Leste Brasileiro e que foram aqui estudadas, *Rineloricaria* sp. n. é uma espécie nova e está sendo descrita pelo Dr. Osvaldo T.

Oyakawa, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. As demais espécies do Leste Brasileiro, com exceção de *R. cf. nigricauda*, serão aqui denominadas como *Rineloricaria* sp. 1-5 por orientação do Dr. Osvaldo T. Oyakawa e da Dra. Ilana Fichberg (esta última também do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo). Segundo esses taxonomistas, definir essas cinco espécies como sendo *R. cf. lima* ou *R. aff. lima* seria redundante, pois, embora se suspeite que a localidade da espécie tipo seja a Bacia do Rio Paraíba do Sul, o holótipo da espécie tipo de *Rineloricaria* (*R. lima*) foi perdido, gerando dificuldade na identificação desses exemplares.

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos seguiu-se o protocolo proposto por Gold *et al.* (1990), utilizando-se meio de cultura Hank's. Para estimular divisões mitóticas injetou-se uma solução de fermento biológico e açúcar no animal, numa proporção de 1:1. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. Para a determinação da distribuição da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica de Bandas C proposta por Sumner (1972). A identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) por impregnação de nitrato de prata seguiu a metodologia de Howell e Black (1980). A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) utilizando sonda de sequências teloméricas, a qual foi hibridada nos cromossomos das espécies analisadas a fim de serem identificadas possíveis ITSs (Sequências Teloméricas Intersticiais). Essa sonda foi obtida por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), na ausência de DNA molde, conforme as condições propostas por Ijdo *et al.* (1991), utilizando os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ e foi marcada

com biotina-dATP pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen®).

Resultados

As nove espécies analisadas apresentaram uma variação de número diplóide de $2n=40$ a $2n=70$ cromossomos e, entre as espécies que demonstraram ter o mesmo número diplóide, ocorreram variações em suas fórmulas cariotípicas (figuras 3.1-3.7). O número de cromossomos com um único braço aumentou à medida que o número de cromossomos foi aumentando, com a redução, por consequência, do número de cromossomos com dois braços. Nas populações com representantes de ambos os sexos, não foi identificada nenhuma variação cariotípica intersexual evidente. A tabela 4 apresenta os números diplóides e a constituição cromossômica de todas as populações analisadas, além da caracterização das RONS nos cariótipos.

Variações numéricas e estruturais, inter e intrapopulacionais, foram identificadas em algumas espécies. O exemplar da população A de *R. latirostris* apresentou $2n=40$ cromossomos, enquanto os representantes da população B dessa mesma espécie apresentaram $2n=46$ cromossomos. Em ambas as populações, um heteromorfismo de tamanho envolvendo o primeiro par do complemento cromossômico foi identificado, e esse polimorfismo foi caracterizado pela presença de um metacêntrico grande que apresentou um cromossomo metacêntrico médio como seu homólogo (figura 3.1).

Na população pertencente à espécie *Rineloricaria* sp. 2, todos os exemplares apresentaram $2n=62$ cromossomos, mas três citótipos foram evidenciados. O citótipo A foi encontrado em apenas um macho, que apresentou em sua macroestrutura cromossômica $2sm + 60st/a$ (figura 3.3a). O citótipo B foi identificado em duas fêmeas, que apresentaram uma fórmula cariotípica de $4m + 58st/a$ (figura 3.3b). Já o citótipo C

foi evidenciado em um macho e uma fêmea, que, por sua vez, apresentaram sua constituição cariotípica dada por $6m + 2sm + 54st/a$ (figura 3.4a).

Na população A de *Rineloricaria* sp. n. também foram identificados dois citótipos, mas neste caso evidenciou-se uma variação no número diplóide. No citótipo A, 26 indivíduos apresentaram $2n=68$ cromossomos, fórmula cariotípica constituída por $3m + 65st/a$ e um par heteromórfico constituído por um metacêntrico grande e um subtelocêntrico grande (figura 3.6a). Já no citótipo B, 7 indivíduos apresentaram em suas células somáticas 70 cromossomos do tipo subtelocêntricos/acrocêntricos (figura 3.6b).

Tabela 4: Dados cromossômicos das espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho e suas respectivas populações

Espécie	P	N	Localidade	2n	FC	NF	RONs (Localização)
<i>R. latirostris</i>	A	1♀	Rio Mogi-Guaçu, Descalvado, SP (AP)	40	16m, 4sm, 20st/a	60	Intersticial (Par 2/ Braço Curto)
	B	6♀, 2♂, 5J	Rio Passa Cinco, Ipeúna, SP (AP)	46	10m, 4sm, 32st/a	60	Intersticial (Par 1/ Braço Curto)
<i>R. pentamaculata</i>	A	4♀, 2♂	Rio Taquaral, São Miguel Arcanjo, SP (AP)	58	2m, 2sm, 54st/a	62	Terminal (Par 3/ Braço Curto)
<i>Rineloricaria</i> sp. 1	A	6♀, 5♂	Rio São José, Vassouras, RJ (PS)	62	2sm, 60st/a	64	Terminal (Par 2/ Braço Curto)
	B	1J	Rio Paraíba do Sul, Itaocara, RJ (PS)	62	2sm, 60st/a	64	Terminal (Par 2/ Braço Curto)
<i>Rineloricaria</i> sp. 2	A	1♂	Rio Paraíba do Sul, Barra Mansa, RJ (PS)	62	2sm, 60st/a	64	Terminal (Par 2/ Braço Curto)
		2♀		62	4m, 58st/a	66	Terminal (Par 3/ Braço Curto)
		1♂, 1♀		62	6m, 2sm, 54st/a	62	Terminal (Par 5/ Braço Curto)
<i>Rineloricaria</i> sp. 3	A	5♀, 2♂	Córrego Passa Vinte, Cruzeiro, SP (PS)	62	6m, 2sm, 54st/a	62	Terminal (Par 5/ Braço Curto)
<i>Rineloricaria</i> sp. 4	A	4♀, 3♂, 3J	Rio Jurumirim, Angra dos Reis, RJ (PDRJ)	64	6m, 58st/a	70	Terminal (Par 5/ Braço Curto)
<i>Rineloricaria</i> sp. 5	A	4♀, 4♂, 1J	Riacho da Baía de Paranaguá, Morretes, PR (PDPR)	68	2m, 66st/a	70	Terminal (Par 3/ Braço Curto)
<i>Rineloricaria</i> sp. n.	A	8♀, 17♂, 1J	Rio Jacupiranga, Cajati, SP (RI)	68	3m, 65st/a	71	Terminal (Par 4/ Braço Curto)
		4♀, 3♂		70	70st/a	70	Terminal (Par 2/ Braço Curto)
	B	1♂	Rio Betari, Iporanga, PETAR, SP (RI)	70	70st/a	70	Terminal (Par 1/ Braço Curto)
<i>R. cf. nigricauda</i>	A	10♀, 21♂, 4J	Ribeirão Bonito, São José do Vale do Rio Preto, RJ (PS)	70	70st/a	70	Terminal (Par 4/ Braço Curto)

P = População, N = tamanho da população, J = Jovem, AP = Alto Paraná, PS = Paraíba do Sul, PDRJ = Pequenas Drenagens do Rio de Janeiro, PDPR = Pequenas Drenagens do Paraná, RI = Ribeira do Iguape, 2n = número diplóide, FC = fórmula cariotípica, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, RONs = regiões organizadoras de nucléolo. OBS: Para maiores informações sobre coordenadas geográficas e as localidades, veja a segunda seção dessa dissertação.

Todas as populações/espécies apresentaram RONS simples com localizações diferenciadas, posicionando-se intersticialmente no braço curto, próximas à região do centrômero de um par de metacêntricos grandes nas duas populações de *R. latirostris* (figura 3.1), ou em posição terminal no braço curto de um par de subtelocêntricos/acrocêntricos grandes nas populações das demais espécies (figuras 3.2-3.7).

Heteromorfismos de tamanho das RONS foram identificadas em alguns indivíduos da população B de *R. latirostris* (figura 3.1b), no exemplar da população B de *Rineloricaria* sp. n. (figura 3.7a) e na metade dos representantes da população de *R. cf. nigricauda*. A outra metade dos exemplares de *R. cf. nigricauda* apresentou RONS homomórficas de tamanho menor (figura 3.7b) e não foram encontrados representantes com RONS homomórficas de tamanho maior nesta população. Na população B de *R. latirostris* foram encontrados indivíduos com RONS homomórficas de tamanho menor e maior em iguais proporções.

Quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, observou-se, nos cariomorfos das nove espécies, pouca quantidade de heterocromatina, com blocos heterocromáticos ocorrendo somente em posição pericentromérica na maioria dos cromossomos e um grande bloco heterocromático associado às RONS (figura 3.8).

Associações cromossômicas conspícuas por meio dos centrômeros e envolvendo de três a dez cromossomos aparentemente não-homólogos foram observadas em muitas metáfases de todos os espécimes das nove espécies analisadas, formando uma configuração radial (figura 3.9). Essa configuração foi observada, em sua maioria, entre cromossomos acrocêntricos, com raras metáfases contendo nessa configuração cromossomos subtelocêntricos (figura 3.9f). Nenhuma metáfase apresentou, neste tipo de associação, cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. As análises de bandas C

revelaram segmentos heterocromáticos conspícuos próximos às regiões centroméricas dos cromossomos envolvidos nessa associação (figura 3.10).

A hibridação *in situ* com sonda de sequências teloméricas foi aplicada em sete das nove espécies que tiveram seus cariótipos descritos no presente trabalho, sendo elas *R. latirostris* (populações A e B), *Rineloricaria* sp. 1 (população A), *Rineloricaria* sp. 2, *Rineloricaria* sp. 4, *Rineloricaria* sp. 5, *Rineloricaria* sp. n. (população B) e *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As populações das sete espécies apresentaram marcações terminais em todo o cariótipo (figura 3.11), mas somente a população A de *R. latirostris* apresentou marcações intersticiais, e essas marcações foram encontradas num par de metacêntricos de tamanho médio, na região pericentromérica (figuras 3.11a).

Discussão

Variações cromossômicas não programadas podem ser desvantajosas, neutras ou vantajosas para o indivíduo. As desvantajosas são eliminadas da população, enquanto as neutras ou vantajosas permanecem, contribuindo para a variação cariotípica natural das espécies (Guerra, 1988). São conhecidos entre os peixes casos de variações cromossômicas naturais, no qual fissões e fusões cêntricas, inversões e presença de cromossomos supranumerários revelam-se como os eventos mais frequentes que resultam em diferenças cariotípicas, podendo ser seguidos por alguns casos de poliploidia.

Os peixes apresentam uma ampla faixa de variação de números diplóides, de $2n=12$ a $2n=500$, além de polimorfismos em nível intrapopulacional e intraespecífico (Kirpichnikov, 1981; Leggatt e Iwama, 2003). Oliveira *et al.* (2007) observaram, entre os peixes neotropicais, uma variação de números cromossômicos indo de $2n=20$ cromossomos, em Rivulidae, a $2n=134$ cromossomos, em Callichthyidae. Dentro da Ordem Siluriformes, uma grande variação de número diplóide também é observada,

com o menor número de cromossomos ocorrendo em Loricariidae ($2n=36$) e o maior em Callichthyidae ($2n=134$). Loricariidae, a maior família da Ordem Siluriformes, apresenta uma das mais amplas variações de números cromossômicos dentro desta ordem, com o número diplóide variando de $2n=36$ a $2n=96$ cromossomos (Oliveira *et al.*, 2007). Ainda que somente sete espécies de *Rineloricaria* tenham sido estudadas citogeneticamente até agora, esse loricariídeo contribui diretamente para a variação numérica encontrada nessa família ($2n=36$ a $2n=70$ cromossomos), além de apresentar variações estruturais intra e interespecíficas.

Das populações/espécies de *Rineloricaria* analisadas no presente trabalho, algumas já foram caracterizadas citogeneticamente por outros autores. É o caso de *R. latirostris* (populações A e B) e *Rineloricaria* sp. n. (população B). Os cariomorfos das duas populações de *R. latirostris* já foram descritos por Giuliano-Caetano (1998) em sua tese de doutoramento. Entretanto, dos cinco citótipos descritos por Giuliano-Caetano para a população do rio Mogi-Guaçu, o presente trabalho só encontrou o citótipo de número diplóide equivalente a $2n=40$ cromossomos, embora a amostragem do presente trabalho, em relação ao trabalho de Giuliano-Caetano, tenha sido baixa (1 exemplar *versus* 17 exemplares).

Quanto à população de *R. latirostris* do rio Passa Cinco, dos quatro citótipos descritos por Giuliano-Caetano, somente o citótipo com $2n=46$ cromossomos foi encontrado, com uma amostragem significativa (13 exemplares contra 8 exemplares na tese de Giuliano-Caetano). O presente trabalho confirma os dados encontrados por Giuliano-Caetano (1998) sobre a constituição cariotípica de parte das populações, posição das RONS e padrão de heterocromatina nas duas populações de *R. latirostris*, além das RONS heteromórficas encontradas na população do rio Passa Cinco.

Alves *et al.* (2003) já haviam descrito o cariótipo de *Rineloricaria* sp. n. proveniente do rio Betari. Esses autores também encontraram número diplóide

equivalente a 70 cromossomos, mas descreveram uma constituição cariotípica de $2sm + 68a$, ou seja, diferente daquela descrita no presente trabalho, cujo cariótipo é constituído por $70st/a$. O par portador das RONS, considerado aqui como um par de cromossomos do tipo subtelocêntrico e no trabalho de Alves *et al.* (2003) como um par de cromossomos do tipo submetacêntrico, apresentou uma constrição secundária no trabalho de Alves *et al.* (2003). O fato de se levar em conta ou não esta constrição secundária pode explicar a diferença de resultados na constituição cariotípica em ambos os trabalhos. O polimorfismo de tamanho das RONS, identificado no presente estudo para essa espécie, é também encontrado no trabalho de Alves *et al.* (2003), e esse polimorfismo é facilmente notado na ilustração do trabalho desses autores. Entretanto, esses autores não consideram tal caráter, tratando as RONS como homomórficas. Apesar de os autores não revelarem o tamanho de sua amostra e de no presente trabalho ter sido analisado somente um exemplar, é provável que ambos os trabalhos tenham analisado a mesma espécie, pois as características de localidade e cariotípicas são muito parecidas.

Apesar de o número diplóide de 62 cromossomos com constituição cariotípica de $2sm + 60st/a$, descrito no presente trabalho, já ter sido descrito por Maia *et al.* (2010), a espécie analisada por esses autores (*R. cadeae*) é diferente da espécie aqui analisada, pois, segundo Ferraris (2003), a localidade tipo de *R. cadeae* é a bacia hidrográfica de Lagoa dos Patos/RS, e a espécie do presente trabalho que apresenta essas características cromossômicas pertence à Bacia do Paraíba do Sul, em nada se assemelhando morfológicamente à espécie estudada por esses autores. Além disso, *R. cadeae* apresentou RONS localizadas no 9º par de cromossomos do complemento, enquanto *Rineloricaria* sp. 1 apresentou as RONS no 2º par. Maia *et al.* (2010) também encontram um número diplóide de 70 cromossomos, como também aqui encontrado para duas espécies de *Rineloricaria*, mas fórmulas cariotípicas diferentes são apresentadas em ambos os trabalhos. Além disso, *R. strigilata*, a espécie que apresentou

2n=70 cromossomos no trabalho desses autores, pertence a uma localidade tipo diferente das espécies do presente trabalho. O mesmo ocorre com Alves *et al.* (2003), que encontra um número diplóide de 64 cromossomos, mas, a exemplo do que aconteceu com *R. strigilata*, nem as fórmulas cariotípicas, nem a localidade tipo e tampouco a espécie se assemelha à espécie que apresenta 64 cromossomos no presente estudo.

Três espécies de *Rineloricaria* apresentam, de acordo com os dados da literatura e do presente trabalho, polimorfismos cromossômicos interpulacionais: *R. latirostris*, *R. pentamaculata* e *Rineloricaria* sp. n. (Giuliano-Caetano, 1998; Errero-Porto, 2007; Mendes-Neto, 2008; Maia *et al.*, 2010). Apesar de essas populações fazerem parte de um mesmo sistema hidrográfico, como a Bacia do Alto Paraná e a Bacia Ribeira do Iguape, elas estão isoladas geograficamente, já que são encontradas em pequenos tributários que compõem as cabeceiras dessas grandes bacias. É sabido que os representantes de *Rineloricaria* não são migradores, apresentando hábitos sedentários e habitando pequenos riachos com pouca profundidade e forte correnteza, geralmente arenosos ou com pedregulhos. Assim sendo, os rios de maior vazão que compõem essas bacias funcionam como barreiras para essas populações, isolando-as em rios de menor porte e facilitando a ocorrência de eventos de vicariância, podendo levar a um processo de especiação alopátrica e a um consequente endemismo.

Limeira *et al.* (2009) realizaram comparações de morfologia externa e aloenzimáticas entre duas populações de *R. pentamaculata* do Alto Paraná, isoladas geograficamente. Como resultado, os autores encontraram diferenças morfológicas e na frequência alélica dos dados polimórficos e explicaram que os morfotipos gerados podem indicar que haja duas espécies em *statu nascendi*. Os dados citogenéticos da literatura e os dados citogenéticos apresentados no presente trabalho para as diferentes populações de *R. latirostris*, *R. pentamaculata* e *Rineloricaria* sp. n., indicam que o

isolamento geográfico ao qual essas populações estão submetidas permitiu a elas acumularem diferenças cariotípicas significativas, durante todo o tempo de isolamento. Essas diferenças cariotípicas podem estar indicando que essas populações, a exemplo das populações analisadas no trabalho de Limeira *et al.* (2009), também estão passando por um processo de especiação.

Em 2007, Covain e Fisch-Muller propuseram que uma espécie de Loricariinae, a espécie *Hemiodontichthys acipenserinus*, compreenderia um “complexo de espécies”, devido à sua vasta distribuição geográfica e sua variação morfométrica. Em vista da variação cariotípica encontrada na literatura e no presente trabalho para as populações isoladas de *R. latirostris*, *R. pentamaculata* e *Rineloricaria* sp. n., pode ser proposta a existência de um “complexo de espécies” para as três unidades taxonômicas em questão, já que citótipos híbridos apresentando as formas intermediárias dessas variações não foram encontrados. Segundo Nelson (1999), um “complexo de espécies” ocorre quando duas ou mais espécies são colocadas sob uma mesma nomenclatura, devido à falta de características morfológicas ou quando a caracterização morfológica é incompleta para diferenciá-las, mas são comprovadamente isoladas reprodutivamente, contemplando o conceito biológico de espécie. Os “complexos de espécies” são geralmente caracterizados por variações moleculares e cariotípicas, principalmente pela presença de números cromossômicos diferentes (Kavalco, 2008).

Em peixes, exemplos de “complexos de espécies” reforçados por dados citogenéticos e moleculares são frequentemente observados em diferentes ordens, sendo alguns desses exemplos relatados a seguir. No gênero *Astyanax*, um peixe típico de ambientes de cabeceira pertencente à Ordem Characiformes, ao menos três grupos a formarem um “complexos de espécies” são identificados e os números diplóides e as constituições cariotípicas são variáveis: *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo,

1991), *A. fasciatus* (Justi, 1993; Pazza *et al.*, 2006) e *A. altiparanae* (Fernandes e Martins-Santos, 2004).

Em 1997, Campos-da-Paz propuseram, com base em caracteres morfométricos e merísticos, que três espécies da Ordem Gymnotiformes (*Eigenmannia virescens*, *Eigenmannia trilineata* e *Eigenmannia microstoma*) constituiriam “complexos de espécies”. Anos mais tarde, Moyses *et al.* (2009) corroboraram a existência desses complexos, baseando-se em dados de números cromossômicos, ocorrência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados e perfil de ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), além de contribuírem para uma melhor identificação das espécies que constituem esses complexos.

Entre os Siluriformes, estudos moleculares e citogenéticos reforçam a ideia da possível ocorrência de um “complexo de espécies” no heptapterídeo *Rhamdia quelen* (Garcia, 2009). Em outro heptapterídeo, *Pimelodella chagresi*, diferenças moleculares em genes mitocondriais, associadas a diferenças morfológicas, sugeriram que esta espécie também constituiria, em tese, um “complexo de espécies” (Martin e Bermingham, 2000).

Assim sendo, revisões taxonômicas nas populações de *R. latirostris* e *R. pentamaculata*, bem como uma maior atenção na descrição da nova espécie da Bacia do Ribeira do Iguape, se fazem necessárias frente às especulações aqui apresentadas quanto às variações cariotípicas interpopulacionais encontradas nessas espécies. Entretanto, caso as análises morfométricas por variáveis canônicas não forneçam resultados que levem a uma diagnose e caso essas populações sejam de fato unidades taxonômicas diferentes, é possível que se trate de espécies crípticas, e, nesse caso, a associação de caracteres morfológicos, citogenéticos e moleculares será necessária para sua identificação. Segundo Martin e Bermingham (2000), a falta de divergência fenotípica entre populações isoladas pode indicar uma forte seleção estabilizadora ou algum tipo

de canalização do desenvolvimento, fundamental a expressão de traços morfológicos, ou ainda, reflete que a distinção entre essas populações é sutil e requer uma investigação cautelosa na detecção de diferenças significativas.

Variações cariotípicas intrapopulacionais já foram relatadas em espécies de *Rineloricaria*. Enquanto Giuliano-Caetano (1998) encontrou de quatro a seis números diplóides diferentes em populações de *R. latirostris*, sugerindo uma marcante participação de eventos de fusão e fissão cromossômica como causa dessas variações, Errero-Porto (2007) encontrou, em uma população de *R. pentamaculata*, duas fórmulas cariotípicas ($8m/sm + 48st/a$ e $9m/sm + 47st/a$) e propôs que uma fusão cêntrica entre um acrocêntrico médio e um acrocêntrico grande teria gerado fragmentos cênicos, formando o par heteromórfico e cromossomos supranumerários. Dos três citótipos encontrados no presente trabalho para a população que representa a espécie *Rineloricaria* sp. 2, nenhum apresentou um citótipo híbrido que representasse as formas intermediárias dos outros dois. Os exemplares que possuem o citótipo C podem pertencer na verdade a *Rineloricaria* sp. 3, pois seus cariótipos estão mais relacionados com o cariótipo desta espécie, já que ambos apresentam o mesmo número diplóide ($2n=62$), a mesma fórmula cariotípica ($6m + 2sm + 54st/a$) e as RONS localizadas na mesma posição (braço curto do 5º par em posição terminal). Quanto ao citótipo A, este é idêntico aos citótipos das populações A e B de *Rineloricaria* sp. 1 e, seguindo o mesmo raciocínio imposto aos representantes do citótipo C, pode ser que esse indivíduo seja um representante de *Rineloricaria* sp. 1. Já o citótipo B pode ser uma variante dentro da espécie à qual pertence o citótipo A e, como o número diplóide se mantém constante nesses dois citótipos, essa variação pode ter sido gerada por uma inversão pericêntrica. Além disso, essa variação poderia estar relacionada ao sexo, pois duas fêmeas possuem o citótipo B e um macho o citótipo A. Entretanto, a hipótese da variação sexo-específica será refutada caso esses exemplares sejam de fato pertencentes

à espécie *Rineloricaria* sp. 1, já que os exemplares das demais populações não apresentam variações entre os sexos.

Os dois citótipos que apresentaram variações cromossômicas numéricas na população A de *Rineloricaria* sp. n. também podem indicar tratar-se de espécies diferentes, já que um número alto (33 indivíduos) foi amostrado e não foi encontrada nenhuma forma cariotípica intermediária desses dois citótipos. O citótipo B dessa população é idêntico ao citótipo da população B de *Rineloricaria* sp. n., à exceção da localização das RONS. Já o citótipo A apresenta maiores semelhanças com o cariótipo descrito para a espécie *Rineloricaria* sp. 5, e, a despeito do par heteromórfico encontrado nesse citótipo, a presença de um par de cromossomos metacêntricos médios e as características de localização das RONS são comuns aos dois cariótipos. Esse par heteromórfico pode ter sido originado por meio de uma inversão pericêntrica em um cromossomo subtelocêntrico/acrocêntrico grande num cariótipo ancestral com $2m + 66st/a$, não apresentando qualquer desvantagem evolutiva para os indivíduos que apresentam este citótipo, já que nenhum cariótipo sem esse par heteromórfico foi encontrado entre os representantes portadores do citótipo A nessa população.

A variabilidade cromossômica funciona como um eficiente substrato para novidades evolutivas, podendo resultar em evolução adaptativa, no caso de haver diferenças de adaptabilidade, ou levar à diferenciação populacional, caso essas diferenças atuem como uma barreira ao fluxo gênico. Para John e Lewis (1979), o tipo de seleção existente na produção do polimorfismo cromossômico é a seleção disruptiva, pois divide uma população em classes distintas, cada uma com um potencial adaptativo diferente, podendo levar a uma especiação simpátrica. Descrições taxonômicas detalhadas nas espécies *Rineloricaria* sp. 1, 2, 3 e 5, bem como o estudo das relações evolutivas entre elas, poderão confirmar as sugestões apresentadas nos dois parágrafos anteriores. Se isso for confirmado, ficará claro que espécies diferentes de *Rineloricaria*

podem coexistir em simpatria e sintopia, e que a diferenciação citogenética pode estar funcionando com um isolamento reprodutivo nessas espécies.

O heteromorfismo de tamanho no primeiro par do complemento cromossômico de *Rineloricaria latirostris* é acentuado e pode ter se originado por um *crossing-over* desigual ou ainda por meio de duplicações e/ou deleções gênicas, sendo descartada a hipótese de acúmulo de heterocromatina, já que o par cromossômico em questão possui blocos heterocromáticos em posição pericentromérica.

O padrão de heterocromatina encontrado nas espécies de *Rineloricaria* analisadas no presente trabalho é o mesmo encontrado em outras espécies do gênero que tiveram seus cariótipos submetidos à técnica de bandeamento C, com marcações pericentroméricas em quase todos os cromossomos. A heterocromatina constitutiva é um tipo de cromatina constituída principalmente por DNA altamente repetitivo e, entre os eucariontes, os segmentos heterocromáticos estão localizados preferencialmente ao redor dos centrômeros, nas RONS e nos telômeros (Burns e Bottino, 1989). Conforme Guerra (1988), uma das principais características da heterocromatina é a ausência de atividade gênica. Os dados da literatura e os dados do presente trabalho apresentaram, para todas as espécies de *Rineloricaria* analisadas, grandes blocos heterocromáticos nas RONS, que confirmaram sua atividade gênica devido à impregnação do nitrato de prata. Assim sendo, a heterocromatina constitutiva das espécies de *Rineloricaria* pode estar entre os genes ribossomais, e seu constante estado de condensação pode levar a uma futura inativação desses genes, demonstrando um papel de extrema importância na organização do genoma e na evolução desses peixes.

A presença de RONS em posição terminal é provavelmente uma característica ancestral na Ordem Siluriformes (Oliveira e Gosztonyi, 2000). RONS em posição terminal, geralmente encontradas no braço curto dos maiores cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos do complemento, é uma característica comum a quase

todas as 13 espécies de *Rineloricaria* caracterizadas citogeneticamente (7 na literatura e 6 no presente trabalho), indicando ser esta uma tendência no gênero. A exceção fica por conta de *R. latirostris* que, de todas as populações estudadas, somente a população pertencente ao rio São Francisco (Mendes-Neto, 2008) apresentou RONS em posição terminal. Errero-Porto (2007) observa que o número diplóide de *R. latirostris* ($2n=36$ a $2n=48$) é bem menor quando comparado às outras espécies de *Rineloricaria* ($2n=56$ a $2n=70$). A autora observa ainda, em relação às espécies de *Rineloricaria*, que a ocorrência de RONS em posição intersticial é uma característica encontrada somente em *R. latirostris*, e sugere que essas duas características possam ser utilizadas como marcadores espécie-específicos, auxiliando na identificação desta espécie. O trabalho de Mendes-Neto (2008) poderia descartar a proposta de marcadores espécie-específicos, não fosse o fato de a população que ele denomina como *R. latirostris* ser na verdade uma espécie nova de *Rineloricaria* que está sendo descrita para o rio São Francisco (para maiores informações sobre a nova espécie, ver Fichberg, 2008).

Um único caso de RONS múltiplas no gênero *Rineloricaria* foi relatado em uma população de *R. pentamaculata* (Errero-Porto, 2007). Nos demais estudos da literatura e no presente trabalho, as RONS foram simples e, em alguns casos, houve um heteromorfismo de tamanho acentuado. Os polimorfismos de tamanho das RONS podem ser gerados por um *crossing-over* desigual, por meio de duplicações e/ou deleções gênicas ou pela inativação de parte do *cluster* do gene ribossomal DNAr 18S e, segundo Foresti *et al.* (1981) e Almeida-Toledo *et al.* (2000), eles são muito comuns em peixes neotropicais.

As variações de tamanho das RONS, encontradas na população de *R. cf. nigricauda*, podem indicar a viabilidade de dois tipos em detrimento de um terceiro. Digamos que, em relação a este fenótipo, os indivíduos que apresentem RONS de tamanho heteromórfico sejam heterozigotos, enquanto que os indivíduos com RONS

homomórficas de tamanho grande e pequeno sejam os homozigotos dessa população em relação a este caráter. Como só foram encontradas as formas heterozigotas e homozigotas de tamanho menor, numa proporção de 1:1, é possível que indivíduos que carreguem em ambos os homólogos a RON de tamanho maior apresentem uma desvantagem em relação aos outros dois fenótipos, nessa população. Na população B de *R. latirostris*, as três formas são encontradas, tanto no presente trabalho quanto no trabalho de Giuliano-Caetano (1998), indicando que as formas heterozigotas e homozigotas de tamanho grande e pequeno são viáveis nesse caso.

Vicari *et al.* (2003), estudando o cariótipo de uma população de *Hoplias malabaricus* coletada no Rio Iguaçu, identificaram três fenótipos referentes ao acúmulo de heterocromatina associada às RONs em um dos pares de cromossomos portadores do DNAr 45S no cariótipo daquela espécie, definindo os fenótipos como rr (homomórfico com bandas reduzidas), dd (homomórfico com bandas duplicadas) e rd (condição heteromórfica). Ao analisarem as frequências desses fenótipos, os autores descobriram que a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim sendo, uma maior amostragem nas populações que representam as espécies *R. latirostris* e *R. cf. nigricauda* no presente estudo e que leve em consideração a frequência de cada um dos fenótipos acima citados, a fim de se testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nessas populações, poderá confirmar as possíveis vantagens ou desvantagens evolutivas que esses fenótipos possam estar oferecendo para os indivíduos que os possuem.

Em vários organismos, o arranjo dos cromossomos, nas preparações em que as metáfases são espalhadas em lâminas de vidro, não se dá ao acaso. Muitos cromossomos não-homólogos participam desse arranjo não randômico, formando configurações radiais (Nur, 1973). Configurações radiais envolvendo cromossomos acrocêntricos não-homólogos têm sido observadas em metáfases de espécies de peixes marinhos (Aguilar *et al.*, 1998; Molina e Galetti Jr., 2002) que, do mesmo modo que as

espécies de *Rineloricaria*, apresentam vários cromossomos acrocêntricos em sua constituição cariotípica. As associações cromossômicas envolvendo cromossomos acrocêntricos não-homólogos encontradas no presente trabalho, são observadas nas metáfases de todas as espécies aqui estudadas, formando às vezes duas ou mais configurações radiais numa mesma metáfase. Os segmentos heterocromáticos encontrados próximos às regiões centroméricas dos cromossomos envolvidos em tal associação podem estar favorecendo essa configuração. Cromossomos não-homólogos ligados por meio da heterocromatina durante os ciclos mitóticos e meióticos podem ser observados em peixes, mamíferos, plantas e até mesmo fungos (Yunis e Yasmineh, 1971; Aguilar *et al.*, 1998). As configurações radiais, encontradas com certa frequência no presente trabalho, podem ter um significado evolutivo importantíssimo na história da diversificação cariotípica do gênero *Rineloricaria*, pois, de acordo com Aguilar *et al.* (1998), este fenômeno pode estar facilitando a ocorrência de translocações Robertsonianas.

Os rearranjos Robertsonianos são uma das principais fontes de variação cromossômica em diversos grupos de vertebrados. A evidente correlação entre o aumento do número diplóide, o aumento no número de cromossomos com um braço e a diminuição no número de cromossomos com dois braços, deixa clara a participação dos rearranjos Robertsonianos como o principal processo gerador dessa notável variação numérica encontrada em *Rineloricaria*. Entretanto, fica a dúvida sobre qual seria o cariótipo ancestral de *Rineloricaria* ou se o gênero vem passando por uma redução ou por um aumento no número diplóide.

Técnicas avançadas de citogenética podem confirmar e ordenar os eventos de rearranjos Robertsonianos, indicando se o cariótipo do clado estudado sofreu fusões ou fissões cêntricas ao longo de sua evolução. Uma dessas técnicas é a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de sequências teloméricas, que pode evidenciar, caso

ocorra fusão cêntrica, Sequências Teloméricas Intersticiais (ITSs) inativadas próximas ao centrômero. Das espécies de *Rineloricaria* que tiveram sondas de sequências teloméricas hibridadas nos cromossomos de suas metáfases, somente a população A de *R. latirostris* apresentou marcações pericentroméricas em um par de metacêntricos, o que pode indicar a ocorrência de fusão cêntrica no citótipo dessa população. Porém, esse resultado não descarta a ocorrência de fusões cêntricas ou *in tandem* na população B de *R. latirostris*, nas populações das demais espécies submetidas à técnica, bem como a ocorrência de outras fusões cromossômicas não detectadas na população A, pois, os eventos de fusão podem ter sido tão antigos que a própria inativação das ITSs levou à sua eliminação. Além disso, a eliminação de sequências teloméricas na extremidade cromossômica pode contribuir para a fusão cromossômica, não sendo possível, portanto, identificar as ITSs. Estudos com mamíferos indicaram que as ITSs associadas à heterocromatina podem estar relacionadas a um componente de DNA satélite, e não ser o resultado de uma fusão recente (Metcalf *et al.*, 2004). Considerando que o par que apresentou a ITS em região pericentromérica apresentou também blocos heterocromáticos nessa mesma região, é possível que essa marcação não seja evidência de um rearranjo recente.

Quando se sobrepõe num mapa hidrográfico os números diplóides encontrados na literatura e no presente trabalho para o gênero *Rineloricaria*, é possível observar que as espécies da região costeira apresentam um número diplóide maior que 60 cromossomos, enquanto que as espécies das drenagens que correm para o interior do continente apresentam um número diplóide abaixo de 60 cromossomos (Figura 3.11). É possível notar no mapa que, no limiar dessa variação, está a Serra do Mar, e, em relação às espécies pertencentes à Bacia do Alto Paraná, quanto mais distantes elas estão da Serra do Mar, menor o número diplóide. Além disso, note-se que, quanto maior a distância entre as populações amostradas, maiores as diferenças no número diplóide.

A variação de número diplóide nas drenagens do Leste é bem menor que as variações encontradas no Alto Paraná, com uma variação de 60 a 70 cromossomos nas drenagens do Leste contra 36 a 58 cromossomos no Alto Paraná. Essa diferença nas variações de número diplóide nos dois sistemas hidrográficos pode ser explicada pela idade geológica das duas bacias. Enquanto que a conformação atual das drenagens do Leste data de 300 mil anos (Menezes, 1988; Weitzman *et al.*, 1988), as drenagens que compõem o Alto Paraná, bem como toda a conformação da Bacia do Paraná conhecida atualmente, data do Terciário, ou seja, há cerca de 65 milhões de anos (Lundberg *et al.*, 1998). Como algumas espécies encontradas nas drenagens do Leste foram isoladas geograficamente bem mais recentemente, possivelmente o tempo de isolamento não tenha sido suficiente para que estas espécies acumulassem diferenças cariotípicas mais significativas, podendo explicar até o mesmo número diplóide encontrado em espécies diferentes de *Rineloricaria* pertencentes a estas drenagens, como apresentado no presente trabalho.

As conexões pretéritas entre o rio Tietê e as drenagens costeiras pela conformação antiga do vale do rio Paraíba, ou por meio de eventos de captura de cabeceiras como o ocorrido entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (Ab'Saber, 1998; Malabarba, 1998; Castro *et al.*, 2003), foram provavelmente responsáveis pela distribuição das espécies de *Rineloricaria* na Bacia do Paraíba do Sul, na Bacia Ribeira de Iguape, nas drenagens litorâneas menores e em toda a Bacia do Paraná. Essas conexões foram rompidas devido, principalmente, aos soerguimentos que resultaram na Serra do Mar, no Terciário, e na Serra da Mantiqueira, no Quaternário, bem como as variações de nível do mar durante os últimos 300 mil anos, promovendo um importante isolamento geográfico na diversificação dessas espécies.

Dessa forma, podemos propor que dois grupos naturais de *Rineloricaria* são formados para essas bacias, conforme as suas características citogenéticas: o primeiro

grupo é composto pelas espécies com número diplóide abaixo de 60 cromossomos pertencentes às drenagens que correm para o interior do continente; o segundo grupo é composto pelas espécies com número diplóide acima de 60 cromossomos que pertencem às drenagens que correm diretamente para o Atlântico. Fichberg (2008) faz uma análise filogenética com base em dados morfológicos em 36 espécies de *Rineloricaria*, representantes das principais drenagens da América do Sul, inclusive das bacias estudadas no presente trabalho e, embora recupere o gênero como monofilético, não resolve as relações estabelecidas dentro do gênero, não sendo visualizado nenhum grupo natural que se assemelhe à conformação dos grupos propostos no presente trabalho. Assim sendo, o reconhecimento desses grupos como grupos naturais só será confirmado ou refutado com outras análises filogenéticas no gênero, com um maior número de espécies compondo essas análises e com mais dados sendo utilizados como suporte na geração das hipóteses filogenéticas.

Na tentativa de entender as tendências evolutivas que geraram essa diversidade cariotípica no gênero e com base no que foi aqui considerado, podemos imaginar vários cenários e propor quatro modelos evolutivos. No primeiro modelo evolutivo, uma espécie apresentando um cariótipo ancestral intermediário a essas variações numéricas, com número diplóide entre 58 e 62 cromossomos (muito parecido com os cariótipos da população de *R. pentamaculata* e da espécie *Rineloricaria* sp. 1, estudadas no presente trabalho), teria sua população inicial dividida em duas populações, devido aos soerguimentos que resultaram na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira, e essas duas populações teriam originado outras espécies dentro de seus novos sistemas hidrográficos, havendo um aumento de número diplóide para as espécies da região costeira, e uma redução de número diplóide para as espécies do Alto Paraná.

No segundo modelo evolutivo, uma espécie com um cariótipo ancestral em um dos extremos dessa variação numérica, com número diplóide de 70 cromossomos

(muito parecido com os cariótipos das espécies *R. cf. nigricauda* e *Rineloricaria* sp. n., estudadas no presente trabalho) teria populações distribuídas por toda a região costeira, e, através da conexão entre o rio Tietê e o rio Paraíba do Sul, algumas populações teriam invadido o Alto Paraná (e, por conseguinte, todo o sistema La Plata-Uruguai-Paraná-Paraguai e a Bacia Amazônica). Devido ao isolamento geográfico imposto a essas populações posteriormente, elas teriam evoluído dentro de seus próprios sistemas hidrográficos, acumulando diferenças cariotípicas resultantes da redução do número diplóide. Esse segundo modelo evolutivo está de acordo com a proposta de dispersão dos peixes de água doce da América do Sul feita por Lowe-McConnel (1975), já que, segundo o autor, muitos peixes chegaram à Amazônia, provenientes dos sistemas La Plata-Uruguai-Paraná-Paraguai, por meio de rotas migratórias entre os riachos de terras altas no Mato Grosso (afluentes do rio Paraguai) e tributários do Guaporé (afluente do Amazonas), durante o início da formação da bacia Amazônica.

Num terceiro modelo evolutivo, uma espécie com um cariótipo ancestral no outro extremo dessa variação numérica, com número diplóide de 36 cromossomos (muito parecido com o cariótipo de uma das populações de *R. latirostris*, estudada no presente trabalho) teria populações pertencentes às bacias hidrográficas da região centro-oeste que teriam invadido o Alto Paraná quando a Bacia do Paraná estabelecia conexões com as bacias hidrográficas mais ao norte, e essas populações teriam se espalhado por toda a Bacia do Paraná e por toda a região costeira (através da conexão entre o rio Tietê e o rio Paraíba do Sul), com essa distribuição sendo seguida pelo aumento do número diplóide. Para Menezes (1972), a Amazônia apresenta-se como o berço dispersor da atual ictiofauna das grandes bacias da América do Sul, e o terceiro modelo evolutivo aqui proposto é corroborado por essa premissa.

Finalmente, num quarto modelo evolutivo, não é possível imaginar um cariótipo ancestral, e o aumento e a diminuição do número diplóide teria acontecido várias vezes, gerando toda essa variação no gênero.

A estabilidade na macroestrutura cariotípica, encontrada em algumas famílias de peixes da Ordem Characiformes tais como Curimatidae (Venere e Galetti Jr., 1989) e Chilodontidae (Venere *et al.*, 1994), pode ser explicada pela alta mobilidade encontrada nesses grupos de peixes, pois esse tipo de mobilidade possibilita a esses grupos uma ampla distribuição geográfica, além da capacidade de se espalharem por todo um sistema hidrográfico (Bickman e Baker, 1979), e as alterações cromossômicas ocorridas nesses peixes podem se perder mais rapidamente da população (Martins, 1997). De modo contrário, mecanismos cromossômicos de especiação parecem prevalecer em organismos de mobilidade restrita (*Rineloricaria*, por exemplo), em que a população local consiste em demes que persistem na mesma área por muitas gerações (White, 1969, 1978). Contudo, seja qual for o modelo evolutivo que mais se aproxima do que realmente aconteceu com as espécies de *Rineloricaria* do Alto Paraná e das drenagens do Leste, uma coisa podemos afirmar: os rearranjos Robertsonianos tiveram uma participação significativa na diversificação cariotípica deste gênero, e a baixa mobilidade encontrada entre as populações de suas espécies favoreceu a fixação dessas diferenças cariotípicas.

Com os resultados citogenéticos apresentados no presente estudo para o gênero *Rineloricaria*, o número de espécies do gênero estudadas citogeneticamente quase dobrou pois, das nove espécies aqui analisadas, seis nunca passaram por qualquer caracterização citogenética. Além disso, citótipos diferentes daqueles que já foram descritos para *R. pentamaculata* e para *Rineloricaria* sp. n. da Bacia do Ribeira do Iguape, são apresentados no presente trabalho. A incrível variação de número diplóide defendida na literatura é aqui reforçada, com a descrição de novos números diplóides,

tais como 58 e 68 cromossomos (*R. pentamaculata*, *Rineloricaria* sp. 5 e *Rineloricaria* sp. n.), bem como novas fórmulas cariotípicas, como por exemplo $6m + 58st/a + 70st/a$ (*Rineloricaria* sp. 4, *Rineloricaria* sp. n. e *Rineloricaria* cf. *nigricauda*).

As espécies pertencentes à Bacia do Paraíba do Sul e às pequenas drenagens do litoral do Rio de Janeiro e do litoral paranaense, estão sendo analisadas citogeneticamente pela primeira vez. Os resultados citogenéticos obtidos para essas bacias, principalmente a primeira, apresentam-se como ferramentas taxonômicas úteis para colaborarem na descrição do neótipo do gênero, já que uma das espécies aqui estudadas, *R. nigricauda*, é uma das candidatas a compor esse neótipo (Fichberg, 2008).

Em suma, os dados aqui apresentados corroboram a proposta já apresentada na literatura de que os rearranjos Robertsonianos marcaram a história evolutiva do gênero *Rineloricaria*, além de contribuir com novos números diplóides, que ainda não foram descritos na literatura e que só intensificam a variação cariotípica típica do gênero. Além disso, novos caracteres citogenéticos são associados, no presente trabalho, a marcadores espécie-específicos, e a primeira proposta da ocorrência de “complexos de espécies” no gênero foi aqui apresentada. O presente trabalho ressaltou ainda a importância taxonômica dos dados citogenéticos na resolução de conflitos taxonômicos encontrados no gênero e propôs modelos evolutivos importantes que podem direcionar o caminho histórico da variação cariotípica de *Rineloricaria*, associando-a a biodiversidade e à ecologia do gênero, bem como à história geológica das bacias aqui estudadas.

Figura 3.1: Cariótipos de *R. latirostris* corados com Giemsa. A: População A. B: População B. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS.

Figura 3.2: Cariótipo de *R. pentamaculata* corado com Giemsa (A). Cariótipo corado com Giemsa das populações A e B de *Rineloricaria* sp. (B). Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies.

Figura 3.3: Cariótipos corados com Giemsa de *Rineloricaria* sp. 2. Em A: Citótipo A. Em B: Citótipo B. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambos os citótipos.

Figura 3.4: Em A: Citótipo C corado com Giemsa de *Rineloricaria* sp. 2. Em B: Cariótipo corado com Giemsa de *Rineloricaria* sp. 3. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies.

Figura 3.5: Cariótipo de *Rineloricaria* sp. 4 corado com Giemsa (A). Cariótipo de *Rineloricaria* sp. 5 corado com Giemsa (B). Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies.

Figura 3.6: Cariótipos de *Rineloricaria* sp. n. corado com Giemsa. A: Citótipo A da população A. B: Citótipo B da população A. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambos os citótipos.

Figura 3.7: Em A: Cariótipo corado com Giemsa da população B de *Rineloricaria* sp. n. Em B: Cariótipo de *R. cf. nigricauda* corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS, em ambas as espécies. Destaque também para as RONS heteromórficas em b' e homomórficas b'', encontradas na população da espécie *R. cf. nigricauda*.

Figura 3.8: Metáfases somáticas submetidas ao bandamento C em A: População A de *R. latirostris*, B: População B de *R. latirostris*, C: *R. pentamaculata*, D: População A de *Rineloricaria* sp. 1, E: População B de *Rineloricaria* sp. 1, F: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, G: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, H: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2, I: *Rineloricaria* sp. 3, J: *Rineloricaria* sp. 4, K: *Rineloricaria* sp. 5, L: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n., M: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n., N: População B de *Rineloricaria* sp. n., O: *R. cf. nigricauda*.

Figura 3.8: Metáfases somáticas com sondas teloméricas em A: População A de *R. latirostris*, B: População B de *R. latirostris*, C: População A de *Rineloricaria* sp. 1, D: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, E: *Rineloricaria* sp. 4, F: *Rineloricaria* sp. 5, G: População B de *Rineloricaria* sp. n. e H: *R. cf. nigricauda*. Em A, as setas indicam as ITSs encontradas no cariótipo da população A de *R. latirostris*.

Figura 3.9: Metáfases somáticas de A: População A de *R. latirostris*, B: *R. pentamaculata*, C: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, D: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, E: *Rineloricaria* sp. 3, F: *Rineloricaria* sp. 5, G: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n. e H: *R. cf. nigricauda*. As setas indicam as associações cromossômicas que estabelecem a configuração radial.

Figura 3.10: Metáfases somáticas submetidas ao bandeamento C em A: *R. pentamaculata* e B: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n. As setas indicam blocos heterocromáticos conspícuos próximos às regiões centroméricas dos cromossomos envolvidos na configuração radial.

Figura 3.11: Mapa hidrográfico com a distribuição geográfica dos números diplóides encontrados para o gênero *Rineloricaria*. Os algarismos em preto representam os números diplóides encontrados na literatura. Os algarismos em vermelho representam os números diplóides descritos no presente trabalho.

Capítulo II

Caracterização cromossômica de *Harttia*, *Loricaria* e *Loricariichthys* (Siluriformes, Loricariidae): considerações sobre a evolução cariotípica de Loricariinae.

Palavras-chave: ITSs, rearranjos Robertsonianos, inversões pericêntricas, diversificação cariotípica.

Abstract

Loricariinae are Siluriformes highly derivative and represent the second largest subfamily of Loricariidae with about 210 species. Members of Loricariinae are recognized by their long and flattened caudal peduncle and absence of an adipose fin. These animals have a successful adaptive radiation, with representatives in Costa Rica, Panama and throughout South America, and species occurring on both sides of the Andes. Although it represents a monophyletic group, the cytogenetic data indicate that the subfamily Loricariinae is presented as a diverse and heterogeneous group, with the diploid number ranging from $2n = 36$ chromosomes in *Rineloricaria latirostris* to $2n = 74$ chromosomes in *Sturissoma* cf. *nigrirostrum*. In this study, cytogenetic analysis were used in samples *Harttia* sp. n., *Loricaria prolixa* and *Loricariichthys platymetopon* from the Upper Paraná Basin in order to provide a comparative chromosomal analysis with other species belonging to these three genera that have been characterized cytogenetically. The results indicate that *Harttia* has presented an interesting karyotypic diversity, but the species *Loricaria* and *Loricariichthys* did not demonstrate a marked chromosome variation. ITSs (Interstitial Telomeric Sequences) identified in pericentromeric region on seventh and thirteenth pairs of chromosome complement of

populations of *Loricaria prolixa* point out that these chromosome pairs may have been the result of a centric fusion and tandem fusion, respectively. Hypotheses related to the karyotypic diversification of the subfamily are discussed in this work.

Resumo

Os loricariíneos são Siluriformes altamente derivados e representam a segunda maior subfamília de Loricariidae com cerca de 210 espécies. Os membros de Loricariinae são reconhecidos por seu longo e achatado pedúnculo caudal e pela ausência da nadadeira adiposa. Esses animais apresentam uma irradiação adaptativa bem sucedida, com representantes na Costa Rica, no Panamá e em toda a América do Sul, e espécies ocorrendo em ambos os lados dos Andes. Embora represente um grupo monofilético, os dados citogenéticos indicam que a subfamília Loricariinae apresenta-se como um grupo heterogêneo e diversificado, com o número diplóide variando de $2n=36$ cromossomos em *Rineloricaria latirostris* a $2n=74$ cromossomos em *Sturissoma* cf. *nigrirostrum*. No presente trabalho, análises citogenéticas foram empregadas em amostras de *Harttia* sp. n., *Loricaria prolixa* e *Loricariichthys platymetopon* coletadas na Bacia do Alto Paraná com o objetivo de fornecer uma análise cromossômica comparativa com outras espécies pertencentes a esses três gêneros em que já foram caracterizadas citogeneticamente. Os resultados indicam que *Harttia* vem apresentando uma interessante diversidade cariotípica, mas espécies de *Loricaria* e *Loricariichthys* não demonstram ter uma variação cariotípica acentuada. As ITSs (Sequências Teloméricas Intersticiais) identificadas em região pericentromérica no sétimo e no 13º pares do complemento cromossômico das populações de *Loricaria prolixa* apontam que esses pares cromossômicos podem ter sido o resultado uma fusão cêntrica e uma fusão in tandem, respectivamente. Hipóteses relacionadas à diversificação cariotípica da subfamília são discutidas no presente trabalho.

Introdução

A ictiofauna da região Neotropical é a mais diversificada do mundo com cerca de 4500 espécies descritas das quase 13000 espécies de peixes de água doce conhecidas (Reis *et al.*, 2003; Nelson, 2006). Essa diversidade taxonômica pode ser explicada pelas complexas drenagens localizadas na América do Sul e suas interessantes histórias geológicas (Ribeiro, 2006).

Os Siluriformes compõem a terceira maior ordem de peixes com 36 famílias, 477 gêneros e 3088 espécies distribuídas por todos os continentes, inclusive na Antártica, na qual é representada pela forma fóssil do gênero *Hypsidoris* (Nelson, 2006; Ferraris, 2007). Essa ordem de peixes representa cerca de 35% do total das espécies de peixes neotropicais, com 1647 espécies descritas (Reis *et al.*, 2003).

Loricariidae é a maior família de Siluriformes e uma das maiores dentre todas as famílias de peixes do mundo (Nelson, 2006), com 716 espécies distribuídas em 96 gêneros (Ferraris, 2007). Das seis subfamílias que compõem essa família, Loricariinae é a segunda maior com cerca de 210 espécies distribuídas em 30 ou 32 gêneros, dependendo da classificação de cada autor (Covain e Fish-Muller, 2007; Ferraris, 2007).

Os loricariíneos, conhecidos popularmente como cascudos-chinelo, são Siluriformes altamente derivados e apresentam uma irradiação adaptativa bem sucedida, com representantes na Costa Rica, no Panamá e em toda a América do Sul, e espécies ocorrendo em ambos os lados dos Andes (Covain e Fish-Muller, 2007; Ferraris, 2007). Essa subfamília difere dos outros loricariídeos por apresentar o pedúnculo caudal deprimido, ausência de nadadeira adiposa e o dimorfismo sexual expresso por odontódios hipertrofiados nas nadadeiras peitorais, na margem do focinho e área pré-dorsal, em machos maduros (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008).

Das cerca de 4500 espécies de peixes neotropicais, somente 15% tiveram alguma caracterização citogenética e, dessas espécies, 318 são Siluriformes. Entre os

loricariídeos, 124 espécies tiveram seus cariótipos estudados, representando 17% do total de espécies dessa família (Reis *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2007) e, apesar de Loricariinae incluir cerca de 210 espécies, apenas 20 passaram por alguma caracterização citogenética, representando seis gêneros da subfamília: *Brochiloricaria*, *Harttia*, *Loricaria*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* e *Sturisoma*. Apesar de incipientes, os dados citogenéticos disponíveis na literatura indicam que a subfamília Loricariinae apresenta-se como um grupo heterogêneo e diversificado (Artoni e Bertollo, 2001), com o número diplóide variando de $2n=36$ cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998), a $2n=74$ cromossomos em *Sturissoma* cf. *nigrirostrum* (Artoni e Bertollo, 2001).

Embora apresente uma expressiva diversidade cariotípica, a subfamília Loricariinae é um grupo monofilético, compartilhando sinapomorfias morfológicas e moleculares (Schaefer, 1987; Rapp Py-Daniel, 1997; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008). Neste capítulo serão apresentados aspectos citogenéticos de três gêneros de Loricariinae pertencentes à Bacia do Alto Paraná (*Harttia*, *Loricaria* e *Loricariichthys*) e o objetivo do presente estudo é fornecer uma análise cromossômica comparativa entre as espécies aqui estudadas e outras espécies pertencentes a esses três gêneros e que já foram caracterizadas citogeneticamente, na tentativa de formular hipóteses relacionadas à diversificação cariotípica da subfamília.

Materiais e Métodos

Foram analisados dois exemplares (um macho e uma fêmea) pertencentes a uma espécie nova de *Harttia* (*Harttia* sp. n.) coletados no rio Passa Cinco, município de Ipeúna/SP, Bacia do Alto Paraná. Essa nova espécie está sendo descrita pelo Dr. Osvaldo T. Oyakawa, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Foram

analisadas também três populações de *Loricaria prolixa*, todas pertencentes à Bacia do Alto Paraná, sendo elas: 1) população A, composta por duas fêmeas coletadas no Baixo Rio Pardo, no município de Terra Roxa/SP; 2) população B, composta por cinco fêmeas e três machos coletados no Alto Mogi-Guaçu, no município de Porto Ferreira/SP e 3) população C, composta por duas fêmeas e um macho coletados no Médio Mogi-Guaçu, no município de Descalvado/SP. Por fim, foram analisados 7 exemplares (três machos e quatro fêmeas) provenientes de uma população de *Loricariichthys platymetopon* coletada no Rio do Peixe, um afluente direto do Alto Paraná, no município de Mariápolis/SP.

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos seguiu-se o protocolo proposto por Gold *et al.* (1990), utilizando-se meio de cultura Hank's. Para estimular divisões mitóticas injetou-se uma solução de fermento biológico e açúcar no animal, numa proporção de 1:1. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. Para a determinação da distribuição da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica de Bandas C proposta por Sumner (1972). A identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) por impregnação de nitrato de prata seguiu a metodologia de Howell e Black (1980). A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) utilizando sonda de sequências teloméricas, a qual foi hibridada nos cromossomos das espécies analisadas a fim de identificarem possíveis ITSs (Sequências Teloméricas Intersticiais). Essa sonda foi obtida por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), na ausência de DNA molde, conforme as condições propostas por Ijdo *et al.* (1991), utilizando os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ e foi marcada com biotina-

dATP pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen®).

Resultados

Os dois exemplares de *Harttia* sp. n. apresentaram $2n=62$ cromossomos, com uma constituição cariotípica de $13m + 23sm + 16st + 10a$. As RONS localizaram-se em posição intersticial no braço curto, sendo proximal em relação ao centrômero do maior par de cromossomos do complemento cromossômico, que por sua vez apresentou-se como um par heteromórfico, formado pelo maior metacêntrico e pelo maior submetacêntrico do complemento. Esse polimorfismo característico do par foi gerado pelo heteromorfismo de tamanho que as RONS apresentaram, sendo a RON maior detectada no metacêntrico e a RON menor no submetacêntrico (figura 4.1a).

As bandas C-positivas foram localizadas na região pericentromérica da grande maioria dos cromossomos e marcações banda C+ conspícuas, em posição intersticial, próximas ao centrômero foram identificadas nos pares 8, 9, 17, 19, 20, 27 e 28. Além disso, o par 20 apresentou blocos heterocromáticos na altura mediana do braço longo e as RONS não se apresentaram como heterocromáticas (figura 4.1b). Quanto à hibridação *in situ* com sondas teloméricas, os dois exemplares apresentaram marcações terminais em todos os cromossomos, não tendo sido detectadas marcações intersticiais (figura 4.1c).

As três populações de *Loricaria prolixa* não apresentaram diferenças cariotípicas, apresentando um número diplóide de 62 cromossomos com constituição cromossômica dada por $14m + 8sm + 4st + 36a$. As RONS estiveram presentes no 12º par, o maior par de subtelocêntricos do complemento, no braço curto em posição terminal (figura 4.2a). Alguns cromossomos apresentaram grandes blocos heterocromáticos na região pericentromérica, e as RONS apresentaram-se

heterocromáticas (figura 4.2b). Em relação à hibridação *in situ* com sondas teloméricas, os exemplares das três populações apresentaram marcações terminais em todos os cromossomos do cariótipo e marcações intersticiais nas regiões pericentroméricas do menor par de metacêntricos e no menor par de subtelocêntricos do complemento cromossômico (figuras 4.2c e 4.4).

Todos os exemplares de *Loricariichthys platymetopon* apresentaram $2n=54$ cromossomos, com uma constituição cariotípica dada por $10m + 16sm + 8st + 20a$. As RONS foram identificadas em posição terminal no braço curto do par 14, o maior par de cromossomos do complemento cromossômico (figura 4.3a). Os blocos bandas C-positivos mostraram-se localizados preferencialmente nas regiões pericentroméricas da grande maioria dos cromossomos e as RONS apresentaram-se heterocromáticas (figura 4.3b). Quanto à hibridação *in situ* com sondas teloméricas, todos os exemplares apresentaram marcações terminais em todo cariótipo e não foram detectadas marcações intersticiais (figura 4.3c).

Discussão

O gênero *Harttia* é composto por 22 espécies distribuídas nas drenagens da Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e nas drenagens do Norte e do Sudeste do Brasil (Rapp Py-Daniel e Oliveira, 2001; Ferraris, 2007). Até o momento, três espécies foram analisadas citogeneticamente, apresentando uma significativa variação cariotípica: *H. carvalhoi* com $2n=52/53$ cromossomos ($18m + 18sm + 8st + 8a/17m + 18sm + 8st + 10a$) e um sistema de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados do tipo XX, XY_1Y_2 ; *H. kronei* apresentando $2n=58$ cromossomos ($40m/sm + 18st/a$); e *H. loricariformis*, para a qual já foi descrita uma variação cromossômica numérica interpopulacional de $2n=52$ cromossomos ($32m/SM + 20st/a$) e $2n=56$ cromossomos

(16m + 22sm + 10st + 8a) (Alves *et al.*, 2003; Kavalco *et al.*, 2005; Centofante *et al.*, 2006).

O número diplóide e a constituição cariotípica apresentada por *Harttia* sp. n. no presente trabalho, corroboram essa diversidade cariotípica do gênero, demonstrando que este grupo apresenta uma significativa variação em termos de número diplóide, no qual este pode variar de $2n=52$ a $2n=62$ cromossomos, sendo essa a segunda maior variação cromossômica numérica apresentada na subfamília Loricariinae, precedida somente pela variação observada para o gênero *Rineloricaria*.

Embora o número diplóide não seja constante para as diferentes espécies de *Harttia* já estudadas citogeneticamente, não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre número diplóide e constituição cariotípica para o gênero, como foi observado para o gênero *Rineloricaria*. Isso indica que tanto eventos de fissão e fusão cêntricas quanto inversões pericêntricas devem ter contribuído para a diversificação cariotípica do grupo.

Essa hipótese é também corroborada por outras duas características citogenéticas identificadas no gênero. A primeira delas se refere à presença de um sistema de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados do tipo XX, XY_1Y_2 , encontrado somente em *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e que, segundo os autores, teve uma origem independente nessa espécie a partir de fusões cêntricas entre cromossomos acrocêntricos de um cariótipo ancestral com $2n=54$ cromossomos.

A segunda característica se refere à variação na localização das RONS que as espécies desse grupo apresentam, uma vez que, apesar de todas as espécies analisadas terem RONS simples, elas aparecem em diferentes localizações nas espécies analisadas: em *H. carvalhoi* as RONS foram identificadas próximas ao centrômero, em posição intersticial no braço longo do maior cromossomo acrocêntrico do complemento, no 23º par (Centofante *et al.*, 2006); em *H. kronei* essas regiões foram localizadas em posição terminal no braço curto de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos de médio

tamanho, no 11º par do complemento; em uma das populações de *H. loricariformis* as RONS foram identificadas próximas ao centrômero, em posição intersticial no braço longo do maior cromossomo acrocêntrico do complemento, no 17º par (Alves *et al.*, 2003); na outra população de *H. loricariformis* as RONS foram identificadas em região terminal do braço curto do maior acrocêntrico do complemento, no 25º par (Kavalco *et al.*, 2005); e em *Harttia* sp. n. essas regiões foram identificadas próximas ao centrômero, em posição intersticial no braço curto do par heteromórfico, composto por um cromossomo metacêntrico e outro submetacêntrico (os maiores cromossomos do complemento cromossômico), no 1º par do complemento (presente trabalho). Essa variação na localização das RONS pode indicar, caso os cromossomos portadores dessas regiões, nas quatro espécies estudadas, sejam homeólogos, que inversões pericêntricas contribuíram para essa diferença na localização das RONS. Entretanto, não se pode descartar também a hipótese de que translocações ou transposições teriam contribuído para toda essa variação na localização das RONS.

Loricaria Linnaeus, 1758, foi o primeiro táxon a ser descrito na família Loricariidae, com a descrição da espécie *Loricaria cataphracta* (Isbrücker, 1981), tornando-se, por consequência, o gênero nominal da família Loricariidae e da subfamília Loricariinae. Embora mais da metade das espécies da subfamília Loricariinae tenham sido consideradas como pertencentes ao gênero *Loricaria* no passado, muitas foram transferidas para outros gêneros após uma revisão feita por Isbrücker (1981) no gênero. Atualmente, o gênero *Loricaria* é composto por 15 espécies distribuídas nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco, Paraguay, Paraná, e pequenos rios costeiros que drenam os escudos brasileiros e da Guiana (Thomas e Rapp Py-Daniel, 2008; Thomas e Pérez, 2010), e dessas, somente cinco tiveram seus cariótipos estudados.

Ainda que *Loricaria* tenha mais espécies estudadas citogeneticamente do que o gênero *Harttia*, é notório que o número diplóide entre as espécies de *Loricaria* não é muito variável. Enquanto *Loricaria* sp. 1 apresentou $2n=66$ cromossomos ($2m + 2sm + 62a$), *L. cataphracta* e *Loricaria* sp. 2, ambas do Rio Paraná, apresentaram $2n=64$ cromossomos, com esta última apresentando $10m + 6sm + 4st + 44a$ como constituição cariotípica, além de *L. prolixa* e *Loricaria* sp. 3 apresentarem $2n=62$ cromossomos. Em *L. prolixa*, enquanto a população do Rio Paraná apresentou $20m + 4sm + 38a$, as populações do Rio Pardo e do Rio Mogi apresentaram $14m + 8sm + 4st + 36a$ (Della-Rosa *et al.*, 1980; Scavone e Ferreira Julio, 1994; Roncati *et al.*, 1999; presente trabalho), e, provavelmente, duas inversões pericêntricas envolvendo um par de m/sm e um par de acrocêntricos na primeira população, ou envolvendo dois pares de st/a nas outras populações, deram origem a essa variação. Quanto às RONS, essas se localizaram em posição terminal no braço curto do maior cromossomo subtelocêntrico do complemento cromossômico de todas as espécies estudadas. Essas pequenas variações indicam que os rearranjos Robertsonianos foram pontuais na evolução cromossômica de *Loricaria*, e que poucos foram os eventos de inversões pericêntricas a marcarem a história evolutiva do gênero.

O gênero *Loricariichthys* tem 17 espécies, que estão distribuídas nas bacias dos rios Amazonas, Paraná e pequenos rios costeiros que drenam os escudos brasileiros e da Guiana (Ferraris, 2003) e, mesmo se apresentando como um gênero bem diagnosticado, diversas dificuldades são apontadas na identificação das espécies devido ao seu alto grau de similaridade (Covain e Fisch-Muller, 2007). Essa similaridade entre as espécies se repete também no número diplóide, pois, das quatro espécies que passaram por alguma caracterização citogenética, três delas, *L. anus*, *L. platymetopon* e *Loricariichthys* sp. apresentaram $2n=54$ cromossomos, e somente *L. maculatus*

apresentou $2n=56$ cromossomos (Fenocchio, 1993; Scavone e Júlio Jr., 1995; Roncati *et al.*, 1999; Maia, 2008; presente trabalho).

Maia (2008) observa que a presença de quatro cromossomos subtelocêntricos é uma característica constante no gênero *Loricariichthys*. Entretanto, os resultados apresentados no presente trabalho refutam essa observação, já que a população de *L. platymetopon* aqui estudada apresentou oito subtelocêntricos em sua constituição cariotípica.

Zawadzki *et al.* (2000), na tentativa de amenizar os problemas encontrados na identificação das espécies de *Loricariichthys*, conseguiram diferenciar as espécies *L. anus*, *L. platymetopon* e *Loricariichthys* sp. a partir do padrão de isozimas corridas em gel de eletroforese. Assim como as ferramentas moleculares apresentadas no trabalho de Zawadzki *et al.* (2000), os marcadores citogenéticos podem ser eficientes na resolução dos problemas taxonômicos encontrados no gênero, pois, além de *L. maculatus* apresentar um número diplóide diferente das demais espécies estudadas, a constituição cariotípica entre as demais espécies é variável. Enquanto *L. anus* apresentou uma constituição cariotípica de $8m + 16sm + 4st + 26a$ e *Loricariichthys* sp. apresentou uma fórmula cariotípica de $6m + 26sm + 4st + 18a$, *L. platymetopon* apresentou uma variação estrutural interpopulacional, sendo uma população com $6m + 20sm + 4st + 24a$ / $7m + 20sm + 4st + 23a$ (e um sistema de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados do tipo ZZ/ZW), outra população com $6m + 18sm + 4st + 26a$ e uma terceira população, a população estudada no presente trabalho, contendo em seu complemento cromossômico $10m + 16sm + 8st + 20a$.

Apesar de as RONS estarem localizadas entre os maiores cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos do complemento cromossômico de todas as espécies de *Loricariichthys* analisadas, em *L. Anus*, essas regiões foram localizadas em posição intersticial do braço longo (Maia, 2008), enquanto nas demais espécies, as RONS foram

detectadas em posição terminal do braço curto (Fenocchio, 1993; Scavone e Júlio Jr., 1995; Roncati *et al.*, 1999; presente trabalho).

Assim sendo, a variação na estrutura cariotípica, apesar da constância no número diplóide, demonstra que as inversões pericêntricas foram os principais rearranjos cromossômicos a participarem da evolução cariotípica do gênero. Além disso, a variação estrutural interpopulacional apontada em *L. platymetopon* leva a crer que essas populações podem estar passando por um processo de especiação, embora não haja evidências que confirmem o isolamento geográfico entre elas. Caso haja zonas de contato entre essas populações, formas híbridas estariam sendo geradas e possivelmente uma barreira de híbridos possa estar separando as populações que apresentam as formas homozigotas.

Os telômeros são estruturas especializadas localizadas nas extremidades cromossômicas e responsáveis por manter a estabilidade e a integridade dos cromossomos (Zakian, 1997). A inativação ou a eliminação dessas estruturas podem provocar a fusão entre dois cromossomos, e, no caso de essas fusões envolverem cromossomos acrocêntricos/subtelocêntricos, cromossomos viáveis, do tipo metacêntrico/submetacêntrico, são gerados, com um grande significado na evolução cariotípica dos grupos que sofrem essas translocações.

A localização intracromossômica de sequências teloméricas é considerada um reflexo remanescente de rearranjos cromossômicos tais como inversões e fusões cêntricas ou *in tandem*. As ITSs (Sequências Teloméricas Intersticiais) identificadas na região pericentromérica no 7º e no 13º pares do complemento cromossômico das populações de *Loricaria prolixa* estudadas no presente trabalho sugerem que esses pares cromossômicos podem ter sido o resultado de dois eventos de fusão cromossômica: o primeiro evento envolve uma fusão cêntrica entre dois pares de cromossomos acrocêntricos pequenos de um cariótipo ancestral com $2n=64$ cromossomos, originando

o par de metacêntricos de *Loricaria prolixa* que apresentou as ITSs no presente trabalho; o segundo evento identificado pode ter ocorrido na população de *Loricaria prolixa* estudada por Scavone e Ferreira Julio (1994), no qual um par de cromossomos acrocêntricos pequenos teria sofrido uma quebra no braço longo, próximo ao centrômero, e uma inversão pericêntrica, seguida de uma fusão bem próxima do centrômero, teria originado o menor par de cromossomos subtelocêntricos da população de *Loricaria prolixa* do presente trabalho, que também apresenta as ITSs. Apesar das hipóteses aqui propostas, é importante ressaltar, como já foi feito no capítulo anterior, que estudos com mamíferos apontaram as ITSs associadas à heterocromatina, relacionando essas sequências a um componente de DNA satélite, e não a um evento recente de fusão (Metcalf *et al.*, 2004). A exemplo de *Rineloricaria*, os pares que apresentaram as ITSs em região pericentromérica no cariótipo de *Loricaria prolixa* têm blocos heterocromáticos nessa mesma região, indicando que essa marcação talvez não seja evidência de um rearranjo recente.

Existem evidências claras da ocorrência de rearranjos cromossômicos em espécies nas quais as ITSs não foram identificadas, como demonstrado em formigas do gênero *Myrmecia* (Meyne, Hirai e Imai, 1995). Embora ITSs não tenham sido identificadas nas espécies de *Harttia* e *Loricariichthys* estudadas no presente trabalho, a ocorrência de fusões cêntricas ou *in tandem* não pode ser descartada, pois, os eventos de fusão podem ter sido tão antigos que a própria inativação das ITSs levou à sua eliminação. Além disso, como mencionado acima, a eliminação de sequências teloméricas nas extremidades cromossômicas pode contribuir para a fusão cromossômica, não sendo possível, portanto, identificar as ITSs.

Segundo Kavalco *et al.* (2004b), a presença de grandes quantidades de heterocromatina é considerada uma condição ancestral em Loricariidae. Conforme os dados disponíveis na literatura e os dados apresentados no capítulo anterior e no

presente trabalho, sobre a quantidade de heterocromatina encontrada nos gêneros que compõem a subfamília Loricariinae, somente *Harttia* apresenta uma quantidade considerável de heterocromatina em comparação aos demais gêneros estudados, nos quais são encontrados apenas pequenos blocos heterocromáticos na região pericentromérica da maioria dos cromossomos.

Levando em consideração o fato de que, em todos os trabalhos filogenéticos realizados em Loricariinae, seja utilizando dados morfológicos ou dados moleculares, *Harttia* apresenta-se como o gênero mais basal da subfamília (Isbrücker, 1979; Schaefer, 1987; Rapp Py-Daniel, 1997; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008), um grande acúmulo de heterocromatina pode ser considerado um traço ancestral também em Loricariinae. Analisando portanto o padrão de distribuição e a quantidade de heterocromatina que Loricariinae apresenta, podemos propor que a evolução do genoma dos representantes dessa subfamília se deu no sentido da redução do acúmulo das regiões heterocromáticas. É importante ressaltar, ainda em relação ao gênero *Harttia*, que algumas espécies desse gênero (*H. carvalhoi* e *Harttia* sp. n.) não apresentam RONS heterocromáticas, sendo essa característica exclusiva dessas espécies e talvez uma autapomorfia para essas espécies.

A presença de RONS em posição terminal é provavelmente uma característica ancestral na Ordem Siluriformes (Oliveira e Gosztonyi, 2000) e uma característica comum em Loricariidae (Artoni e Bertollo, 1996). RONS em posição terminal no braço curto de cromossomos de tamanho grande a médio do tipo subtelocêntrico/acrocêntrico é uma característica compartilhada por quase todos os loricariíneos, indicando ser esta uma característica ancestral bem sucedida na subfamília, já que se manteve conservada. As exceções ficam por conta de duas espécies de *Harttia* e uma espécie de *Rineloricaria* e de *Loricariichthys*, podendo significar que o caráter “RONS em posição intersticial” surgiu várias vezes na subfamília. O polimorfismo de tamanho das RONS identificado

em *Harttia* sp. n., no presente trabalho, já foi detectado em *Harttia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006), sendo que tal polimorfismo pode ser gerado por um *crossing-over* desigual, por meio de duplicações ou deleções gênicas ou pela inativação de parte do *cluster* do gene ribossomal DNAr 18S e, segundo Foresti *et al.* (1981) e Almeida-Toledo *et al.* (2000), polimorfismos como este são muito comuns em peixes neotropicais.

Conforme Artoni e Bertollo (2001), o número diplóide $2n=54$ cromossomos pode representar um estado plesiomórfico para Loricariidae. A condição derivada de Loricariinae dentro da família Loricariidae (Reis *et al.*, 2006) fez com que essa subfamília perdesse a condição desse caráter, e nenhuma especulação pode ser feita quanto ao seu número diplóide ancestral, já que o gênero mais basal da subfamília, o gênero *Harttia*, apresenta a segunda maior variação de número diplóide do grupo. Além disso, a própria subfamília demonstra uma diversidade cariotípica que camufla qualquer tendência cariotípica entre seus representantes.

Apesar de *Loricariichthys* ser um dos gêneros mais derivados dentro de Loricariinae (Isbrücker, 1979; Schaefer, 1987; Rapp Py-Daniel, 1997; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008), o número diplóide modal de $2n=54$ cromossomos pode indicar que esse foi um dos únicos gêneros, na subfamília, a conservar o estado plesiomórfico de Loricariidae. Dos gêneros que tiveram mais de uma espécie estudada citogeneticamente, enquanto *Harttia* e *Rineloricaria* apresentaram-se como gêneros cariotipicamente diversificados, *Loricaria* e *Loricariichthys* mantiveram suas características cromossômicas mais conservadas.

Levando-se em conta que os gêneros *Harttia* e *Rineloricaria* são constituídos por peixes de menor tamanho que se isolam em ambientes de cabeceira e, que os representantes de *Loricaria* e *Loricariichthys* apresentam um maior tamanho corpóreo e ocorrem geralmente em rios de grande porte, é possível que as populações que

compõem as espécies desses dois últimos gêneros não estejam completamente isoladas, estabelecendo um fluxo gênico que permita uma distribuição mais homogênea dos cariótipos que as compõem. Em oposição, as populações que compõem as espécies de *Harttia* e *Rineloricaria*, por estarem geograficamente isoladas, estão evoluindo dentro de seus próprios sistemas hidrográficos e, por isso mesmo, acumulam com maior facilidade diferenciações cariotípicas.

Os dados obtidos no presente trabalho, associados aos dados citogenéticos disponíveis na literatura para espécies de Loricariinae, corroboram a condição cariotípica heterogênea e diversificada do grupo, sendo essa condição possivelmente o resultado de rearranjos Robertsonianos e não-Robertsonianos. Foi possível notar, com base neste estudo que, enquanto alguns gêneros de Loricariinae mantiveram algumas características citogenéticas ancestrais da família Loricariidae, outros gêneros suportaram e fixaram tantas mutações cromossômicas que já não apresentam qualquer similaridade cariotípica com a condição ancestral de Loricariidae. O presente trabalho ressaltou ainda a importância taxonômica dos dados citogenéticos na resolução de conflitos taxonômicos encontrados na subfamília Loricariinae e auxiliou no melhor entendimento dos motivos que levaram a diversificação cariotípica apresentada nesta subfamília.

Figura 4.1: Em A: Cariótipo de *Harttia* sp. n. corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS. Em B: A mesma metáfase somática utilizada na montagem do cariótipo de *Harttia* sp. n. submetida ao bandeamento C. Em C: Metáfase somática de *Harttia* sp. n. com sondas teloméricas.

Figura 4.2: Em A: Cariótipo de *Loricaria prolixa* corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS e os pares que apresentaram marcações de ITSs. Em B: Metáfase somática de *Loricaria prolixa* submetida ao bandeamento C. Em C: Metáfase somática de *Loricaria prolixa* com sondas teloméricas. As setas indicam as ITSs encontradas no cariótipo da espécie.

Figura 4.3: Em A: Cariótipo de *Loricariichthys platymetopon* corado com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos portador das RONS. Em B: Metáfase somática de *Loricariichthys platymetopon* submetida ao bandeamento C. Em C: Metáfase somática de *Loricariichthys platymetopon* com sondas teloméricas.

Figura 4.4: Em A: Metáfase somática de *Loricaria proluxa* com sondas teloméricas. As setas indicam as ITs encontradas no cariótipo da espécie. Em B, a mesma metáfase em imagem invertida e em escala cinza, para uma melhor visualização da morfologia cromossômica. As setas indicam os cromossomos que apresentaram as ITs.

Capítulo III

Mapeamento físico comparativo dos genes ribossomais 5S e 18S em doze espécies de Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae).

Palavras-chave: sentença, NTSs, pseudogenes, quebras cromossômicas, rearranjos cromossômicos, evolução cromossômica.

Abstract

The number and localization of sites of 45S and 5S rDNA can be essentially species-specific and are an important cytogenetic marker in fish, and may even provide phylogenetic information. While the family 45S has been localized, indirectly (through impregnation by silver nitrate) or direct (by means of in situ hybridization with specific probes), the chromosomes of almost all species of fish that had been through cytogenetics, the family 5S had its chromosomal localization described, only in a direct way, in little more than 60 fish species representing different groups. In Loricariinae, of the 20 species cytogenetically studied, only four had three 18S rDNA and 5S rDNA had found through the technique of in situ hybridization with specific probes. Probes for 18S rDNA and 5S are used in this study for the localization and construction of the first comparative physical mapping of these sites in species of Loricariinae. The analysis of this mapping is aimed to better understand the evolution of these multigene families in the subfamily Loricariinae. The location of sites of 18S rDNA confirmed the location of NORs, presented in chapters I and II of this dissertation, and the results show that the variation in numbers of sites of 5S rDNA are cytogenetic markers useful in identifying

these species. The karyotype evolution of Loricariinae is discussed based on the present results.

Resumo

O número e a localização de sítios de DNAr 45S e 5S podem ser essencialmente espécie-específicos e em peixes constituem um importante marcador citogenético, podendo fornecer até informações filogenéticas. Enquanto a família 45S tem sido localizada, de modo indireto (por meio da impregnação por nitrato de prata) ou direto (por meio da hibridação *in situ* com sondas específicas), nos cromossomos de praticamente todas as espécies de peixes que passaram por alguma caracterização citogenética, a família 5S teve sua localização cromossômica descrita, somente de modo direto, em pouca mais de 60 espécies de peixes, representando grupos distintos. Em Loricariinae, das 20 espécies estudadas citogeneticamente, somente quatro tiveram o DNAr 18S e três tiveram o DNAr 5S localizados por meio da técnica de hibridação *in situ* com sondas específicas. Sondas de DNAr 18S e 5S são utilizadas no presente trabalho na localização e construção do primeiro mapeamento físico comparativo destes sítios em espécies de Loricariinae. A análise desse mapeamento tem por objetivo um melhor entendimento da evolução dessas famílias multigênicas na subfamília Loricariinae. A localização dos sítios de DNAr 18S confirmou a localização das RONS, apresentadas nos capítulos I e II desta dissertação, e os resultados apontam a variação de números de sítios do DNAr 5S como marcadores citogenéticos úteis na identificação dessas espécies. A evolução cariotípica de Loricariinae é discutida como base nos resultados aqui obtidos.

Introdução

O DNA repetitivo compreende segmentos de DNA de diferentes tamanhos que se repetem de dezenas a milhões de vezes no genoma, distribuindo-se em duas classes:

DNA repetitivo codificador e DNA repetitivo não-codificador. O DNA repetitivo codificador constitui famílias multigênicas e tem uma função biológica bem definida. Dentre essas famílias multigênicas, dois tipos de DNA repetitivos são definidos, sendo um deles formado pelas famílias de genes dispersos e o outro constituindo as famílias de genes dispostos em tandem. As famílias de genes codificadores dispostos em tandem codificam componentes que devem se apresentar em grande quantidade no citoplasma das células. Entre os genes codificadores, estão os genes ribossomais (Griffiths *et al.*, 2001).

Os genes ribossomais são genes extremamente conservados entre táxons filogeneticamente muito distantes, indicando que os ribossomos, os produtos resultantes da transcrição e tradução desses genes, são estruturas essenciais na manutenção de qualquer forma de vida. Em eucariontes superiores, o DNA ribossomal encontra-se organizado em duas famílias multigênicas. A maior dessas famílias, a família 45S, é composta pelas subunidades 18S, 28S e 5,8S, que estão separadas por espaçadores não-transcritos (NTSs) e que formam as regiões organizadoras de nucléolo. A menor dessas famílias, a família 5S, não apresenta subdivisões, nem participa da formação de nucléolos (Pendás *et al.*, 1994) e, enquanto seus genes são extremamente conservados entre táxons não relacionados, seus NTSs apresentam uma extensiva variação entre espécies proximamente relacionadas (Martins, 2000). Essas duas famílias multigênicas são relativamente independentes uma da outra e são encontradas em *loci* separados, em diferentes cromossomos ou em diferentes posições num mesmo cromossomo (Brown e Carlson, 1997).

Por participar da formação das regiões organizadoras de nucléolo, a localização da família 45S em um cariótipo pode ser detectada indiretamente por meio da impregnação por nitrato de prata, caso ocorra atividade transcricional dessa família de DNA ribossomal na intérfase precedente (Howell, 1977; Hubbell, 1985), já que a prata

se associa a proteínas nucleolares e não diretamente ao DNA ribossomal (Miller *et al.*, 1976). De modo direto, sem dependência de qualquer atividade transcricional, sítios da família de DNA ribossomal 45S podem ser localizados em um genoma por meio da hibridação *in situ* com sondas específicas. Essa técnica permite que, mesmo inativados, esses genes sejam detectados e, além disso, permite também a identificação da outra família multigênica de DNA ribossomal, a família 5S, que não pode ser detectada indiretamente, já que não participa da formação de nucléolos.

O número e a localização de sítios de DNAr 45S e 5S pode ser espécie-específico e em peixes constitui um importante marcador citogenético (Fujiwara *et al.*, 1998), podendo fornecer até informações filogenéticas (Gornung *et al.*, 2001). Enquanto a maior família multigênica de DNAr, a família 45S, tem sido localizada nos cromossomos, de modo indireto, em praticamente todas as espécies de peixes que passaram por alguma caracterização citogenética, ou de modo direto, em uma parte considerável dessas espécies de peixes, a menor família multigênica de DNAr, a família 5S teve sua localização cromossômica descrita em pouco mais de 60 espécies de peixes, representando grupos distintos como Acipenseriformes, Anguilliformes, Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes, Salmoniformes, Siluriformes, Perciformes e Tetraodontiformes (Martins, 2007).

Em Loricariinae, a técnica mais comumente utilizada na localização de *clusters* de genes ribossomais é a impregnação por nitrato de prata. O uso da hibridação *in situ* em loricariíneos está restrito à aplicação de sondas de DNAr 18S e 5S, sendo que das 20 espécies de Loricariinae estudadas citogeneticamente, somente quatro tiveram o DNAr 18S e três tiveram o DNAr 5S localizados por meio dessa técnica.

Sondas de DNAr 18S e 5S foram utilizadas no presente trabalho em uma tentativa de construir o primeiro mapeamento físico comparativo destes sítios em espécies de Loricariinae. A análise desse mapeamento tem por objetivo um melhor

entendimento da evolução dessas famílias multigênicas na subfamília Loricariinae, bem como auxiliar no entendimento da evolução cariotípica dos representantes dessa subfamília.

Materiais e Métodos

Neste trabalho foram analisadas doze espécies de Loricariinae provenientes da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste, sendo uma espécie de *Harttia* (*Harttia* sp. n.), uma espécie de *Loricaria* (*L. prolixa*), uma espécie de *Loricariichthys* (*L. platymetopon*) e nove espécies de *Rineloricaria* (*R. latirostris*, *R. pentamaculata*, *Rineloricaria* sp. n., *R. cf. nigricauda*, *Rineloricaria* sp. 1-5). As espécies *Rineloricaria* sp. 1-5 são assim denominadas devido à dificuldade na sua identificação, dificuldade essa gerada pela perda do holótipo da espécie tipo do gênero. Quanto às novas espécies *Harttia* sp. n. e *Rineloricaria* sp. n., estas estão sendo descritas pelo Dr. Osvaldo T. Oyakawa, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Informações completas sobre a quantidade de populações analisadas por espécie, bem como o tamanho de cada população e as localidades de coleta de cada uma dessas populações estão disponíveis na tabela 5.

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos seguiu-se o protocolo proposto por Gold *et al.* (1990), utilizando-se meio de cultura Hank's. Para estimular divisões mitóticas injetou-se uma solução de fermento biológico e açúcar no animal, numa proporção de 1:1. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. A identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) por impregnação de nitrato de prata seguiu a metodologia de Howell e Black (1980). Para a identificação do número e da localização

dos genes ribossomais foi empregada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) segundo o protocolo proposto por Pinkel *et al.* (1986) e utilizando sondas de DNAr 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de DNAr 5S, obtidas no presente trabalho, por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), a partir do DNA molde de *Rineloricaria latirostris* e conforme as condições propostas por Alves-Costa *et al.* (2008), com algumas modificações, utilizando os *primers* 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3', que foram desenvolvidos para a região de DNAr 5S de truta arco-íris (Komiya e Takemura 1979). Para a construção da sonda, produtos de PCR com cerca de 200 pares de bases foram purificados utilizando o Kit IllustraTM GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK) e sequenciados para verificação da composição e identificação da região codificadora do gene ribossomal 5S. Em seguida, as sondas de DNAr 18S obtidas no trabalho de Hatanaka e Galetti Jr. (2004) e as sondas de DNAr 5S obtidas no presente trabalho, foram marcadas com biotina-dATP, pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen®). Idiogramas dos cariótipos presentes nos capítulos I e II foram construídos para permitir uma melhor comparação dos dados. Esses idiogramas foram construídos a partir do programa computacional IDIOGRAMA.exe, desenvolvido pelo Msc. Ary Bressane Neto, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

Resultados

Todas as espécies analisadas tiveram seus sítios de DNAr 18S localizados em seus cariótipos com sucesso, confirmando o número e a localização das RONS (figuras 5.1 e 5.2). Entretanto, com relação à localização dos sítios de DNAr 5S, das doze espécies estudadas, apenas nas populações de *Loricaria proluxa* não foi possível realizar tal caracterização devido à não hibridação da sonda (figuras 5.3 e 5.4).

Tabela 5: Número e localização dos sítios ribossomais 18S e 5S em Loricariinae.

Espécie	P	N	Localidade	2n	FC	DNAr 18S	DNAr 5S	Sítios 5S***
<i>Harttia</i> sp. n.	A	1♂, 1♀	Rio Passa Cinco, Ipeúna, SP (AP)	62	13m, 23sm, 16st, 10a	Intersticial (Par 1/ Braço Curto)	Intersticial (Par 8/ Braço Longo)	1
<i>Loricaria prolixa</i>	A	2♀	Rio Pardo, Terra Roxa, SP (AP)	62	14m, 8sm, 4st, 36a	Terminal (Par 12/ Braço Curto)	*	*
	B	5♀, 3♂	Rio Mogi-Guaçu, Porto Ferreira, SP (AP)	62	14m, 8sm, 4st, 36a	Terminal (Par 12/ Braço Curto)	*	*
	C	2♀, 1♂	Rio Mogi-Guaçu, Descalvado, SP (AP)	62	14m, 8sm, 4st, 36a	Terminal (Par 12/ Braço Curto)	*	*
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	A	4♀, 3♂	Rio do Peixe, Mariápolis, SP (AP)	54	10m, 16sm, 8st, 20a	Terminal (Par 14/ Braço Curto)	Intersticial (Pares 9 e 14**/ Braços Longos)	2
<i>Rineloricaria latirostris</i>	A	1♀	Rio Mogi-Guaçu, Descalvado, SP (AP)	40	16m, 4sm, 20st/a	Intersticial (Par 2/ Braço Curto)	Intersticial (Pares 6, 9 e 10/ Braços Curtos) Terminal (Pares 15, 16 e 20/ Braços Curtos)	6
	B	6♀, 2♂, 5J	Rio Passa Cinco, Ipeúna, SP (AP)	46	10m, 4sm, 32st/a	Intersticial (Par 1/ Braço Curto)	Intersticial (Pares 6 e 7/ Braços Curtos) Terminal (Pares 14 e 16/ Braços Curtos)	4
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	A	4♀, 2♂	Rio Taquaral, São Miguel Arcanjo, SP (AP)	58	2m, 2sm, 54st/a	Terminal (Par 3/ Braço Curto)	Terminal (Pares 7, 13, 15, 17 e 22/ Braços Curtos)	5
<i>Rineloricaria</i> sp. 1	A	6♀, 5♂	Rio São José, Vassouras, RJ (PS)	62	2sm, 60st/a	Terminal (Par 2/ Braço Curto)	Terminal (Par 14 / Braço Curto)	1
	B	1J	Rio Paraíba do Sul, Itaocara, RJ (PS)	62	2sm, 60st/a	Terminal (Par 2/ Braço Curto)	Terminal (Par 14 / Braço Curto)	1
<i>Rineloricaria</i> sp. 2	A	1♂	Rio Paraíba do Sul, Barra Mansa, RJ (PS)	62	2sm, 60st/a	Terminal (Par 2/ Braço Curto)	Terminal (Par 14 / Braço Curto)	1
		2♀		62	4m, 58st/a	Terminal (Par 3/ Braço Curto)	Terminal (Par 15 / Braço Curto)	1
		1♂, 1♀		62	6m, 2sm, 54st/a	Terminal (Par 5/ Braço Curto)	Terminal (Pares 17 e 28/ Braços Curtos)	2
<i>Rineloricaria</i> sp. 3	A	5♀, 2♂	Córrego Passa Vinte, Cruzeiro, SP (PS)	62	6m, 2sm, 54st/a	Terminal (Par 5/ Braço Curto)	Terminal (Pares 17 e 28/ Braços Curtos)	2
<i>Rineloricaria</i> sp. 4	A	4♀, 3♂, 3J	Rio Jurumirim, Angra dos Reis, RJ (PDRJ)	64	6m, 58st/a	Terminal (Par 5/ Braço Curto)	Terminal (Pares 6, 9, 14 e 21/ Braços Curtos)	4
<i>Rineloricaria</i> sp. 5	A	4♀, 4♂, 1J	Riacho da Baía de Paranaguá, Morretes, PR (PDPR)	68	2m, 66st/a	Terminal (Par 3/ Braço Curto)	Terminal (Pares 6, 16 e 22/ Braços Curtos)	3
<i>Rineloricaria</i> sp. n.	A	8♀, 17♂, 1J	Rio Jacupiranga, Cajati, SP (RI)	68	3m, 65st/a	Terminal (Par 4/ Braço Curto)	Intersticial (M do Par 1/ Braço Longo) Terminal (Pares 7, 12, 14 e 17/ Braços Curtos)	5
		4♀, 3♂		70	70st/a	Terminal (Par 2/ Braço Curto)	Terminal (Pares 5, 6 e 9/ Braços Curtos)	3
	B	1♂	Rio Betari, Iporanga, PETAR, SP (RI)	70	70st/a	Terminal (Par 1/ Braço Curto)	Terminal (Pares 2, 4, 6 e 13/ Braços Curtos)	4
<i>Rineloricaria</i> cf. <i>nigricauda</i>	A	10♀, 21♂, 4J	Ribeirão Bonito, São José do Vale do Rio Preto, RJ (PS)	70	70st/a	Terminal (Par 4/ Braço Curto)	Terminal (Pares 3 e 7/ Braços Curtos)	2

P = População, N = tamanho da população, J = Jovem, AP = Alto Paraná, PS = Paraíba do Sul, PDRJ = Pequenas Drenagens do Rio de Janeiro, PDPR = Pequenas Drenagens do Paraná, RI = Ribeira do Iguape, 2n = número diplóide, FC = fórmula cariotípica, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, *não houve resultado, **par apresenta DNAr 18S e 5S em sintenia, ***só houve um sítio para o DNAr 18S em todas as populações. OBS: Para maiores informações sobre coordenadas geográficas e as localidades, veja a segunda seção dessa dissertação.

A impregnação por nitrato de prata foi efetuada nas mesmas metáfases submetidas à FISH com sonda de DNAr 5S em uma tentativa de se identificar alguma sintenia entre essa família multigênica e a família multigênica 45S, e esta sintenia só pode ser observada em *Loricariichthys platymetopon* (figura 5.6). As metáfases submetidas à impregnação por nitrato de prata das espécies que não apresentaram esses genes ligados não são apresentadas.

Os resultados referentes à localização dos genes DNAr 18S e 5S das populações pertencentes às doze espécies estudadas, bem como o número de sítios de cada gene, são apresentados na tabela 5 e nas figuras 5.1-5.4 e 5.8-5.10.

Heteromorfismo de tamanho no sítio do gene DNAr 18S foi verificado em *Harttia* sp. n., na população B de *Rineloricaria latirostris*, na população B de *Rineloricaria* sp. n. e em metade dos representantes da população de *Rineloricaria* cf. *nigricauda* (figuras 5.1a, 5.1e, 5.1f, 5.1g, 5.5d). Foi identificada uma variação no tamanho do sítio do gene DNAr 18S nas três populações de *Loricaria prolixa*, variação essa que não havia sido detectada pela técnica de impregnação por nitrato de prata (figura 5.5 a-c). Em algumas metáfases das espécies de *Rineloricaria*, genes ribossomais envolvidos na configuração radial de cromossomos acrocêntricos foram detectados (figura 5.7).

Discussão

A localização dos sítios de DNAr 18S corrobora a localização das RONS simples, apresentadas nos capítulos 1 e 2 desta dissertação, mostrando que esses genes estiveram ativos em todas as espécies analisadas. O heteromorfismo de tamanho no sítio desse gene, encontrado em *Harttia* sp. n., na população B de *Rineloricaria latirostris*, na população B de *Rineloricaria* sp. n. e na população de *Rineloricaria* cf. *nigricauda*, é também coincidente com o heteromorfismo de tamanho das RONS detectadas nesses

mesmos exemplares nos dois capítulos anteriores, apontando como provável causa desse heteromorfismo um *crossing-over* desigual ou duplicações e/ou deleções gênicas, e descartando a hipótese de esse heteromorfismo ter sido gerado pela inativação de parte do *cluster* do gene ribossomal DNAr 18S.

As formas homomórficas das RONS, detectadas em *Harttia* sp. n., na população B de *Rineloricaria latirostris* e na população de *Rineloricaria* cf. *nigricauda*, também são confirmadas pela hibridação *in situ* (dados não apresentados), corroborando a hipótese, acima apresentada, das causas que geraram o heteromorfismo desses sítios. Centofante *et al.* (2006) também identificaram, em *Harttia carvalhoi*, um heteromorfismo de tamanho nessa região gênica com impregnação por nitrato de prata e com hibridação *in situ*, demonstrado que *crossing-overs* desiguais ou duplicações e/ou deleções gênicas também foram as causas desse heteromorfismo. Em oposição, a variação no tamanho do sítio do gene DNAr 18S, detectada nas populações A e B de *Loricaria prolixa*, que não foi detectada pela técnica de impregnação por nitrato de prata, no capítulo anterior, também pode ter sido um resultado de *crossing-overs* desiguais ou duplicações gênicas, mas, neste caso, a condição homomórfica das RONS confirma a inativação de parte do *cluster* desse gene.

Como as RONS nessa espécie apresentaram-se como heterocromáticas (ver capítulo II), o constante estado de condensação dessa heterocromatina pode ter causado essa inativação em parte do *cluster* desse gene. Na literatura, um caso de inativação em *clusters* do gene ribossomal DNAr 18S foi registrado por Errero-Porto (2007) para a subfamília Loricariinae, que identificou, no cariótipo de uma população de *Rineloricaria pentamaculata*, três cromossomos marcados com nitrato de prata e quatro cromossomos marcados com sondas do DNAr 18S.

Mesmo realizada sob uma baixa estringência, a hibridação *in situ* das sondas de DNAr 5S não teve sucesso nas metáfases de *Loricaria prolixa*, indicando

provavelmente uma baixa similaridade dessas sequências, obtidas a partir do DNA genômico de *Rineloricaria latirostris*, com a sequência de DNAr 5S de *Loricaria prolixa*, embora as duas espécies façam parte de uma mesma tribo. Ainda que os genes ribossomais sejam extremamente conservados entre táxons não relacionados, seus NTSs são variáveis entre espécies próximas (Martins, 2000), e talvez essa variação tenha dificultado o anelamento da sonda de DNAr 5S de *Rineloricaria latirostris* no genoma de *Loricaria prolixa*.

Na subfamília Loricariinae, de modo geral, a maior família multigênica ribossomal, representada aqui pelo gene ribossomal 18S, está localizada nos maiores cromossomos do tipo subtelocêntrico/acrocêntrico, em posição terminal no braço curto. A exceção fica por conta de *Harttia carvalhoi*, *Harttia loricariformis*, *Harttia* sp. n., *Loricariichthys anus* e *Rineloricaria latirostris*, que apresentam essa região em posição intersticial, embora somente *Harttia kronei*, *Harttia* sp. n. e *Rineloricaria latirostris* tenham essa região localizada em cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (Giuliano-Caetano, 1998; Alves *et al.*, 2003; Centofante *et al.*, 2006; Errero-Porto, 2007; Maia, 2008, presente trabalho). O padrão de localização dessa família multigênica em Loricariinae demonstra que esta é uma característica ancestral bem sucedida na subfamília, já que se manteve conservada, e o caráter “posição intersticial” pode ter surgido várias vezes na subfamília.

Enquanto os genes ribossomais que compõem a família 45S são transcritos pela enzima RNA polymerase I, os genes da família 5S têm sua transcrição efetuada pela RNA polymerase III. Essa divergência funcional tem sido apontada como a causa da diferença na localização física dos genes que compõem essas famílias, encontrados geralmente em cromossomos separados nos cariótipos de peixes e outros vertebrados (Martins e Wasko, 2004). Além disso, a localização sintênica de *clusters* 5S e 45S podem facilitar translocações entre os arranjos desses genes, causando uma interferência

perturbadora na estrutura e função de tais genes (Martins, 2007). A organização sintênica dos genes ribossomais 45S-5S é uma situação rara em peixes, e em Loricariinae, a sua ocorrência só foi registrada em *Harttia carvalhoi*, *Harttia loricariformis* e *Loricariichthys platymetopon* (Kavalco *et al.*, 2004a; Centofante *et al.*, 2006, presente trabalho).

Alguns autores defendem que a localização de genes ribossomais 45S-5S em cromossomos separados caracteriza uma condição ancestral em peixes, enquanto outros acreditam que o estado ancestral estaria presente quando esses genes estivessem ligados (Fontana *et al.*, 2003; Gromicho *et al.*, 2006). Embora duas espécies de *Harttia* tenham apresentado esses dois genes ribossomais em sintenia, a terceira espécie de *Harttia* que teve esses genes localizados em seu cariótipo, no presente trabalho, não demonstrou tal característica. Os trabalhos filogenéticos realizados em Loricariinae e baseados em dados morfológicos e moleculares, apontam *Harttia* como o gênero mais basal da subfamília, enquanto *Loricariichthys* aparece como um dos gêneros mais derivados (Isbrücker, 1979; Schaefer, 1987; Rapp Py-Daniel, 1997; Montoya-Burnegos *et al.*, 1998; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008). Assim sendo, a sintenia dos genes ribossomais 45S-5S encontrada nesses dois gêneros de Loricariinae pode representar uma autapomorfia para ambos, e teria surgido de modo independente nessa subfamília.

Entretanto, caso outras espécies de *Harttia* venham a apresentar essa sintenia, a hipótese de essa característica ser uma condição ancestral pode ser válida para Loricariinae e, nesse caso, ela teria sido mantida em espécies que surgiram mais recentemente, como é o caso de *Loricariichthys platymetopon*, ou ainda, teria se perdido nos gêneros mais derivados, como por exemplo *Rineloricaria*, reaparecendo em algumas espécies desses gêneros, tal como *Loricariichthys*.

Os resultados do presente trabalho apontam a variação de números de sítios do DNAr 5S como marcadores citogenéticos muito úteis na identificação de espécies. Enquanto *Harttia carvalhoi* e *Harttia loricariformis*, espécies pertencentes à Bacia do Paraíba do Sul, apresentam esses genes localizados em dois sítios (Kavalco *et al.*, 2004a; Centofante *et al.*, 2006), *Harttia* sp. n., do Alto Paraná, apresenta somente um sítio identificado, indicando que, aparentemente, as espécies de *Harttia* que ocorrem na Bacia do Paraíba do Sul apresentam dois sítios de DNAr 5S, enquanto aquelas pertencentes à Bacia do Alto Paraná têm apenas um sítio para esse gene. Entretanto, é importante ressaltar que um maior número de espécies de *Harttia* deve ser analisado para se confirmar essa hipótese.

Quanto às espécies de *Rineloricaria*, pode-se afirmar com maior segurança essa associação entre número de sítios de DNAr 5S e localização biogeográfica graças ao grande número de espécies analisadas no presente trabalho. Assim sendo, é possível perceber que as espécies que ocorrem no Rio Paraíba do Sul apresentam entre um e dois sítios de DNAr 5S em seus cariótipos, as espécies que ocorrem nas pequenas drenagens independentes do Leste apresentam de três a quatro sítios, as espécies que ocorrem na Bacia Ribeira do Iguape apresentam entre três e cinco sítios e as espécies do Alto Paraná apresentam entre quatro e seis sítios de DNAr 5S em seus cariótipos.

Outro traço interessante a ser adotado como um marcador taxonômico para o gênero *Rineloricaria*, especificamente para *Rineloricaria latirostris*, é o fato de esta ter sido a única espécie de *Rineloricaria* a apresentar mais de um cromossomo do tipo metacêntrico/submetacêntrico com sítios de DNAr 5S, e de esses sítios estarem sempre em posição intersticial no braço curto.

Os resultados aqui apresentados para *Rineloricaria*, quanto à localização dos genes ribossomais DNAr 18S e 5S, corroboram as hipóteses propostas no capítulo I referentes a erros na identificação de algumas espécies. No capítulo I foi proposto que

os exemplares de *Rineloricaria* sp. 2 que apresentam o citótipo C podem pertencer na verdade à espécie *Rineloricaria* sp. 3. Além de o número diplóide e da fórmula cariotípica serem os mesmos entre as partes envolvidas, tanto o citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2 quanto o cariótipo de *Rineloricaria* sp. 3 apresentam as mesmas quantidades e as mesmas localizações dos sítios de DNAr 18S e 5S, reforçando a ideia de que ambos os exemplares pertencem à mesma unidade taxonômica.

Da mesma forma, é provável que os exemplares portadores dos citótipos A e B de *Rineloricaria* sp. 2 sejam efetivamente representantes de *Rineloricaria* sp. 1, já que todos apresentam as mesmas características citogenéticas. Além disso, as variações interpopulacionais e intrapopulacionais encontradas para *R. latirostris* e *Rineloricaria* sp. n. no capítulo I, se repetem quanto aos marcadores utilizados no presente trabalho, levando-nos a reiterar a necessidade de revisões taxonômicas e descrições mais detalhadas para essas espécies.

De acordo com os dados do presente trabalho e da literatura, a presença de dois ou mais sítios de DNAr 5S é uma característica comum em Loricariinae. Um alto número de sítios do gene ribossomal 5S tem sido registrado em peixes marinhos da espécie *Centropyge aurantonotus* (Affonso e Galetti Jr., 2005), em peixes de água doce do gênero *Triportheus* (Diniz *et al.*, 2009), em uma espécie de Gymnotiformes, *Gymnotus carapo* (Claro, 2008) e também em Siluriformes do gênero *Hypostomus* (Mendes-Neto, 2008). Entretanto, os genes DNAr 5S estão frequentemente agrupados em um único par nos cromossomos de peixes, representando provavelmente uma condição mais antiga para este grupo de animais (Pendás *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1996; Martins e Galetti Jr., 1999).

Três fatores podem ter gerado esse elevado número de sítios de DNAr 5S em algumas espécies do presente trabalho: 1) os elementos transponíveis, que fazem parte da composição dos NTSs dos genes ribossomais 5S e que são capazes de se inserir em

posições diferentes dentro do genoma, levando consigo cópias do gene DNAr 5S; 2) os rearranjos Robertsonianos, que alterariam o número e a posição dos sítios de DNAr 5S como consequência das fusões ou fissões cêntricas; 3) a troca dessas regiões gênicas causada pelas associações cromossômicas dos centrômeros em cromossomos acrocêntricos, associações estas denominadas configuração cromossômica radial. Os dois últimos motivos são aqui reforçados devido ao registro de metáfases que apresentaram genes ribossomais localizados nas regiões pericentroméricas dos cromossomos envolvidos na configuração radial. Porém, o primeiro motivo citado ganha força ao se observar que não há nenhuma relação entre número diplóide e número de sítios encontrados, principalmente em se tratando de *Rineloricaria*.

Recentes estudos de mapeamento comparativo entre organismos eucariontes proximamente relacionados têm apresentado uma relação entre rearranjos cromossômicos em larga escala e DNA repetitivo. A natureza do DNA repetitivo dentro destas regiões de quebra varia significativamente, desde *clusters* de DNAr e RNAt até elementos transponíveis (Coghlan e Wolfe, 2002; Kellis *et al.*, 2003). Se famílias multigênicas de genes ribossomais favorecem os pontos de quebras cromossômicas, como propôs Bailey *et al.* (2004) para explicar a evolução cromossômica de mamíferos, a localização pericêntrica no braço curto de cromossomos acrocêntricos do DNAr 5S, identificada em espécies de *Rineloricaria*, pode sinalizar que quebras cromossômicas teriam ocorrido na região pericentromérica de cromossomos como dois braços em um cariótipo ancestral, favorecendo eventos de fissões cêntricas e indicando que, possivelmente, a evolução cromossômica do gênero *Rineloricaria* se deu no sentido do aumento do número diplóide.

Segundo Martins e Galetti Jr. (2001), a grande maioria dos estudos de mapeamento cromossômico do gene DNAr 5S em peixes apresentaram a localização desse gene em posição intersticial nos cromossomos de quase todas as espécies

analisadas, sendo essa mesma localização observada em mamíferos e anfíbios. Para esses autores, o padrão observado não é casual e a localização intersticial do gene DNAr 5S pode representar alguma vantagem relacionada à organização deste gene no genoma de vertebrados, atuando como forma de defesa contra rearranjos que poderiam alterar a função deste gene tão importante. Entretanto, a maioria das espécies de Siluriformes que tiveram essa região gênica mapeada em seu cariótipo apresentaram o DNAr 5s em posição terminal, como é o caso de *Hypostomus* (Kavalco *et al.*, 2004a; Mendes-Neto, 2008), *Lophiosilurus* e *Cornohynchus* (Marques *et al.*, 2008), *Pimelodus* (Garcia e Moreira-Filho 2008), *Pimelodella* (Garcia e Almeida-Toledo, 2010), *Rhamdia* (Garcia *et al.*, 2010) e *Rineloricaria* (Mendes-Neto, 2008; presente trabalho), indicando provavelmente que a localização do gene DNAr 5S em posição terminal não apresenta qualquer desvantagem evolutiva para o organismo portador dessa característica.

Alguns sítios do gene ribossomal 5S coincidiram com blocos heterocromáticos (detectados nos capítulos anteriores) em várias espécies analisadas no presente trabalho. É o caso, por exemplo, de *Harttia* sp. n. e *Rineloricaria latirostris*. Segundo Affonso e Galetti Jr. (2005), os efeitos do aumento na quantidade e distribuição de sítios de DNAr são desconhecidos, mas alguns mecanismos de regulação gênica devem estar atuando para evitar uma expressão excessiva. Ainda segundo esses autores, em espécies que apresentam um alto número de sítios de DNAr 5S, alguns desses sítios podem corresponder a pseudogenes, principalmente quando associados a regiões heterocromáticas.

Casos de pseudogenes podem estar ocorrendo nas espécies que apresentaram somente um dos homólogos com sítios de DNAr 5S, tais como os pares de cromossomos 10 e 20 da população A de *Rineloricaria latirostris* e o par 1 do citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n., ou em espécies que apresentaram um número de sítios muito alto, tal como em *Rineloricaria pentamaculata*. Caso os sítios

encontrados apenas em um dos homólogos se referirem realmente a casos de pseudogenes, a inativação do gene pode ter sido causada pelo estado constante de condensação da heterocromatina, o que teria levado à eliminação desse pseudogene no cromossomo homólogo que não apresentou sinal fluorescente identificado pela sonda do DNAr 5S. Entretanto, com relação à população A de *Rineloricaria latirostris*, em não se tratando de um exemplo de pseudogenes, essa variação pode estar associada a um fator sexo-específico, e mais exemplares devem ser analisados para a confirmação dessa hipótese.

Se considerarmos que o DNAr 5S localizado em um único par de cromossomos seja uma característica ancestral, então, o cariótipo ancestral de *Rineloricaria* seria muito parecido com o cariótipo de *Rineloricaria* sp. 1 e com os citótipos A e B de *Rineloricaria* sp. 2, já que ambas são as únicas espécies que apresentaram somente um sítio de DNAr 5S. Dessa forma, o modelo evolutivo, dentre aqueles propostos no capítulo I, que melhor explicaria toda a diversidade cariotípica encontrada em *Rineloricaria*, seria aquele em que uma espécie contendo um cariótipo ancestral intermediário às variações numéricas encontradas no gênero ($2n=36$ a $2n=70$), com número diplóide entre 58 e 62 cromossomos, teria sua população inicial dividida em duas populações, devido aos soerguimentos que resultaram na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira, e essas duas populações teriam originado outras espécies dentro de seus novos sistemas, ocorrendo um aumento de número diplóide para as espécies da região costeira, e uma redução de número diplóide para as espécies do Alto Paraná.

O presente trabalho apresentou o primeiro mapeamento físico comparativo de genes ribossomais feito em espécies de Loricariinae, sendo o primeiro estudo desse tipo na família Loricariidae. A primeira sonda de DNAr 5S específica de Loricariinae foi obtida no presente estudo, contribuindo para aumentar a eficiência da localização desse gene a ser realizada em outras espécies da subfamília em estudos futuros. A ocorrência

em Loricariinae de um segundo caso de sintenia entre os genes DNAr 18S-5S foi identificado no presente estudo, e um elevado número de sítios de DNAr 5S foi relatado em muitas espécies de *Rineloricaria*. Os dados apresentados no presente estudo aumentam em mais de três vezes o número de espécies de Loricariinae que tiveram seus genes ribossomais localizados por meio da técnica de hibridação *in situ*, contribuindo de maneira expressiva com marcadores citogenéticos inovadores para a subfamília e mostrando ser uma excelente ferramenta taxonômica a auxiliar na resolução dos conflitos taxonômicos encontrados em Loricariinae, além de fornecer informações importantes a respeito da evolução cromossômica desta subfamília.

Figura 5.1: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de A: *Harttia* sp. n., B: *Loricaria prolixa*, C: *Loricariichthys platymetopon*, D: População A de *Rineloricaria latirostris*, E: População B de *Rineloricaria latirostris*, F: *Rineloricaria pentamaculata*, G: População A e B de *Rineloricaria* sp. 1, H: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, I: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.

Figura 5.2: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de A: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2, B: *Rineloricaria* sp. 3, C: *Rineloricaria* sp. 4, D: *Rineloricaria* sp. 5, E: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n, F: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n, G: População B de *Rineloricaria* sp. n, H: *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.

Figura 5.3: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de A: *Harttia* sp. n., B: *Loricariichthys platymetopon*, C: População A de *Rineloricaria latirostris*, D: População B de *Rineloricaria latirostris*, E: *Rineloricaria pentamaculata*, F: População A e B de *Rineloricaria* sp. 1, G: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, H: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, I: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.

Figura 5.4: Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de A: *Rineloricaria* sp. 3, B: *Rineloricaria* sp. 4, C: *Rineloricaria* sp. 5, D: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n., E: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n., F: População B de *Rineloricaria* sp. n., G: *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.

Figura 5.5: Híbridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de A: População A de *Loricaria prolixa*, B: População B de *Loricaria prolixa*, C: População C de *Loricaria prolixa*. As setas indicam os sítios onde o gene está localizado.

Figura 5.6: Em A: Híbridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de *Loricariichthys platymetopon*. Em B: A mesma metáfase submetida à técnica de impregnação por nitrato de prata. As setas indicam o par de cromossomos portador de um dos sítios de DNAr 5S e do sítio de DNAr 18S, indicando a sintenia entre esses dois genes.

Figura 5.7: Híbridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 5S em metáfases de A: *Rineloricaria* sp. 5 e B: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n. Em C, híbridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S em metáfases de *Rineloricaria pentamaculata*. As setas indicam genes ribossomais localizados nas regiões pericentroméricas dos cromossomos envolvidos na configuração radial.

Figura 5.8: Idiograma de A: *Harttia* sp. n., B: *Loricaria proluxa*, C: *Loricariichthys platymetopon*, D: População A de *Rineloricaria latirostris*, E: População B de *Rineloricaria latirostris*, F: *Rineloricaria pentamaculata*. As barras em preto representam a localização do DNAr 18S. As barras em cinza representam a localização do DNAr 5S. M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico, *par com heteromorfismo de tamanho, **só um dos homólogos apresentou o gene.

Figura 5.9: Idiograma de A: População A e B de *Rineloricaria* sp. 1, B: Citótipo A de *Rineloricaria* sp. 2, C: Citótipo B de *Rineloricaria* sp. 2, D: Citótipo C de *Rineloricaria* sp. 2, E: *Rineloricaria* sp. 3, F: *Rineloricaria* sp. 4. As barras em preto representam a localização do DNAr 18S. As barras em cinza representam a localização do DNAr 5S. M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico.

Figura 5.10: Idiograma de A: *Rineloricaria* sp. 5, B: Citótipo A da população A de *Rineloricaria* sp. n, C: Citótipo B da população A de *Rineloricaria* sp. n, D: População B de *Rineloricaria* sp. n, E: *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. As barras em preto representam a localização do DNAr 18S. As barras em cinza representam a localização do DNAr 5S. M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico, *par com heteromorfismo de tamanho, **só um dos homólogos apresentou o gene.

Capítulo IV

DNA *barcoding* como aliado na redução dos conflitos taxonômicos existentes no gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae).

Palavras-chave: Citocromo c Oxidase I, Alto Paraná, drenagens do Leste, BOLD, sinonimização de espécies, espécies crípticas.

Abstract

The necessity for a breakthrough in the ability to identify and distinguish species is widely recognized due to the limitations found in the morphological characterization of species. The study of molecules such as DNA barcoding can be an outlet for these limitations. Recent studies have shown the DNA barcoding as a simple tool to assist in rapid identification of known species and the recognition of undescribed species, particularly morphologically cryptic species. The taxonomic problems that affect the subfamily Loricariinae indicate that morphological data are not always effective or sufficient in solving their problems and have generated more confusion rather than clarifying them. The loss of the holotype of type species (*R. lima*), the absence of paratypes, the lack of concrete information about the type locality and the presence of diagnostic features that are valid for all genera of the subfamily, make *Rineloricaria* the genus with the largest conflicts taxonomic among Loricariinae. This study aimed to use the technique of DNA barcoding to assist in identifying and describing species of *Rineloricaria* from the Upper Paraná and eastern Brazil drainages. The results suggest a reallocation and a reduction in the number of species of *Rineloricaria* studied from nine to six species. Discussion about the advantages and disadvantages of the use of DNA

barcoding in the identification and description of species and the reconstruction of phylogenetic relationships are explored here.

Resumo

A necessidade de um avanço na capacidade de identificar e discriminar espécies é amplamente reconhecida devido às limitações encontradas na caracterização morfológica das espécies. O estudo das moléculas tais como o DNA *barcoding* pode representar uma saída a essas limitações. Estudos recentes têm apontado o DNA *barcoding* como uma ferramenta simples a auxiliar na rápida identificação de espécies conhecidas e no reconhecimento de espécies não descritas, particularmente espécies morfológicamente crípticas. Os problemas taxonômicos que atingem a subfamília Loricariinae indicam que os dados morfológicos nem sempre são eficazes ou suficientes na resolução de seus problemas e têm gerado mais confusões ao invés de elucidá-los. A perda do holótipo da espécie tipo (*R. lima*), a ausência de parátipos, a falta de informações concretas sobre a localidade tipo e a presença de características diagnósticas válidas para todos os gêneros da subfamília, fazem de *Rineloricaria* o gênero com maiores conflitos taxonômicos dentre todos os loricariíneos. O presente trabalho visou utilizar a técnica do DNA *barcoding* para auxiliar na identificação e descrição de espécies de *Rineloricaria* coletadas nas drenagens do Alto Paraná e do Leste brasileiro. Os resultados obtidos apontam para uma realocação e uma redução no número das espécies de *Rineloricaria* estudadas, de nove para seis espécies. Discussões sobre os prós e contras do uso do DNA *barcoding* na identificação e descrição de espécies bem como na reconstrução de relações filogenéticas são aqui exploradas.

Introdução

Cerca de 1,7 milhões de espécies de animais foram descritas em pouco mais de dois séculos de estudos taxonômicos, mas sabe-se que esse número está bem abaixo da

real quantidade de espécies que representa toda a diversidade biológica da Terra (Blaxter, 2003; Wilson, 2003). A delimitação e a identificação correta das espécies são pontos cruciais para o conhecimento da diversidade biológica, pois esse conhecimento informa se organismos diferentes são ou não membros de uma mesma entidade taxonômica (Dayrat, 2005). A identificação das espécies depende de informações fornecidas pelos taxonomistas. Entretanto, o número de taxonomistas em atividade é insuficiente para a identificação e o reconhecimento de todos os táxons requisitados pelos estudiosos não especialistas (Frézal e Leblois, 2008).

Além do número reduzido de profissionais especializados na identificação e na descrição das espécies, conflitos taxonômicos surgem também com relação a espécies identificadas. Esses conflitos taxonômicos, gerados principalmente pela redundância na descrição de novos grupos, podem levar a casos de sinonímias e, pela possibilidade de ocorrência de complexos de espécie ou de espécies morfologicamente crípticas, indicam a necessidade de revisões taxonômicas nos grupos em estudo. As revisões taxonômicas são também, por sua vez, de extrema importância para esses estudos, já que o conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida, e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las, é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995).

A necessidade de um avanço na identificação e na descrição das espécies é amplamente reconhecida (Sutherland *of* Houndswood, 2008), dada a falta de taxonomistas frente à imensa biodiversidade ainda não catalogada. A identificação das espécies já descritas e a falta de características morfológicas ou a caracterização morfológica incompleta para diferenciar organismos de unidades taxonômicas diferentes, definem algumas das limitações encontradas na caracterização morfológica

das espécies. Segundo Avise (2004), a análise molecular pode representar uma saída para essas limitações. Nesse sentido, o DNA *barcoding* surge como uma ferramenta simples para auxiliar na rápida identificação de espécies conhecidas e no reconhecimento de espécies não descritas, particularmente espécies morfologicamente crípticas (Hebert *et al.*, 2004; Witt *et al.*, 2006).

O uso do DNA *barcoding* consiste na caracterização de uma espécie utilizando uma região padronizada do DNA (Frézal e Leblois, 2008). O gene Citocromo c Oxidase I (COI), um gene mitocondrial composto por, aproximadamente, 650 pares de base, tem sido adotado como ferramenta de DNA *barcoding* para ser utilizado na identificação de espécies animais, devido, principalmente, à sua alta variação interespecífica, à baixa variação intraespecífica e a existência de *primers* universais que podem amplificar essa mesma região em grupos taxonômicos distintos (Hebert, *et al.*, 2003; Ivanova *et al.*, 2007).

Hebert *et al.* (2003) definiram o DNA *barcoding* como um sistema padrão rápido e preciso na identificação de espécies animais. Posteriormente, Wilson (2004) reafirmou essa observação, ao concluir que muitas espécies animais provavelmente têm um único DNA *barcoding*, já que existem 4^{650} possíveis combinações das bases A, T, G e C, e esse número de longe ultrapassa as cerca de 10 milhões de espécies que restam para serem descobertas.

Os problemas taxonômicos que atingem alguns gêneros da subfamília Loricariinae indicam que os dados morfológicos nem sempre são eficazes ou suficientes na resolução desses problemas. Ao contrário disso, muitos dados têm gerado confusões, ao invés de tentar elucidar a sistemática filogenética desses gêneros.

Entre os gêneros de Loricariinae que apresentam problemas taxonômicos, *Rineloricaria* se destaca pois, além da perda do holótipo da espécie tipo (*R. lima*), a ausência de parátipos e a falta de informações concretas sobre a localidade tipo, muitas

características diagnósticas de *Rineloricaria* são válidas para todos os gêneros da subfamília (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008). Diante desses problemas, o presente trabalho visou utilizar a técnica do DNA *barcoding* para auxiliar na identificação de espécies de *Rineloricaria* já nomeadas, bem como na caracterização molecular de espécies de *Rineloricaria* que ainda estão por serem descritas.

Materiais e métodos

As nove espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho tiveram o gene COI amplificado. São elas: *R. latirostris*, *R. pentamaculata*, *Rineloricaria* sp. n., *R. cf. nigricauda* e *Rineloricaria* sp. 1-5. Informações completas sobre a quantidade de populações analisadas por espécie, bem como o tamanho de cada população e as localidades de coleta dessas populações, estão disponíveis na tabela 3. As espécies *Rineloricaria* sp. 1-5 são assim denominadas pois nenhuma delas apresentou similaridades morfológicas com qualquer outra espécie de *Rineloricaria*, e, segundo os taxonomistas Dr. Osvaldo T. Oyakawa e da Dra. Ilana Fichberg, ambos pesquisadores do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, defini-las como sendo *R. cf. lima* ou *R. aff. lima* seria um erro redundante, já que o holótipo da espécie tipo (*R. lima*) se perdeu. A espécie *Rineloricaria* sp. n. já foi reconhecida como uma espécie nova e está sendo descrita pelo Dr. Osvaldo T. Oyakawa. Esta espécie é representada por três populações nessa dissertação, mas somente as populações A e C tiveram o gene COI sequenciado.

Três populações de *Loricaria prolixa* e uma população de *Loricariichthys platymetopon* também tiveram seu gene COI amplificado e sequenciado, e essas espécies foram utilizadas como grupo externo para o enraizamento da árvore obtida nessa análise. O número amostral adotado no presente estudo foi, sempre que possível,

igual a cinco, sendo inferior a esse valor quando a população foi representada por poucos ou por um único espécime.

Para a obtenção do gene COI, amostras de tecido (fígado, músculo ou nadadeira), preservadas em etanol absoluto, foram utilizadas para a extração de DNA genômico total, seguindo o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez, 1997).

Para a amplificação do gene COI foi utilizado o par de *primers* FishF2_t1 5'-TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC -3' e FishR2_t1 5'- ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA -3', desenhados por Ward *et al.* (2005). Cada PCR apresentou um volume final de 25 µL contendo: 1 µL de DNA molde (10ng/µL), 1 µL de cada primer (10 pM), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão (10x), 2,5 µL de dNTP (10 µM), 0,25 µL (5U) de Taq polimerase - Fermentas® e 15,25 µL de água destilada. As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research®. As condições de amplificação foram as seguintes: 4 minutos a 94° C, cinco ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 50° C e 90 segundos a 72° C, 40 ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 53° C e 90 segundos a 72° C, um período de extensão final de 10 minutos a 72° C e um período de resfriamento a 4° C.

Para a confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

Para o sequenciamento gênico foi utilizado o kit “BigDye Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems®) e as condições de PCR foram feitas segundo as orientações do fabricante, com a concentração dos *primers* sendo idêntica àquela utilizada na PCR original. Os produtos amplificados foram precipitados e sequenciados

no sequenciador modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems, marca HITACHI®.

As sequências foram visualizadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e para obtenção das sequências consenso entre as sequências da cadeia leve e pesada do DNAm_t, fez-se uso do programa Geneious 3.8.5.

Após o alinhamento e com a ajuda do programa Geneious 3.8.5, o quadro de leitura foi verificado, uma vez que a tradução dos códons das sequências codificadoras possibilita a detecção de erros. Por meio do programa “BlastN”, essas sequências foram checadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a fim de comparar sua similaridade com sequências desse mesmo gene pertencentes a outras espécies de peixes. Cada uma dessas sequências foi também comparada com sequências do gene COI de outras espécies de Loricariinae, que se encontram depositadas no banco de dados BOLD (*Barcode of Life Data System*, <http://www.barcodinglife.org>; Ratnasingham e Hebert, 2007), para confirmar a identificação das espécies já descritas no presente trabalho e para identificar, entre as espécies do presente trabalho que ainda não estão descritas, alguma similaridade com espécies já denominadas.

Todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W v1.6 (Thompson *et al.*, 1994), com o auxílio do programa Geneious 3.8.5, aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (10) e extensão de *gaps* (0,2). Os valores de divergência das sequências foram calculados, com o auxílio do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007), utilizando o modelo de distância Kimura dois parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), considerando como substituições as transições e as transversões. A árvore de Neighbor-joining (NJ) foi construída com base no modelo de distância K2P utilizando o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007).

Os valores de *bootstrap* (BT) (Felsenstein, 1985) foram calculados utilizando-se 10000 réplicas e dois tipos de árvores foram geradas: um tipo de árvore com valores de

BT totais e outro tipo de árvore em que apenas grupos com frequência maior do que 50% foram retidos. Valores de BT entre 50-70 foram considerados fracos, entre 70-90 bons e iguais ou superiores a 90, fortes (Schneider, 2007).

Resultados

A amplificação do gene COI gerou um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases, e desses, 512 pares de bases foram efetivamente utilizados nas análises. Após obtenção da sequência consenso, foi realizada a tradução dessas em sequências de aminoácidos, de forma que não foram observados códons de parada. Pseudogenes já foram identificados em sequências de COI de algumas linhagens de invertebrados (Buhay, 2009), entretanto, não foi detectado nenhum pseudogene no presente trabalho.

Para a maioria das populações não foram identificadas diferenças significativas entre as sequências obtidas para os indivíduos analisados, o que pode ser observado pelos baixos valores de divergência genética intrapopulacional (0 a 0,006) (dados não apresentados). A exceção foi encontrada na população de *Rineloricaria* sp. 2, para a qual se pôde observar uma diferenciação haplotípica dentro da população, no qual dois indivíduos compartilharam o haplótipo I e três indivíduos o haplótipo II. Assim, para uma melhor discussão dos dados, a população foi dividida em *Rineloricaria* sp. 2 I e *Rineloricaria* sp. 2 II.

Quando se comparou a diferenciação haplotípica entre as populações de uma mesma espécie duas situações foram observadas. Em *Loricaria prolixa* foi identificada uma pequena variação nos valores de divergência (0 a 0,009) entre as populações analisadas, e, por esse motivo, um único haplótipo foi adotado para representar a espécie neste estudo. Já para *Rineloricaria* sp. 1 (população C em comparação com as populações A e B) e *Rineloricaria* sp. 4, os valores de divergência foram significativos, de forma que se optou por incluir todas estas populações nas análises ao invés de

representá-las por um mesmo haplótipo. Entretanto, ainda que os valores de divergência entre as populações A e C de *Rineloricaria* sp. n. tenham apresentado uma baixa variação entre si (0 a 0,005), optou-se por manter as duas populações como representantes dessa espécie, ao invés de se adotar um único haplótipo.

Valores de divergência interespecíficos muito baixos foram encontrados, com variações entre 0 e 0,018 e envolvendo algumas populações das espécies *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2, *Rineloricaria* sp. 3, *Rineloricaria* sp. 4, *Rineloricaria* sp. 5, *Rineloricaria* sp. n. e *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. Mas, de modo geral, os valores de divergência entre espécies de um mesmo gênero variaram de 0,044 a 0,102 e, entre espécies pertencentes a gêneros diferentes, variaram de 0,162 a 0,207 (ver tabela 6).

Por meio da comparação com as sequências disponíveis para loricariíneos no banco de dados BOLD foi possível verificar a classificação utilizada para identificar as populações analisadas no presente estudo. O status de *Loricaria prolixa*, *Loricariichthys platymetopon* e *Rineloricaria latirostris* foi recuperado. Entretanto, o mesmo não foi observado para as demais espécies, tais como: *Rineloricaria pentamaculata* (BOLD = *Rineloricaria latirostris*); *Rineloricaria* cf. *nigricauda*, *Rineloricaria* sp. 1 C e *Rineloricaria* sp. 4 A (BOLD = *Rineloricaria* sp. aff. *kronei*); *Rineloricaria* sp. 2 I, *Rineloricaria* sp. 3 e *Rineloricaria* sp. 4 B (BOLD = *Rineloricaria* sp. aff. *lima*); *Rineloricaria* sp. 5 e *Rineloricaria* sp. n. (A e C) (BOLD = *Rineloricaria* sp.). Já *Rineloricaria* sp. 1 (A e B) e *Rineloricaria* sp. 2 II, foram reconhecidas como pertencentes ao gênero *Rineloricaria*, mas o banco de dados BOLD não retornou qualquer similaridade com outra espécie do gênero já estudada deste ponto de vista.

A partir da análise de NJ, dois tipos de árvores foram gerados: o primeiro tipo foi gerado com base em todos os haplótipos de cada população (figura 6.4) e o segundo tipo foi gerado com base em um único haplótipo representativo de cada população (figuras 6.1-6.3), com exceção da população que representa *Rineloricaria* sp. 2, que

apresentou dois haplótipos distintos, como mencionado acima. As relações evolutivas entre as espécies estudadas foram as mesmas nos dois tipos de árvores geradas, mas os valores de *bootstrap* foram ora menores, ora maiores, em alguns ramos da árvore gerada com base em todos os haplótipos de cada população, quando comparada com a árvore gerada com base em um único haplótipo por população.

O gênero *Rineloricaria* foi recuperado como monofilético, com forte suporte de ramo ($97 < BT < 100$). Entre os grupos externos utilizados, o gênero *Loricariichthys* apresentou maior proximidade genética com o gênero *Rineloricaria*, enquanto que o gênero *Loricaria* mostrou-se mais distante geneticamente do grupo interno. Fichberg (2008), em um estudo filogenético baseado em dados morfológicos de espécies de Loricariinae, encontrou os mesmos resultados quanto às relações filogenéticas entre esses três gêneros.

Das relações filogenéticas estabelecidas entre as espécies de *Rineloricaria*, cinco pequenos grupos monofiléticos foram recuperados, sendo aqui denominados como clados A-E (figura 6.1). A figura 6.3 apresenta esses clados com a denominação baseada na comparação das sequências do gene COI de espécies de *Rineloricaria* que estão disponíveis no BOLD. Esses cinco pequenos clados compõem dois clados maiores, sendo um deles composto por espécies do Alto Paraná e do Paraíba do Sul e outro, mais basal, formado por espécies do Paraíba do Sul, do Ribeira do Iguape e das pequenas drenagens independentes do Leste.

O clado mais basal, composto por espécies do Paraíba do Sul, do Ribeira do Iguape e das pequenas drenagens independentes do Leste, foi bem suportado por um valor de BT entre 77 e 79, e, em suas relações internas, dois grupos menores foram recuperados, ambos com bons suportes de ramos, com valores de BT entre 87 e 100. Em relação a esses dois grupos, aquele que se apresentou em posição mais basal foi dividido ainda em dois subgrupos irmãos, ambos com forte suporte de ramos (BT=99),

sendo um deles chamado aqui de clado A ou de *Rineloricaria* sp. aff. *kronei* segundo o BOLD, e o outro grupo chamado aqui de clado B ou de *Rineloricaria* sp. 1 também segundo o BOLD. O grupo interno mais derivado não apresentou formações de subgrupos e foi denominado no presente trabalho como clado C ou, segundo o BOLD, como *Rineloricaria* sp. aff. *lima*.

Quanto ao clado formado por espécies do Alto Paraná e do Paraíba do Sul, este apresentou um suporte de ramo fraco ($60 < BT < 67$). Nesse clado, dois grupos foram encontrados, sendo o mais basal denominado no presente estudo como clado D ou pelo BOLD como *Rineloricaria latirostris* e com um suporte de ramo fraco ($52 < BT < 63$), e o mais derivado foi denominado no presente estudo como clado E e pelo BOLD como *Rineloricaria* sp. 2, com um forte suporte de ramo ($BT = 100$).

As espécies *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2, *Rineloricaria* sp. 4 e *Rineloricaria* sp. n. não apresentaram uma condição monofilética, tendo sempre uma de suas populações (ou parte da população) mais relacionada com populações de outras espécies, corroborando assim os altos valores de divergência intra e interpopulacionais identificados para três dessas espécies.

Discussão

A ictiofauna da região Neotropical é a mais diversificada do mundo, com cerca de 4500 espécies descritas. Entretanto, estima-se que existam cerca de 4000 espécies de peixes neotropicais que ainda esperam para serem descobertas e catalogadas (Reis *et al.*, 2003). Dados da sequência de DNA do genoma mitocondrial, tais como o gene COI (Citocromo c Oxidase I), que representa o DNA *barcoding* de alguns grupos animais, tem sido considerada uma ferramenta rápida e eficaz, utilizada para resolver difíceis questões taxonômicas, entre elas, o diagnóstico de espécies, nos casos em que a

morfologia sozinha mostrou-se pouco resolutiva (Brown *et al.*, 1999; Mitchell e Samways, 2005).

Recentes estudos têm validado a eficácia do gene COI na identificação de espécies de peixes e no reconhecimento de espécies de peixes crípticas, já que o DNA *barcoding* separou corretamente, até o momento, 99% das espécies de peixes estudadas (Ward *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Ward, 2009; Ward *et al.*, 2009).

O BOLD (*Barcode of Life Data System*, Ratnasingham e Hebert, 2007), um banco de dados que contém cerca de 30000 sequências derivadas do COI, pertencentes a 5334 espécies de peixes, fornece uma segura identificação de amostras de peixes desconhecidas e é apontado como uma ferramenta de identificação de peixes mais eficiente do que o *GenBank*, uma vez que este último, também um banco de dados de sequências gênicas, possui cerca de 15000 sequências derivadas do Citocromo b, pertencentes a 3000 espécies de peixes, e estas, ao contrário do COI, não são sequências apropriadas para a identificação de espécies animais (Wong e Hanner, 2008; Ward *et al.*, 2009).

Revisões realizadas por Ward (2009) e Ward *et al.* (2009), utilizando sequências encontradas no BOLD, derivadas do COI e pertencentes a espécies de peixes, sugeriram uma forte correlação entre a taxonomia morfológica e a divergência molecular entre espécies congênicas, além de apontarem importantes intervalos nos valores de divergência para a discriminação de espécies, gêneros ou qualquer outro nível de hierarquia taxonômica, e que servem como diretrizes à utilização do DNA *barcoding* como auxílio na identificação de espécies de peixes de todo o mundo.

Segundo esses estudos, a variação nos valores de divergência intraespecífica em peixes pode estar entre 0 e 0,0299, a variação interespecífica pode ser de 0,3 a 0,1099 e, entre gêneros diferentes, a variação estaria entre de 0,11 e 0,2418. As variações nos

valores de divergência entre espécies de um mesmo gênero e entre espécies de gêneros diferentes, encontradas no presente trabalho, corroboram os padrões de variação estabelecidos nos trabalhos de Ward (2009) e Ward *et al.* (2009) para esses níveis taxonômicos de peixe. Entretanto, esses mesmos autores alertam, devido às exceções encontradas em seus trabalhos, que não existe um valor de distância absoluto que possa ser empregado como um forte critério para definir, principalmente, divergências interespecíficas e intraespecíficas.

Estudos morfológicos apresentaram propostas sobre o posicionamento de *Rineloricaria* entre outros gêneros na subfamília Loricariinae (Rapp Py-Daniel, 1997; Montoya-Burgos, *et al.*, 1998; Armbruster, 2004), gerando dúvidas quanto ao monofiletismo deste gênero. Todavia, Fichberg (2008), em um estudo filogenético incluindo 181 caracteres morfológicos e 36 espécies de *Rineloricaria*, recuperou o gênero *Rineloricaria* como um grupo monofilético. Apesar do baixo número de espécies estudadas no presente trabalho para o gênero, frente às 64 espécies que o compõe, os resultados aqui apresentados e referentes às variações nos valores de divergência e à condição monofilética do gênero, além da confirmação das identificações morfológicas, feita pela busca por sequências similares do gene COI no BOLD, reforçam a tese de que *Rineloricaria* é realmente um grupo natural.

Apesar da espécie *R. pentamaculata* ter sido identificada no BOLD como sendo *R. latirostris*, o valor de divergência entre as duas espécies, ambas estudadas no presente trabalho, é muito alto (0,71), sugerindo uma forte correlação entre a identificação morfológica feita *a priori* por taxonomistas especializados e a alta divergência molecular encontrada para essas espécies, e indicando um provável erro na discriminação de algumas sequências de COI depositadas no BOLD.

Conforme Ward (2009) e Ward *et al.* (2009), se duas sequências de COI, pertencentes a dois exemplares de peixes, são idênticas, a probabilidade de que esses

exemplares sejam de uma mesma espécie é de 99%. Os baixos valores de divergência intrapopulacionais encontrados no presente trabalho demonstram que os indivíduos pertencentes a uma mesma população são todos exemplares de uma mesma unidade taxonômica. Já o alto valor de divergência encontrado dentro da população que representa a espécie *Rineloricaria* sp. 2 pode indicar que os indivíduos que apresentaram o haplótipo I pertencem a uma espécie diferente daqueles que possuíam o haplótipo II, sendo essas espécies, portanto, simpátricas, sintópicas e morfologicamente muito semelhantes.

O alto valor de divergência observado entre as três populações de *Rineloricaria* sp. 1, e entre as duas populações de *Rineloricaria* sp. 4, bem como a condição não-monofilética dessas espécies, pode indicar que as populações que, segundo as análises morfológicas, pertencem a uma mesma espécie, fazem parte, na realidade, de espécies diferentes. De maneira oposta, valores de divergência interespecíficos muito baixos, encontrados no presente estudo e envolvendo as espécies *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2, *Rineloricaria* sp. 3, *Rineloricaria* sp. 4, *Rineloricaria* sp. 5, *Rineloricaria* sp. n. e *Rineloricaria* cf. *nigricauda*, bem como as relações evolutivas apresentadas entre essas espécies, apontam para uma realocação e uma sinonimização dessas espécies.

Podemos propor, com base nos resultados obtidos no presente estudo, uma redução no número das espécies de *Rineloricaria* estudadas de nove para seis, sinominizando então as espécies de acordo com o que foi atribuído quanto à denominação dos clados feita no BOLD. A exceção ficaria por conta da possível sinonimização de *R. pentamaculata* em *R. latirostris*, como sugerido no BOLD, pois, como já discutido, o alto valor de divergência entre as duas espécies reforça a identificação morfológica feita *a priori*, que demonstrou serem as duas espécies unidades taxonômicas diferentes.

Embora as árvores de distância baseadas nas divergências da sequência do gene COI não sejam primordialmente uma ferramenta filogenética, elas têm fornecido profundas relações evolutivas em alguns grupos de peixes, como notado em Ward *et al.* (2005) e Valdez-Moreno *et al.* (2009). Caso as espécies aqui propostas sejam de fato unidades taxonômicas verdadeiras, as relações filogenéticas estabelecidas entre essas espécies confirmam a hipótese de conexões pretéritas estabelecidas entre a Bacia do Paraíba do Sul, a Bacia Ribeira do Iguape e as pequenas drenagens independentes do Leste, já que as populações que compõem o clado A foram coletadas na Bacia do Paraíba do Sul e nas drenagens costeiras independentes do Estado do Rio de Janeiro, e as populações que compõem o clado B foram coletadas na Bacia Ribeira do Iguape e nas drenagens costeiras independentes do Estado do Paraná.

Apesar das propostas aqui apresentadas, é preciso ter cautela quando se trata da classificação de espécies baseada em sequências gênicas. Ward (2009) explica que espécies que apresentam um baixo valor de divergência do gene COI e que, por isso, não podem ser diferenciadas pela técnica do DNA *barcoding*, podem refletir uma recente especiação, uma inadequada caracterização taxonômica, ou ainda, hibridizações passadas e atuais. Quanto às profundas divergências intraespecíficas encontradas em algumas espécies de peixes, o autor alerta que análises detalhadas devem ser realizadas por taxonomistas especialistas antes que se possa confirmar ou rejeitar a hipótese de novas espécies.

As árvores filogenéticas geradas no presente estudo recuperaram relações evolutivas muito parecidas com as relações evolutivas encontradas na literatura entre espécies de Loricariinae e que foram recuperadas com base em dados morfológicos, indicando que o gene COI pode apresentar algum sinal filogenético. Os resultados aqui apresentados realçam os conflitos taxonômicos que vêm sendo apontados no gênero *Rineloricaria* ao longo dos anos, reforçando a ideia de que os dados morfológicos têm

gerado mais confusões ao invés de tentar elucidar a sistemática filogenética do gênero. Ao que tudo indica, *Rineloricaria* não deve ser um gênero tão especioso como é proposto e sim taxonomicamente complexo, e, antes de serem propostas novas espécies, o ideal seria que os pesquisadores fizessem uma análise conjunta de dados ecológicos, morfológicos e genéticos, para que a classificação proposta seja realmente robusta.

Contudo, o presente trabalho não teve por intenção descrever e nomear novas espécies de *Rineloricaria*, mas sim demonstrar a utilidade do DNA *barcoding* no auxílio à identificação e descrição dessas espécies, pois, apesar dos dados moleculares apresentarem um papel de extrema importância nas análises de biodiversidade, eles não devem substituir a taxonomia morfológica na identificação dos organismos. Ao contrário disso, os dados moleculares devem estar associados a dados morfológicos e ecológicos nos estudos taxonômicos, para uma rápida, eficiente e bem acurada identificação e descrição das espécies. Assim sendo, esperamos que esse trabalho venha a contribuir para a descrição de novas espécies de *Rineloricaria*, reduzindo os casos de espécies sinónimas e detectando casos de espécies crípticas. Esperamos ainda que nossos dados auxiliem na descrição do neótipo do gênero, descrição esta que se faz tão necessária para reduzir os conflitos taxonômicos encontrados em *Rineloricaria*.

Figura 6.1: Árvore de *neighbour-joining* utilizando modelo de distância K2P para sequências de COI pertencentes a espécies de Loricariinae. A topologia da árvore foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50. As barras e as letras maiúsculas, colocadas do lado direito da topologia da árvore, delimitam os cinco clados monofiléticos propostos no presente trabalho para as espécies de *Rineloricaria*.

Figura 6.2: Árvore de *neighbour-joining* em escala, com modelo de distância K2P em sequências de COI pertencente a espécies de Loricariinae. A topologia foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50.

Figura 6.3: Árvore de *neighbour-joining* utilizando modelo de distância K2P em sequências de COI pertencentes a espécies de Loricariinae. A topologia foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50. As barras e os nomes científicos, colocados do lado direito da topologia da árvore, delimitam os cinco clados monofiléticos propostos no presente trabalho para as espécies de *Rineloricaria* e denominados segundo o BOLD.

Figura 6.4: Árvore de *neighbour-joining*, com modelo de distância K2P, em sequências de COI pertencentes a todos os indivíduos analisados de cada população (ou populações) que representa(m) as espécies de Loricariinae estudadas no presente trabalho. A topologia foi gerada com valores de *bootstrap* acima de 50. Ao lado do nome das espécies está relacionado o número de tombo do Laboratório de Ictiogenética.

Tabela 6: Divergência genética do gene COI, baseada no modelo de distância K2P, entre as espécies de Loricariinae estudadas no presente trabalho

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,009															
2	0,202	0,000														
3	0,207	0,181	0,000													
4	0,192	0,175	0,071	0,000												
5	0,165	0,187	0,066	0,077	0,000											
6	0,162	0,190	0,071	0,077	0,005	0,000										
7	0,189	0,184	0,089	0,087	0,079	0,084	0,000									
8	0,179	0,187	0,094	0,099	0,079	0,084	0,079	0,000								
9	0,165	0,187	0,066	0,077	0,000	0,005	0,079	0,079	0,000							
10	0,179	0,187	0,094	0,099	0,079	0,084	0,079	0,000	0,079	0,000						
11	0,199	0,178	0,089	0,082	0,090	0,095	0,016	0,079	0,090	0,079	0,000					
12	0,179	0,187	0,094	0,099	0,079	0,084	0,079	0,000	0,079	0,000	0,079	0,000				
13	0,207	0,180	0,102	0,089	0,090	0,095	0,052	0,069	0,090	0,069	0,049	0,069	0,000			
14	0,195	0,181	0,097	0,090	0,079	0,084	0,047	0,061	0,079	0,061	0,044	0,061	0,009	0,006		
15	0,201	0,181	0,102	0,090	0,085	0,095	0,047	0,066	0,085	0,066	0,044	0,066	0,005	0,005	0,000	
16	0,192	0,188	0,092	0,090	0,082	0,087	0,002	0,082	0,082	0,082	0,018	0,082	0,054	0,049	0,049	0,000

1 = *Loricaria prolixa*, 2 = *Loricariichthys platymetopon*, 3 = *Rineloricaria latirostris*, 4 = *Rineloricaria pentamaculata*, 5 = *Rineloricaria* sp. 1 A, 6 = *Rineloricaria* sp. 1 B, 7 = *Rineloricaria* sp. 1 C, 8 = *Rineloricaria* sp. 2 I, 9 = *Rineloricaria* sp. 2 II, 10 = *Rineloricaria* sp. 3, 11 = *Rineloricaria* sp. 4 A, 12 = *Rineloricaria* sp. 4 B, 13 = *Rineloricaria* sp. 5, 14 = *Rineloricaria* sp. n. A, 15 = *Rineloricaria* sp. n. C, 16 = *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. Os números coloridos de azul indicam os altos valores de divergência interpoblacionais. Os números em verde indicam os baixos valores de divergência interespecíficos. O número destacado em vermelho indica um alto valor de divergência intrapoblacional em *Rineloricaria* sp. 2. A classificação dos valores de divergência (intra ou interpoblacionais e intra ou interespecíficos) como sendo altos ou baixos é baseada nos trabalhos de Ward (2009) e Ward *et al.* (2009), que utilizaram sequências do gene COI na identificação de espécies de peixes já descritas.

Capítulo V

Relações evolutivas entre espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste brasileiro.

Palavras-chave: PCR-RFLP, sequenciamento, DNAm, filogenia, evolução cromossômica, vicariância.

Abstract

With 64 species occurring from Costa Rica to northern Argentina and on both sides of the Andes, the genus *Rineloricaria* presents several taxonomic conflicts, beyond a great karyotypic diversity, proving to be an excellent animal model for evolutionary studies. Phylogenetic studies involving species of *Rineloricaria* were concerned, until recently, about discussing the positioning of the group in relation to other genera within the subfamily Loricariinae and hypotheses proposed in these studies were not consensual. The existence of hypotheses suggesting the subdivision of the genus has generated a need to develop proposals phylogenetic evidence corroborating or refute these hypotheses. The Upper Paraná Basin and the drainages of eastern Brazil have a high degree of endemism and its geological history, with its present conformation, not only acted but is still acting in the evolutionary history of species that compose its ichthyofauna. The present work aims to make the first investigation of phylogenetic relationships based on molecular data among species *Rineloricaria* of the Upper Paraná and the drainages of eastern Brazil, in the light of cytogenetic data in an attempt to integrate different approaches and elucidate the evolutionary questions of genus

Rineloricaria associated with these basins. The analysis recovered the genus *Rineloricaria* as monophyletic and corroborate the hypotheses proposed in Chapters I, III and IV of this dissertation. The provisions phylogenetic clades coincided with the topology generated by watershed groups, indicating that the geology of these basins covered directly in the process of diversification of these species. In the phylogenetic hypothesis presented here, *Rineloricaria latirostris* appears as the most basal species of the genus, reinforcing the hypothesis that the ancestral karyotype of a diploid number *Rineloricaria* have around 36 chromosomes and the karyotype evolution in the genus may have occurred from the increase the diploid number.

Resumo

Com 64 espécies ocorrendo desde a Costa Rica até o Norte da Argentina e em ambos os lados dos Andes, o gênero *Rineloricaria* apresenta diversos conflitos taxonômicos, além de uma grande diversidade cariotípica, demonstrando ser um excelente animal modelo para estudos evolutivos. Os estudos filogenéticos envolvendo espécies de *Rineloricaria* preocupavam-se, até pouco tempo, em discutir o posicionamento do grupo em relação a outros gêneros dentro da subfamília Loricariinae e as hipóteses propostas nesses estudos não eram consensuais. A existência de hipóteses sugerindo a subdivisão do gênero tem gerado uma necessidade em elaborar propostas filogenéticas que corroborem ou refutem tais hipóteses. A Bacia do Alto Paraná e as drenagens do Leste brasileiro apresentam um elevado grau de endemismo e sua história geológica bem como sua conformação atual, atuaram e continuam atuando na história evolutiva das espécies que compõem sua ictiofauna. O presente trabalho tem por objetivo fazer a primeira investigação das relações filogenéticas, com base em dados moleculares, entre espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste brasileiro, sob a luz de dados citogenéticos, na tentativa de integrar diferentes abordagens e elucidar as questões

evolutivas do gênero *Rineloricaria* associadas a essas bacias. As análises recuperaram o gênero *Rineloricaria* como monofilético e corroboraram as hipóteses propostas nos capítulos I, III e IV desta dissertação. As disposições filogenéticas dos clados na topologia gerada coincidiram com os agrupamentos por bacias, indicando que a formação geológica dessas bacias incidiu diretamente no processo de diversificação dessas espécies. Na hipótese filogenética aqui apresentada, *Rineloricaria latirostris* aparece como a espécie mais basal do gênero, reforçando a hipótese de que o cariótipo ancestral de *Rineloricaria* teria um número diplóide em torno de 36 cromossomos e que a evolução cariotípica no gênero pode ter ocorrido a partir do aumento no número diplóide.

Introdução

O gênero *Rineloricaria* é o gênero com maior número de espécies e que apresenta ampla distribuição dentro da subfamília Loricariinae, contando com 64 espécies já descritas ocorrendo desde a Costa Rica até o Norte da Argentina e em ambos os lados dos Andes (Covain e Fisch-Muller, 2007; Ferraris, 2007). Os integrantes desse gênero são animais de pequeno porte, que vivem em ambiente de corredeiras, fixados nas rochas e troncos, ou em remansos com fundo arenoso, ficando enterrados sob a areia (Oyakawa *et al.*, 2006).

Segundo Fichberg (2008), embora *Rineloricaria* se apresente como um gênero numeroso, somente cerca de 30% dos espécimes depositados nas coleções dos museus de zoologia está identificado, demonstrando uma dificuldade no reconhecimento das espécies com base apenas em caracteres morfológicos e uma subestimativa da real diversidade do gênero.

Entre os gêneros de Loricariinae que apresentam problemas taxonômicos, *Rineloricaria* se destaca pois, além da perda do holótipo da espécie tipo (*R. lima*), há a

ausência de parátipos e a falta de informações concretas sobre a localidade tipo, além do fato de muitas características diagnósticas de *Rineloricaria* serem válidas para os demais gêneros da subfamília (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008).

A complexidade envolvendo o gênero *Rineloricaria* não se restringe ao seu elevado número de espécies e sua ampla distribuição geográfica. Este gênero exhibe também um elevado nível de diversidade cariotípica, apresentando números cromossômicos variando de $2n=36$ cromossomos, em *R. latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998), a $2n=70$ cromossomos, em *Rineloricaria* sp. n. (Alves *et al.*, 2003; Capítulo I) e *R. strigilata* (Maia *et al.*, 2010). Contudo, embora haja evidências da participação de rearranjos Robertsonianos na evolução cariotípica do gênero, não há qualquer evidência que confirme a ordenação desses eventos. Ou seja, não é possível afirmar se o gênero vem sofrendo uma redução ou um aumento do número diplóide, ou ainda, se eventos sucessivos e alternados de aumento e diminuição no número cromossômico têm ocorrido no gênero.

Os estudos filogenéticos com base em dados morfológicos e envolvendo espécies de *Rineloricaria* preocupavam-se, até há pouco tempo, em discutir o posicionamento do grupo em relação a outros gêneros dentro da subfamília Loricariinae (Rapp Py-Daniel, 1997; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Armbruster, 2000; Armbruster, 2004; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008), e as hipóteses propostas nesses estudos não eram consensuais. Entretanto, a existência de hipóteses sugerindo a subdivisão do gênero (Isbrücker e Nijssen, 1976; Isbrücker *et al.*, 2001, Reis e Cardoso, 2001, Ferraris, 2007; Rodriguez e Reis 2008), levou à necessidade da elaboração de novas propostas filogenéticas que corroborassem ou refutassem tais hipóteses.

Diante dessa necessidade, Fichberg, em 2008, realizou a primeira investigação das relações filogenéticas internas do gênero *Rineloricaria*, e, ao incluir em sua análise,

181 caracteres morfológicos e 36 espécies de *Rineloricaria*, a autora recuperou o gênero *Rineloricaria* como um grupo monofilético.

Praticamente todos os trabalhos citogenéticos realizados no gênero *Rineloricaria* são de espécies que ocorrem na Bacia do Alto Paraná e nas drenagens do Leste brasileiro. Esses sistemas hidrográficos despertam um grande interesse, por parte dos ictiólogos, para estudos evolutivos, pois, além de apresentarem um elevado grau de endemismo, sua história geológica e sua conformação atual, atuaram e continuam atuando na história evolutiva das espécies que compõem sua ictiofauna.

O elevado número de espécies, a ampla distribuição geográfica, os diversos conflitos taxonômicos, a grande diversidade cariotípica e as dúvidas sobre sua condição monofilética, fazem do gênero *Rineloricaria* um interessante modelo animal para estudos evolutivos. De maneira mais restrita, o estudo das relações filogenéticas entre as espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste brasileiro podem ajudar a entender melhor a evolução cariotípica do gênero, além de permitir uma melhor investigação sobre as possíveis ligações pretéritas entre esses sistemas hidrográficos.

Como visto acima, estudos filogenéticos que investiguem as relações evolutivas entre as espécies do gênero *Rineloricaria* são raros, e o uso de dados moleculares que recuperem essas relações filogenéticas não existe na literatura. Assim sendo, o presente trabalho tem por objetivo investigar as relações filogenéticas entre espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste brasileiro, com base em dados moleculares e sob a luz dos dados citogenéticos apresentados nos capítulos I e III desta dissertação, tentando integrar diferentes abordagens e elucidar as questões evolutivas do gênero *Rineloricaria* associadas a essas bacias.

Materiais e métodos

As espécies *R. latirostris*, *R. pentamaculata*, *Rineloricaria* sp. n., *R. cf. nigricauda* e *Rineloricaria* sp. 1-5 foram analisadas no presente trabalho, sendo doze populações estudadas nas análises de PCR-RFLP (de dois a trinta indivíduos por população) e treze populações estudadas nas análises de sequenciamento (dois indivíduos por população). A espécie *Rineloricaria* sp. 1 é representada por três populações nessa dissertação, mas somente as populações A e C tiveram o gene ATPase digerido por enzimas de restrição. O mesmo ocorre com a espécie *Rineloricaria* sp. n., que, embora seja representada por três populações nessa dissertação, somente as populações A e C tiveram o gene ATPase e Citocromo b sequenciados. Informações detalhadas sobre o tamanho de cada população e as técnicas moleculares utilizadas, bem como detalhes sobre os locais de coleta, estão disponíveis na tabela 3.

Para a amplificação dos genes mitocondriais ATPase 6 e 8 e Citocromo b, amostras de tecido (fígado, músculo ou nadadeira), preservadas em etanol absoluto, foram utilizadas para a extração de DNA genômico total, seguindo o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez, 1997).

Para a amplificação do gene ATPase 6 e 8, foi utilizado o par de *primers* ATP8.2-L8331 (5' – AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC – 3') e CO3.2-H9236 (5' – GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C – 3') (Sivasundar *et al.*, 2001) e, para a amplificação do gene Citocromo b, utilizou-se o par de *primers* GluDG.L (5'-TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG-3') e H16460 (5'-CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G-3') (Perdices *et al.*, 2002).

Cada reação de PCR apresentou um volume final de 25 µL contendo: 1 µL de DNA molde (10ng/µL), 1 µL de cada *primer* (10 pM), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão (10x), 2,5 µL de dNTP (10 µM), 0,25 µL (5U) de Taq polimerase -

Fermentas® e 15,25 µL de água destilada. As concentrações entre parêntesis referem-se às concentrações de cada solução usada e não à concentração da solução final. As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research®.

As condições de amplificação do gene Citocromo b foram as seguintes: 4 minutos a 94° C, cinco ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 50° C e 90 segundos a 72° C, 40 ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 53° C e 90 segundos a 72° C, um período de extensão final de 10 minutos a 72° C e um período de resfriamento a 4° C. Já as condições de amplificação do gene ATPase 6 e 8 foram as descritas a seguir: 4 minutos a 94° C, cinco ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 53° C e 90 segundos a 72° C, 40 ciclos de: 30 segundos a 92° C, 30 segundos a 56° C e 90 segundos a 72° C, um período de extensão final de 10 minutos a 72° C e um período de resfriamento a 4° C.

Para a confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizadas em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak® (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

Análise de PCR-RFLP

Na análise de PCR-RFLP, um mix de solução com enzima de restrição, contendo 1,0 µL de tampão específico, 0,3 µL de enzima e 5,7 µL de água destilada, foi adicionado a 3,0 µL do produto de amplificação do gene mitocondrial ATPase 6 e 8 (200ng/µL), a fim de digeri-lo. As enzimas utilizadas foram *Alu* I, *Eco* RI, *Hae* III, *Hind* III, *Mbo* I e *Rsa* I, todas da marca Fermentas®.

Os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta, fotografados e digitalizados pelo programa Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak®).

Com base nos padrões de digestão obtidos, foram construídos mapas de restrição para cada haplótipo e uma matriz de presença/ausência de sítio de corte foi gerada a partir dos padrões de restrição encontrados. Cada padrão de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição obtido para cada enzima foi nomeado com uma letra, sendo que cada haplótipo foi representado por um conjunto de letras baseado na ordem alfabética das enzimas de restrição.

A partir da matriz obtida, foram calculados os valores de diversidade e divergência nucleotídica observados entre as populações e espécies. Também foram calculados os valores de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica dentro das amostras, segundo o modelo de Nei e Tajima (1981) utilizando o programa REAP (Restriction Enzyme Analysis Package) (McElroy *et al.*, 1992). Com base nesses dados, foi construído um fenograma de UPGMA utilizando o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007) para a determinação das relações evolutivas entre as espécies e populações estudadas.

Análises de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit “BigDye Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems). Cada reação apresentou um volume final de 10 µL contendo: 1,0 µL da reação de PCR, 2µL Sequencing Buffer, 0,5µl de primer [10pM], 5,5 µL de água destilada, 1µL BigDye® Terminator v3.1. As condições de amplificação consistiram em 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após o término do ciclo de Big Dye, os produtos foram precipitados

e sequenciados em um sequenciador modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI®).

As sequências obtidas foram visualizadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e para obtenção das sequências consenso entre as sequências da cadeia leve e pesada do DNAm_t, fez-se uso da versão Trial do programa Geneious 3.8.5. Todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W v1.6 (Thompson *et al.*, 1994), com o auxílio do programa Geneious 3.8.5, aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (10) e extensão de *gaps* (0,2).

Após o alinhamento e com a ajuda do programa Geneious 3.8.5, o quadro de leitura foi verificado, uma vez que a tradução dos códons das sequências codificadoras possibilita a detecção de erros. As sequências foram verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do programa “BlastN”, que investiga a similaridade de sequências obtidas com sequências de DNAm_t de outros peixes já disponíveis. Para verificação do nível de saturação de substituições nos genes estudados foi utilizado o programa DAMBE (Xia e Xie, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), que possibilitou a construção de gráficos que explanam a quantidade de transições (TS) e transversões (TV) com relação à distância genética entre os táxons.

A construção de dendrogramas baseados no algoritmo de agrupamento de vizinhos “Neighbor Joining”- NJ (Saitou e Nei, 1987) foi feita por meio do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007) associado ao modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), que considera as diferenças entre as taxas de transições e transversões, assim como as diferenças quanto ao conteúdo de bases CG. Testes de *bootstrap* (BT)

(Felsenstein, 1985) de 10000 replicações foram efetuados para a árvore NJ construída, sendo que os valores inferiores a 50% foram desconsiderados.

As espécies *Harttia* sp. n., *Loricaria prolixa* e *Loricariichthys platymetopon* foram escolhidas como grupos externos em todas as análises filogenéticas, que por sua vez, foram realizadas com as regiões gênicas separadas e concatenadas. As análises foram realizadas por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com algoritmo “tree bisection and reconnection” (TBR), sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram considerados como dados ausentes. Foram calculados os índices de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência reescalado (CR) por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002). O programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999) foi empregado para a obtenção do índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994). A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado foi realizada pelo programa MODELTEST 3.0 (Posada e Crandall, 1998). Para a determinação dos valores de *bootstrap* foram utilizadas 1000 replicações, respectivamente, com retenção de grupos com frequência maior que 50%.

Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram classificados como sendo muito fracos e não foram aqui considerados. Entre os valores de *bootstrap* considerados os valores entre 50 e 70 foram tratados como fracos, entre 70 e 90 bons e valores iguais ou superiores a 90 foram considerados fortes (Schneider, 2007).

Resultados

Análises de PCR-RFLP

A amplificação do gene ATPase gerou um fragmento de aproximadamente 950 pares de bases, que foi digerido pelas seis enzimas de restrição utilizadas, e essas

digestões produziram fragmentos que geraram de três a onze perfis de restrição por enzima (figura 7.1, Anexo I) e 21 haplótipos conjugados (Tabela 7).

Variações haplotípicas intrapopulacionais foram encontradas para *Loricariichthys platymetopon*, *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2, *Rineloricaria* sp. n. e *Rineloricaria* cf. *nigricauda*. Entretanto, mesmo que uma mesma população apresentasse mais de um tipo de haplótipo conjugado, esses foram semelhantes o bastante para que as diferenças entre eles não fossem consideradas significativas a ponto de fragmentar os indivíduos dessas populações em grupos distintos.

Tabela 7: Frequências absoluta e relativa dos haplótipos conjugados encontrados para as populações/espécies analisadas no presente trabalho.

Espécie	Haplótipo	<i>Alu</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I	F. A.	F. R.
<i>Loricaria prolixa</i> - Pop. A	1	K	B	E	G	C	I	2	1
<i>Loricaria prolixa</i> - Pop. B	2	K	B	E	F	C	I	8	1
<i>Loricaria prolixa</i> - Pop. C	1	K	B	E	G	C	I	20	1
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	3	F	A	I	H	D	F	1	0,08
	4	J	A	J	K	C	I	14	0,92
<i>Rineloricaria latirostris</i>	5	B	A	I	F	C	E	13	1
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	6	D	A	F	I	C	F	6	1
<i>Rineloricaria</i> sp. 1 - Pop. A	7	H	C	B	C	C	C	10	0,91
	8	H	C	B	C	A	G	1	0,09
<i>Rineloricaria</i> sp. 1 - Pop. C	9	E	A	C	D	C	B	6	0,85
	10	E	C	F	J	C	I	1	0,15
<i>Rineloricaria</i> sp. 2	7	H	C	B	C	C	C	3	0,6
	11	E	C	C	D	C	E	2	0,4
<i>Rineloricaria</i> sp. 3	11	E	C	C	D	C	E	7	1
<i>Rineloricaria</i> sp. 4 - Pop. A	12	I	A	H	A	B	E	10	1
<i>Rineloricaria</i> sp. 4 - Pop. B	11	E	C	C	D	C	E	4	1
<i>Rineloricaria</i> sp. 5	13	G	C	A	E	C	D	9	1
<i>Rineloricaria</i> sp. n. - Pop. A	14	A	A	A	B	C	D	15	0,45
	15	A	A	D	B	C	D	15	0,45
	16	A	A	A	B	C	A	2	0,06
	17	A	A	D	B	C	H	1	0,04
<i>Rineloricaria</i> sp. n. - Pop. C	18	A	C	C	B	C	D	1	0,5
	19	A	C	G	B	D	D	1	0,5
<i>Rineloricaria</i> cf. <i>nigricauda</i>	20	E	A	C	E	C	B	34	0,97
	21	C	A	I	F	C	E	1	0,03

POP. = População, F. A. = Frequência Absoluta, F. R. = Frequência Relativa.

Variações haplotípicas interpopulacionais foram identificadas para todas as espécies que tiveram mais de uma população amostrada. Em alguns casos foram encontrados haplótipos compartilhados entre espécies diferentes, sendo esse compartilhamento observado para *Rineloricaria* sp. 1 A e parte da população de *Rineloricaria* sp. 2, e entre *Rineloricaria* sp. 3, *Rineloricaria* sp. 4 B e o restante da população de *Rineloricaria* sp. 2.

A árvore filogenética de UPGMA (figura 7.2), obtida com base na análise de ausência/presença dos sítios de restrição e a partir do modelo de Nei e Tajima (1981), apresentou, em sua topologia, o clado formado pelas três populações de *Loricaria prolixa* posicionando-se na base da árvore, seguido por *Loricariichthys platymetopon*. O gênero *Rineloricaria* foi recuperado como monofilético, apresentando a espécie *Rineloricaria* sp. 5 como grupo basal, seguido do pequeno clado formado por *Rineloricaria* sp. 1 A e *Rineloricaria* sp. 2., que, por sua vez, foi seguida por *Rineloricaria latirostris*. *Rineloricaria* sp. 4 A apareceu em seguida nessa topologia de árvore e foi seguida por *Rineloricaria pentamaculata*. Entre as espécies do gênero *Rineloricaria* que apareceram em posição mais derivada estão os clados *Rineloricaria* sp. n. A e C, *Rineloricaria* sp. 3 e 4 B, e *Rineloricaria* cf. *nigricauda* e *Rineloricaria* sp. 1 C. Entre as espécies que foram representadas por duas ou mais populações, as espécies *Rineloricaria* sp. 1 e 4 apresentaram uma condição parafilética, demonstrando que as variações haplotípicas interpopulacionais apresentaram valores de divergência significativos.

Análises de sequenciamento

Dos 950 pares de bases obtidos a partir da amplificação do gene ATPase 6 e 8, 825 pares de bases foram efetivamente utilizados para as análises filogenéticas. Quanto ao gene Citocromo b, dos 1200 pares de bases obtidos com a amplificação, 1101 pares

de bases foram aproveitados nas análises de sequências. Após a obtenção da sequência consenso, foi realizada a tradução dessas em sequências de aminoácidos, de forma que não foram observados códons de parada. Todas as sequências foram comparadas no GenBank com a ferramenta BlastN.

Como os dois indivíduos amostrados por população compartilhavam o mesmo haplótipo, optou-se pela retirada de um deles na realização da reconstrução filogenética final, de modo que cada população foi representada por um único indivíduo. A exceção ficou por conta de *Rineloricaria* sp. 2, que apresentou dois tipos de haplótipos com diferenças significativas para os dois genes estudados, e ambos foram mantidos nas análises, sendo aqui denominados de *Rineloricaria* sp. 2 I e *Rineloricaria* sp. 2 II.

A caracterização da informação filogenética contida em cada uma das partições mitocondriais empregadas no presente estudo encontra-se disponível na Tabela 8. A verificação do grau de saturação, obtida pela curva de substituição através da plotagem do número de transições e transversões *versus* a distância genética, não evidenciou saturação para os genes ATPase 6 e 8, Citocromo b e para as sequências concatenadas (Figura 7.3).

As reconstruções filogenéticas obtidas a partir dos critérios de NJ e MP foram empregadas, a princípio, para cada gene em separado (dados disponíveis no Anexo II), e as topologias recuperadas foram então comparadas com a finalidade de identificar possíveis conflitos. Como esses conflitos não foram encontrados, partiu-se então para a análise simultânea das sequências combinadas.

As árvores geradas nas análises de NJ (figura 7.4) e MP (figura 7.5) apresentaram as mesmas relações entre as espécies, com exceção de *Loricaria prolixa* e *Loricariichthys platymetopon*, cujas relações evolutivas não puderam ser estabelecidas na análise de NJ, já para a análise de MP esses grupos mostraram-se mais relacionados,

formando um clado único. Entre as espécies utilizadas como grupo externo, *Harttia* sp. n. posicionou-se como o grupo mais basal nas árvores geradas em ambas as análises. A topologia de árvore gerada pela análise de MP apresentou um maior suporte de ramos quando comparada com os valores de sustentação da árvore de NJ..

Tabela 8: Caracterização da informação filogenética contida em cada um dos genes mitocondriais estudados.

	ATPase 6 e 8	Citocromo b	Regiões Concatenadas
Nº total de sítios	825	1101	1926
Nº de sítios conservados	561	743	1319
Nº de sítios informativos para parcimônia	151	215	364
Composição nucleotídica			
% A	33,52	28,36	30,51
% C	27,19	30,43	29,42
% G	10,43	12,85	11,66
% T	28,86	28,35	28,41
Razão Ti/Tv	2,17	2,654	2,456
Nº de árvores obtidas	2	1	1
Nº de passos	444	628	1058
IC	0,712	0,697	0,696
IR	0,694	0,697	0,691
ICR	0,494	0,486	0,481

Ti – transições; Tv – transversões; IC – índice de consistência; IR – índice de retenção; ICR – índice de consistência rescalonado.

Em ambas as análises, o gênero *Rineloricaria* foi recuperado como monofilético, com um alto valor de suporte de ramos (100% *bootstrap*; 31 índice de Bremer).

Dentre as diferentes espécies analisadas no presente estudo, *Rineloricaria latirostris* ocupou a posição mais basal dentro do gênero, sendo seguida por *Rineloricaria pentamaculata*. As demais espécies foram agrupadas em quatro clados menores, os chamados: 1) clado A, o mais derivado, composto por *Rineloricaria* sp. 1 C, *Rineloricaria* sp. 4 A e *Rineloricaria* cf. *nigricauda*; 2) clado B, formado por *Rineloricaria* sp. 5 e *Rineloricaria* sp. n. (A e C), o qual se mostrou grupo-irmão do

clado A; 3) clado C, representado por *Rineloricaria* sp. 2 I, *Rineloricaria* sp. 3 e *Rineloricaria* sp. 4 B; 4) clado D, formado pelas populações de *Rineloricaria* sp. 1 (A e B) e *Rineloricaria* sp. 2 II.

As populações analisadas de *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2 e *Rineloricaria* sp. 4 mostraram-se mais relacionadas com outras espécies do gênero do que com outras populações da mesma espécie, apresentando uma condição parafilética em ambas as análises.

As espécies que ocuparam uma posição mais basal na topologia gerada (em sequência do basal para o derivado: *Harttia* sp. n., *Loricaria prolixa* + *Loricariichthys platymetopon*, *Rineloricaria latirostris*, *Rineloricaria pentamaculata*) são todas pertencentes à Bacia do Alto Paraná. O grupo irmão de *Rineloricaria pentamaculata*, o grande clado formado pelas demais espécies de *Rineloricaria*, teve seu grupo mais basal (clado D) composto por espécies pertencentes à Bacia do Rio Paraíba do Sul, e com relação aos seus clados mais derivados, o clado C foi constituído por espécies pertencentes à Bacia do Rio Paraíba do Sul e o clado B + clado A foram formados por espécies coletadas nas bacias do Paraíba do Sul, do Ribeira do Sul e nas drenagens costeiras independentes.

Discussão

Sequências de DNA mitocondrial têm sido utilizadas para inferir filogenias e padrões filogeográficos das mais diversas espécies de peixes (Bermingham e Martin, 1998; Inoue *et al.*, 2001; Sivasundar *et al.*, 2001; Perdices *et al.*, 2002; Moyses, 2005; Kon *et al.*, 2007; Kavalco, 2008; Garcia, 2009; entre outros). O presente trabalho apresenta, pela primeira vez, hipóteses sobre as relações filogenéticas de espécies de *Rineloricaria* pertencentes às drenagens do sul e sudeste do Brasil, com base em dados moleculares. Embora este trabalho não tenha analisado regiões do genoma mitocondrial

de todas as espécies de *Rineloricaria* dessas drenagens, tampouco tenha amostrado metade das 64 espécies descritas no gênero, a quantidade de espécies estudadas é significativa para a elaboração de hipóteses evolutivas.

As tribos Harttiini e Loricariini, que constituem, segundo algumas propostas filogenéticas, a subfamília Loricariinae (Rapp Py-Daniel, 1997; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008), foram recuperadas como monofiléticas no presente trabalho. Além disso, a posição basal de *Harttia* na filogenia de Loricariinae, proposta por esses mesmos autores, é corroborada em nossas análises.

Rodriguez e Reis (2008) propõem a divisão de *Rineloricaria* ao reconhecer a revalidação do gênero *Hemiloricaria*, feita por Isbrücker *et al.* (2001), considerando que *Hemiloricaria* corresponderia ao grupo de espécies de *Rineloricaria* distribuídas por toda a América do Sul, exceto a bacia do Alto Paraná e as drenagens costeiras do Atlântico, e que as espécies pertencentes ao gênero *Rineloricaria* propriamente dito estariam restritas à bacia do Alto Paraná e às drenagens costeiras do Atlântico. Contudo, ainda que algumas características diagnósticas de *Hemiloricaria* estejam presentes em espécies de *Rineloricaria* e que Fichberg (2008), em seu estudo filogenético, tenha recuperado espécies de *Rineloricaria* distribuídas por toda a América do Sul como um grupo monofilético, os resultados aqui obtidos referentes à condição monofilética do gênero reforçam a hipótese de que ao menos as espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná e das drenagens costeiras do Atlântico formam um grupo monofilético.

Os clados A, B, C e D, apresentados, no presente trabalho, a partir das análises de sequências, foram muito semelhantes aos clados recuperados na hipótese filogenética gerada com base nas sequências do gene COI (Capítulo IV), apresentando as mesmas relações internas, reforçando a hipótese sugerida naquele capítulo de que o gene COI

pode apresentar algum sinal filogenético e corroborando a hipótese de sinonimização proposta para as espécies que compõem esses clados.

A condição parafilética apresentada por algumas espécies já havia sido registrada nas análises com sequências do gene COI, reforçando a necessidade de uma revisão taxonômica em *Rineloricaria*. Além disso, a condição parafilética da população que representa a espécie *Rineloricaria* sp. 2, bem como a maior proximidade filogenética dos haplótipos I e II desta espécie com as espécies *Rineloricaria* sp. 1 e *Rineloricaria* sp. 3, respectivamente, corroboram a proposta de que os citótipos A, B e C, encontrados entre os representantes de *Rineloricaria* sp. 2 (Capítulo I), podem indicar que parte dessa população pertença à *Rineloricaria* sp. 1, enquanto que a outra parte da população pertença a *Rineloricaria* sp. 3.

O monofiletismo evidenciado nas populações A e B de *Rineloricaria* sp. 1, bem como as mesmas características citogenéticas encontradas para essas populações (Capítulo I), apontam os dados citogenéticos como importante ferramenta taxonômica para a identificação de espécies. Entretanto, embora a população A de *Rineloricaria* sp. n. apresente dois citótipos, as sequências dos genes ATPase e Citocromo b, bem como as sequências do gene COI (Capítulo IV) não apontaram divergências genéticas significativas suficientes para propor uma divisão dessa população, divisão esta a compor espécies diferentes.

Embora as variações haplotípicas identificadas na população de *Rineloricaria* sp. 2 não tenham sido suficientes para separar esta população a partir da técnica de PCR-RFLP, essas diferenças corroboraram as variações haplotípicas encontradas nas análises de sequências dos genes Citocromo b e COI, sendo mais acentuadas na análise da sequência do gene ATPase. Além disso, a topologia gerada a partir das análises de PCR-RFLP diferiu ligeiramente das topologias baseadas em dados de sequências, mas

muitos grupos foram recuperados com as mesmas relações internas e em uma mesma posição na árvore. Isso indica que as análises de PCR-RFLP, mesmo sendo menos refinadas do que as análises de sequenciamento, recuperam praticamente as mesmas relações filogenéticas propostas a partir de sequências do gene, mostrando-se uma técnica muito mais barata e extremamente eficiente, permitindo analisar um maior número de indivíduos simultaneamente.

A sutil diferença apresentada entre as topologias de árvores obtidas com base na análise de sequências, principalmente a sequência do gene ATPase 6 e 8, em relação à topologia obtida a partir da análise de PCR-RFLP, pode ser explicada pela escolha do grupo externo, pois a espécie *Harttia* sp. n., incluída nas análises de sequenciamento, não foi utilizada na análise de PCR-RFLP e pode ter influenciado diretamente as relações internas obtidas nas topologias de árvore geradas a partir das sequências dos genes aqui estudados.

O grande clado constituído pelos clados A, B, C e D é formado por espécies pertencentes às drenagens do Leste brasileiro, indicando uma estreita relação entre as espécies de *Rineloricaria* oriundas do Rio Paraíba do Sul, Ribeira do Iguape e pequenas drenagens independentes e corroborando a hipótese de ligação pretérita e de eventos de captura de cabeceiras estabelecido entre essas subbacias (Langeani, 1989; Weitzman e Malabarba, 1999; Ribeiro, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2007). Garcia (2009), em sua tese de doutoramento, identificou uma estreita relação filogenética entre espécies de *Rhamdia* coletadas nas bacias do Paraíba do Sul e do Ribeira do Iguape, associando também os seus achados à história geológica comum entre estas duas bacias.

As relações filogenéticas aqui obtidas sugerem que a Bacia do Alto Paraná teria dispersado suas espécies de *Rineloricaria* por toda a extensão das drenagens do Leste brasileiro, através das ligações passadas e dos eventos de captura de cabeceiras,

estabelecidos entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (Ab'Saber, 1998; Malabarba, 1998; Castro *et al.*, 2003), originando, assim, toda a fauna de *Rineloricaria* encontrada nas drenagens do Leste brasileiro.

A condição basal das espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná bem como a condição derivada das espécies de *Rineloricaria* das drenagens do Leste brasileiro, parece estar refletindo a idade geológica dessas bacias, uma vez que a Bacia do Paraná foi originada no início do Devoniano, muito antes da formação das drenagens do Leste brasileiro, que ocorreu entre o Terciário e o Quaternário. Resultados parecidos foram obtidos por Kavalco (2008), em sua tese de doutoramento, na qual estudou as relações filogenéticas, com base em genes mitocondriais, entre espécies de *Astyanax* pertencentes a essas bacias.

A figura 7.6 apresenta uma sobreposição de informações relacionadas a eventos geológicos que teriam potencialmente influenciado na divergência dos agrupamentos monofiléticos que compõem a topologia proposta a partir da análise de MP. Assim sendo, a divergência apontada na filogenia aqui proposta e que demonstra a separação entre as espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná das espécies de *Rineloricaria* das drenagens do Leste brasileiro, pode ter sido influenciada por eventos de vicariância tais como os soerguimentos que resultaram na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira. Do mesmo modo, a diversificação das espécies que compõem as drenagens do Leste brasileiro pode ter sido provocada pelas variações no nível do Oceano Atlântico, que teria ocorrido no período Quaternário, resultando nas pequenas drenagens independentes encontradas nos litorais do Sul e Sudeste do Brasil.

As relações recuperadas nas análises de sequenciamento corroboram a hipótese de grupos naturais formados a partir de eventos vicariantes que permitiram o diferenciamento da constituição cromossômica, principalmente do número diplóide

(Capítulo I), já que o clado maior, constituído pelos pequenos clados A, B, C e D, é composto por espécies com número diplóide acima de 60 cromossomos (figura 7.7). Além disso, na hipótese filogenética aqui apresentada, *Rineloricaria latirostris* aparece como a espécie mais basal do gênero, reforçando a hipótese de que o cariótipo ancestral de *Rineloricaria* teria um número diplóide em torno de 36 cromossomos e que a evolução cariotípica no gênero se deu a partir do aumento no número diplóide (Capítulo I).

Quanto à quantidade de sítios de DNAr 5S, ao que tudo indica, houve uma tendência na diminuição no número de sítios, que teriam ocorrido mais de uma vez e de maneira independente entre as espécies aqui estudadas. Além disso, essa diminuição pode não estar relacionada com a diminuição do número diplóide e, conseqüentemente, as translocações Robertsonianas, uma vez que espécies que apresentaram tanto altos quanto baixos números diplóides, apresentaram um elevado número de sítios de DNAr 5S.

As discussões aqui apresentadas representam a primeira abordagem filogenética, com um plano de fundo formado por informações biogeográficas e citogenéticas, das relações evolutivas específicas de espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Alto Paraná e das drenagens do Leste brasileiro. A divergência genética das sequências mitocondriais aqui estudadas está de acordo com a divergência das sequências do gene COI (Capítulo IV) e as divergências cariotípicas identificadas nos Capítulos I e III dessa dissertação, para as espécies de *Rineloricaria* do Alto Paraná e do Leste brasileiro, indicando que todos esses caracteres estão, possivelmente, sofrendo uma seleção, provavelmente positiva, ao longo da história evolutiva do gênero. Além disso, a congruência reconhecida entre o tempo geológico das bacias estudadas e a condição basal ou

derivada das espécies, mostram que a formação geológica dessas bacias pode ter atuado diretamente no processo de diversificação dessas espécies.

Nossos resultados indicam que os dados moleculares mostraram ser mais resolutivos nas questões filogenéticas entre as espécies de *Rineloricaria* quando comparados com as análises filogenéticas realizadas a partir de dados morfológicos no trabalho de Fichberg (2008), já que a hipótese filogenética proposta no trabalho de Fichberg, embora tenha recuperado o gênero *Rineloricaria* como um grupo monofilético, não resolveu, ao contrário do presente trabalho, as relações internas do gênero.

Embora as hipóteses aqui apresentadas não representem toda a história evolutiva do gênero *Rineloricaria*, as relações aqui propostas fornecem ao menos uma filogenia parcial do gênero. Entretanto, como o presente estudo não abrange todas as espécies que compõem o gênero, não se pode descartar a hipótese de que estamos estudando as relações evolutivas de grupos que podem não ser naturais. Assim sendo, as hipóteses apresentadas no Capítulo I e que foram aqui reforçadas só serão confirmadas com uma análise que englobe ao menos 70% das espécies de *Rineloricaria*, utilizado vários caracteres morfológicos e moleculares, e cujo cariótipo já esteja descrito. Com isso, esperamos que nossos resultados sejam o princípio de um estudo de maior aprofundamento no entendimento da história evolutiva do gênero *Rineloricaria*.

Figura 7.1: Mapas de restrição construídos com base nos sítios de cortes apresentados para cada enzima utilizada. As letras representam os haplótipos atribuídos para cada padrão de restrição encontrado.

Figura 7.2: Árvore UPGMA construída com base nos haplótipos conjugados obtidos pela técnica de PCR-RFLP dos genes mitocondriais ATPase 6 e 8.

Figura 7.3: Gráficos da frequência observada de transições e transversões *versus* a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para os genes (A) ATPase 6 e 8, (B) Citocromo b, (C) todas as regiões gênicas concatenadas.

Figura 7.4: Topologia de Neighbor-Joining obtida para as duas regiões gênicas concatenadas. Os valores de *bootstrap* para 10000 replicações encontram-se acima dos ramos.

Figura 7.5: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas. Os valores em preto correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em vermelho aos valores de índice de Bremer.

Figura 7.6: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas e com a sobreposição dos possíveis eventos vicariantes. Os valores em preto correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em vermelho aos valores de índice de Bremer.

Figura 7.7: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas e com a sobreposição dos dados citogenéticos. Os valores em preto correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em vermelho aos valores de índice de Bremer.

Conclusões Gerais

A Bacia do Alto Paraná e as drenagens do Leste brasileiro constituem sistemas hidrográficos que despertam um grande interesse, por parte dos ictiólogos, para estudos evolutivos, pois, além de apresentarem um elevado grau de endemismo, suas interessantes histórias geológicas atuaram e continuam atuando na história evolutiva das espécies que compõem sua ictiofauna.

Embora represente um grupo monofilético, os dados citogenéticos indicam que a subfamília Loricariinae apresenta-se como um grupo heterogêneo e diversificado e muitos conflitos taxonômicos são identificados na subfamília. Além de ser o maior e mais amplamente distribuído gênero de Loricariinae, *Rineloricaria* é também aquele que possui os maiores conflitos taxonômicos bem como a maior diversidade cariotípica da subfamília, apresentando-se como um interessante modelo animal para estudos evolutivos.

Apesar da importância dos estudos filogenéticos, taxonômicos e citogenéticos em espécies de Loricariinae, poucos são os trabalhos que discutem as relações evolutivas desse grupo. Além disso, hipóteses sobre as relações filogenéticas entre as espécies que compõem *Rineloricaria* só foram propostas por Fichberg (2008), com base em dados morfológicos, sendo que os dados moleculares nunca foram utilizados para resolver as relações internas do gênero. Assim sendo, o presente trabalho teve a proposta de estudar as relações evolutivas entre espécies de Loricariinae, com um enfoque maior nas problemáticas apresentadas pelo gênero *Rineloricaria* e lançando mão de diferentes abordagens, algumas inéditas, tais como as análises de sequências de genes mitocondriais. Essas abordagens foram utilizadas para o estudo da diversidade genética, das implicações taxonômicas, das relações filogenéticas e da evolução cariotípica dessas espécies, tendo, sempre que possível, um plano de fundo formado por informações biogeográficas e geológicas, associadas às informações sobre a ecologia de Loricariinae.

A integração de todas essas abordagens nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- As topologias de árvores obtidas com base nas análises de genes mitocondriais, recuperaram as espécies de *Rineloricaria* que ocorrem nas drenagens do Alto Paraná e do Leste brasileiro como um grupo monofilético, corroborando a hipótese de que o gênero *Rineloricaria* possa ser de fato um grupo natural, corroborando também a hipótese de que Loricariinae é constituída pelas tribos Hartiini e Loricaricariini.
- O fato de grandes quantidades de heterocromatina ser considerada uma condição ancestral em Loricariidae (Kavalco *et al.*, 2004b), bem como o fato de *Harttia*, o gênero que se encontra em posição mais basal na subfamília Loriicariinae, apresentar uma quantidade considerável de heterocromatina em comparação aos demais gêneros da subfamília, indica que a evolução do genoma dos representantes de Loricariinae pode ter ocorrido no sentido da redução do acúmulo das regiões heterocromáticas.
- A heterocromatina constitutiva das espécies de Loricariinae é encontrada, geralmente, entre os genes ribossomais, e seu constante estado de condensação pode levar a uma futura inativação desses genes, demonstrando um papel de extrema importância na organização do genoma e na evolução desses peixes.
- A localização da família multigênica 45S em um único locus, em posição terminal no braço curto de cromossomos de tamanho grande a médio do tipo subtelocêntrico/acrocêntrico, é uma característica compartilhada por quase todos os loricariíneos, indicando ser esta uma característica ancestral bem sucedida em Loricariinae. Além disso, o caráter “posição intersticial” da família multigênica 45S pode ter surgido várias vezes em Loricariinae.
- A organização sintênica dos genes ribossomais 45S-5S, identificada nos gêneros *Harttia* e *Loricariichthys*, é uma situação rara em peixes e teria surgido de modo independente em Loriicariinae, ou ainda, seria uma condição ancestral de Loricariinae que teria se perdido nos gêneros mais derivados, como por exemplo *Rineloricaria*, reaparecendo em algumas espécies de *Loricariichthys*.

- Martins e Galetti Jr. (2001) propuseram que a localização intersticial do gene DNAr 5S atua como forma de defesa contra rearranjos que poderiam alterar a função deste gene tão importante. Entretanto, a maioria das espécies de Siluriformes que tiveram essa região gênica mapeada em seu cariótipo (assim como todas as espécies de *Rineloricaria* que tiveram esse gene localizado no presente trabalho) apresentaram o DNAr 5S em posição terminal, indicando que, provavelmente, a localização do gene DNAr 5S em posição terminal não apresenta qualquer desvantagem evolutiva para o organismo portador dessa característica.
- Os rearranjos Robertsonianos e as inversões pericêntricas foram os principais eventos que marcaram evolução cromossômica Loricariinae, sendo que os rearranjos Robertsonianos atuaram como o principal processo gerador da expressiva variação numérica encontrada em *Rineloricaria*.
- O elevado número de sítios de DNAr 5S registrado em espécies *Rineloricaria* pode ser o resultado da ação de elementos transponíveis, de rearranjos Robertsonianos ou de trocas dessas regiões gênicas causada por associações cromossômicas entre os centrômeros de cromossomos acrocêntricos (configuração cromossômica radial), e muitos desses sítios podem ser constituídos de pseudogenes.
- Dois grupos naturais de *Rineloricaria* podem ser formados para as drenagens do Alto Paraná e do Leste brasileiro: um grupo composto por espécies com número diplóide abaixo de 60 cromossomos e pertencentes às drenagens que correm para o interior do continente e outro grupo composto por espécies com número diplóide acima de 60 cromossomos que pertencem às drenagens que correm diretamente para o Atlântico. Entretanto, segundo as análises filogenéticas com base em sequências de genes mitocondriais obtidas no presente trabalho, somente o grupo formado por espécies com número diplóide acima de 60 cromossomos parece compor um grupo natural.

- A maior mobilidade e menor mobilidade encontrada entre os gêneros de Loricariinae podem estar contribuindo para um menor ou maior acúmulo das alterações cromossômicas ocorridas nesses peixes.
- A topologia gerada a partir das análises de PCR-RFLP diferiu ligeiramente das topologias baseadas em dados de sequências, mas muitos grupos foram recuperados com as mesmas relações internas e em uma mesma posição na árvore, indicando que as análises de PCR-RFLP, mesmo sendo menos refinadas do que as análises de sequenciamento, recuperam praticamente as mesmas relações filogenéticas propostas a partir de sequências do gene, mostrando-se uma técnica muito mais barata e extremamente eficiente, permitindo analisar um maior número de indivíduos simultaneamente.
- As árvores filogenéticas geradas a partir da análise das sequências do gene COI recuperaram relações evolutivas muito parecidas com as relações evolutivas encontradas na literatura entre espécies de Loricariinae e que foram recuperadas com base em dados morfológicos, além de recuperarem também as mesmas relações filogenéticas apresentadas na topologia de árvore obtida a partir de sequências dos genes ATPase 6 e 8 e Citocromo b, indicando que o gene COI pode apresentar algum sinal filogenético.
- Os clados A-D, recuperados nas análises filogenéticas com base nos genes ATPase 6 e 8 e Citocromo b, também foram recuperados como monofiléticos nas árvores de NJ baseadas em sequências do gene COI, e as espécies *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2 e *Rineloricaria* sp. 4 mostraram-se parafiléticas em ambas as análises. Esses resultados reforçam a proposta de sinonimização, apresentada no Capítulo IV, para algumas espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho, bem como para uma reavaliação morfológica das espécies que apresentaram uma condição parafilética.

- O monofiletismo evidenciado nas populações A e B de *Rineloricaria* sp. 1, bem como as mesmas características citogenéticas encontradas para essas populações (Capítulo I), apontam os dados citogenéticos como importante ferramenta taxonômica para a identificação de espécies.
- *Rineloricaria* não deve ser um gênero tão especioso como é proposto e sim taxonomicamente complexo, e, antes de serem propostas novas espécies, o ideal seria que os pesquisadores fizessem uma análise conjunta de dados ecológicos, morfológicos e genéticos, para que a classificação proposta seja realmente robusta.
- O grande clado recuperado nas análises dos genes ATPase 6 e 8 e Citocromo b, constituído pelos clados A, B, C e D e composto por espécies pertencentes às drenagens do Leste brasileiro, corrobora a hipótese de ligação pretérita e de eventos de captura de cabeceiras estabelecido entre o Rio Paraíba do Sul, o Rio Ribeira do Iguaçu e as pequenas drenagens independentes. Além disso, as relações filogenéticas obtidas nessas análises sugerem que a Bacia do Alto Paraná teria dispersado suas espécies de *Rineloricaria* por toda a extensão das drenagens do Leste brasileiro, através das ligações passadas e dos eventos de captura de cabeceiras, originando toda a fauna de *Rineloricaria* encontrada nas drenagens do Leste brasileiro.
- As relações filogenéticas aqui propostas para o gênero *Rineloricaria* parecem estar refletindo a idade geológica da Bacia do Paraná e das drenagens do Leste brasileiro, e os principais eventos geológicos ocorridos nessas drenagens teriam influenciado na diversificação das espécies de *Rineloricaria* que compõem essas drenagens.
- A hipótese filogenética aqui apresentada, que propõe *Rineloricaria latirostris* como a espécie mais basal do gênero nessa filogenia, reforça a hipótese de que o cariótipo ancestral de *Rineloricaria* teria um número diplóide em torno de 36 cromossomos e que a evolução cariotípica no gênero se deu a partir do aumento no número diplóide.

Trabalhos que discutam as relações evolutivas de espécies de Loricariinae a partir da combinação de dados citogenéticos, moleculares e morfológicos, associados à história geológica das bacias onde essas espécies ocorrem, bem como a história natural dessas espécies, são inexistentes na literatura. O presente trabalho, que traz toda a integração interdisciplinar acima proposta, teve como propósito contribuir para o melhor entendimento da história evolutiva de Loricariinae. Esperamos que nossos resultados sejam o princípio de um estudo de maior aprofundamento no entendimento da história evolutiva do gênero *Rineloricaria*, bem como de toda a subfamília Loricariinae, já que abordagem de diferentes facetas mostrou-se, no presente estudo, um recurso eficiente para se responder as perguntas biológicas acerca dessa subfamília.

- Ab'Saber NA (1998) Megageomorfologia do território brasileiro. In: Geomorfologia do Brasil (Cunha, SB; Guerra, AJT, eds.). *Bertand Brasil*, Rio de Janeiro, 71-106.
- Affonso PRAM, Galetti Jr. PM (2005) Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica*, 123:227-233.
- Aguilar CT, Corrêa MMO, Galetti Jr PM (1998) Chromosome associations by centromeric heterochromatin in marine fishes. *Chromosome Sci*, 2:73-76.
- Alexander RM (1965). Structure and function in catfish. *J. Zool.*, 148:88-152.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-pased techniques. *Nucleic Acids Res*, 25:4692-4693.
- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Moysés CB, Foresti F (2007) Chromosome Variability in Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi) In: Fish cytogenetics (Pisano E, Costaz-Ozouf C, Foresti F, Kapoor BG, eds.). *Science Publishers*, New Hampshire, USA, 17-39.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (2000) Karyotypic evolution in Neotropical fish. *Chromosomes Today*, 13:169-182.
- Alves AL (2000) Análise da evolução dos gêneros subfamília *Hemipsilichtinae* (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Alves AL, Oliveira C, Foresti F (2003) Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia, Univ Florence Botany Inst*, 56:57-63.
- Ardura A, Linde AR, Moreira JC, Garcia-Vazquez E (2010) DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143:1438–1443.
- Armbruster JW (2000) Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes Loricariidae with particular emphasis on the Ancistrinae, Hypostominae, and Neoplecostominae. *PhD Thesis*, Urbana, Illinois.
- Armbruster JW (2004) Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes Loricariidae with emphasis on the Hypostominae and Ancistrinae. *Zool Jour Linn Society*, 141:1-80.
- Artori RF, Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*, 49(1):81-90.
- Artori RF, Bertollo LAC (2001) Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134:201-210.
- Avisé JC (1994) *Molecular Markers, natural history and evolution*. New York, NY.
- Avisé JC (2004) *Molecular Markers, natural history and evolution*. 2ª ed. New York, NY.

- Bailey JA, Baertsch R, Kent WJ, Haussler D, Eichler EE (2004) Hotspots of mammalian chromosomal evolution. *Genome Biology*, 5:R23.
- Bermingham E, Martin AP (1998) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol Ecol*, 7:499-517.
- Bickham JW, Baker RJ (1979) Canalization model of chromosomal evolution. In: Models and methodologies in evolutionary theory (Schwartz JH, Rollins HG, eds.). *Bull. Car-negie Mus. Nat. Hist.*, 13:70-84.
- Billington N, Hebert P (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquat Sci*, 48 (suppl. 1):80-94.
- Bizerril CRSF (2001) Peixes de águas interiores do estado do Rio de Janeiro. *FEMAR-SEMADS*, Rio de Janeiro, RJ.
- Blaxter M (2003) Counting angels with DNA. *Nature*, 421:122-124.
- Bonetto AA, Drago EC (1968) Consideraciones faunísticas en torno a la delimitación de los tramos superiores del rio Paraná. *Physis*, 27:437-444.
- Bremer K (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10:295-304.
- Britto MR (2002) Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Brown B, Emberson RM, Paterson AM (1999) Mitochondrial COI and II provide useful markers for *Weiseana* (Lepidoptera, Hepialidae) species identification. *Bull. Entomol. Res.*, 89:287-294.
- Brown GR, Carlson JE (1997) Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-26S rRNA and 5S rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theor Appl Genet*, 95:1-9.
- Buckup PA (1999) Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: Ecologia de Peixes de Riachos (Caramaschi EP, Mazzoni R, Peres-Neto PR eds.). *Série O ecologia Brasiliensis*, vol. VI, 91-138, PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, RJ.
- Buhay JE (2009) 'COI-like' sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *J. Crust. Biol.*, 29:96-110.
- Burgess WE (1989) An Atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. *T.F.H. Publications Neptune City*, N.Y.
- Burns GW, BOTTINO PJ (1989) Genética. 6ª ed. *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro, RJ.
- Campos-da-Paz R (1997) Sistemática e taxonomia dos peixes elétricos das bacias dos rios Paraguai, Paraná e São Francisco, com notas sobre espécies presentes nos rios costeiros do Leste do Brasil. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, SP.
- Castro RMC, Menezes CA (1996) Estudo da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In Workshop: *Basis to the conservation of biodiversity within the State of São Paulo*. Serra Negra, SP.

- Castro RMC *et al.* (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio paranapanema, sudeste e sul do brasil. *Biologia*, 1-14.
- Castro RMC *et al.* (2005) Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyol Explr Freshwaters*, 16(3):193-214.
- Centofante L, Bertollo LA, Moreira-Filho O (2006) Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytog. Gen. Res.*, 112:320–324.
- Claro F (2008) *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius* (Teleostei:Gymnotidae): uma abordagem citogenético-molecular. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Coghlan A, Wolfe KH (2002) Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Res*, 12:857-867.
- Covain R, Fisch-Muller S (2007) The genera of neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa*, 1462:1-40.
- Covain R, Dray S, Fisch-Muller S, Montoya-Burgos JI (2008) Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 986-1002.
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.*, 85:407–415.
- Deffontaines P (1945) O Paraíba, estudo de rio no Brasil. *Boletim Geográfico*, 3:830–835.
- Della-Rosa VA, Bertollo LAC, Ferrari I, Takarashi CS, Moreira-Filho O, Foresti F (1980) Estudos citogenéticos em peixes da Amazônia II (Ordem Siluriformes). *Ciê. Cult. Abstract.*, p. 735.
- Dergam J, Paiva, SR, Schaeffer CE, Godinho AL, Vieira F (2002) Phylogeography and RAPD PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25:379-387.
- Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC (2009) Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triporthus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32(1):37-41.
- Dobzhansky Th. (1970) Genetics of the evolutionary process. *Columbia University Press*, New York.
- Errero-Porto F (2007) Estudo citogenético e de polimorfismo cromossômico em populações do gênero *Rineloricaria* (Loricariidae, Siluriformes) da bacia do rio Paraná. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- Eschmeyer WN (1998) Catalog of fishes. 3 Vol. *California Academy of Science*, California, USA.

- Fávaro LF, Chaves PTC (1999) Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus* cf. *tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó I. (Londrina, PR, Brasil). *Acta Biol. Par.*, v.28, n.1-4:125-39.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Fenocchio AS (1993) Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genet Mol Biol*, 29: 464-468.
- Ferraris CJ (1998) Catfishes and knifefishes. In: Encyclopedia of Fishes (Paxton JR, Eschmeyer WN eds.). *Academic Press*, 106–112.
- Ferraris CJ (2003) Subfamily Loricariinae (Armored catfishes). In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America (Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, eds.). *EDIPUCRS*, p.330-350, Porto Alegre, RS.
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418:1-628.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. *EMBRAPA-CENARGEN*.
- Fichberg I (2008) Relações filogenéticas das espécies do gênero *Rineloricaria* BLEEKER, 1862 (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae), *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Fink SV, Fink WL (1996) Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Interrelationships of fishes (Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD eds.). *Academic Press*, 209-49.
- Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M, Rossi R (2003) Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome*, 46:473–477.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*, 31:137-144.
- Frezal L, Leblois R (2008) Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol*, 8:727–736.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC (1998) Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Res*, 6: 463-471.
- Futuyma DJ (1998) Evolutionary biology. 3rd edition. *Sunderland*: Sinauer. 6xx p.
- Futuyma DJ, Mayer GC (1980) Non-allopatric speciation in animals. *Syst. Zool.*, 29:254–271.

- Garcez R (2006) Análise da estrutura genética populacional do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do rio Grande, SP. Dissertação de Mestrado USP, Brasil.
- Garcia C (2009) Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas. *Tese de doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Garcia C, Moreira-Filho O (2008) Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco river: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA site. *Genetics and Molecular Biology*, 31:261-264.
- Garcia C, Almeida-Toledo LF (2010) Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia*, 63(1):32-40.
- Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research*, 9:365-384.
- Giuliano-Caetano L (1998) Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1999) Estudos citogenéticos em *Rineloricaria pentamaculata* (Langeani e Araújo, 1994). *Genet. Mol. Biol.*, 22 suppl.:192.
- Gold JR, Li C, Shipley NS, Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J. Fish Biol.* 37:563-575.
- Gornung E, Cordisco CA, Rossi AR, Innocentiis S, Crosetti D, Sola LC (2001) Chromosomal evolution in Mugilidae: karyotype characterization of *Liza saliens* and comparative localization of major and minor ribosomal genes in the six Mediterranean mullets. *Marine Biology*, 139:55-60.
- Griffiths, AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC (2001) Genética moderna. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, RJ.
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 39:439-446.
- Gromicho M, Coelho MM, Alves MJ, Collares-Pereira A (2006) Cytogenetic analysis of *Anaocypris hispanica* and its relationship with the paternal ancestor of the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex. *Genome*, 49:1621-1627.
- Gudger EW (1930) The Candiru – The only vertebrate parasite of man. *Paul B. Hoeber*, New York, xvii:120pp.
- Guerra M (1988) Introdução à citogenética geral. *Guanabara*, Rio de Janeiro, RJ.

- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41:95-98.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilododontidae). *Genetica*, 122:239-244.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270:313–322.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101:14812–14817.
- Holder M, Lewis P (2003) Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews*, 4:275-284.
- Howell WM (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver stain proteins associated with RNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62:361-367.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Hrbek T, Küçük F, Frickey T, Stölting KN, Wildekamp RH, Meyer A (2002) Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 25:125–137.
- Hubbel HR (1985) Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.*, 60:285-294.
- Hubert N, Hanner R, Holm E *et al.* (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS One*, 3, e2490.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 19, N° 17.
- Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M (2001) Complete mitochondrial DNA sequence of *Conger myriaster* (Teleostei: anguilliformes): novel gene order for vertebrate mitochondrial genomes and the phylogenetic implications for Anguilliform families. *J Mol Evol*, 52:311-320.
- Isbrücker IJH, Nijssen H (1976) *Rineloricaria heteroptera*, a new species of mailed catfish from Rio Amazonas near Manaus, Brazil (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zoologischer Anzeiger*, 196:109–124.
- Isbrücker IJH (1979) Description préliminaire de nouveaux taxa de la famille des Loricariidae, poissons-chats cuirassés néotropicaux, avec un catalogue critique de la sous-famille nominale (Pisces, Siluriformes). *Revue Française d'Aquariologie et Herpétologie*, 5:86–116.
- Isbrücker IJH (1980) Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *VerCPagen en Techniche Gegevens*, 22:1-170.

- Isbrücker IJH (1981) Revision of *Loricaria* Linnaeus, 1758 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Beaufortia*, 31:51–96.
- Isbrücker IJH, Nijssen H (1992) Sexualdimorphisms bei Harnischwelsen (Loricariidae). Harnischwelse, *DATZSonderheft*, 19-33.
- Isbrücker IJH, Seidel I, Michels JP, Schraml E, Werner A (2001) Diagnose vierzehn neuer Gattungen der Familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi). In: Die Aquarien und Terrarien Zeitschrift *Harnischwelse* 2 Sonderheft, Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany (Stawikowski R ed.). 17–24.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PD (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7:544–548.
- John B, Lewis KR (1979) Hierarquia cromossômica. *Edusp*, São Paulo, SP. 170p.
- Justi AJ (1993) Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004a) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet Genome Res.*, 106:107–110.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004b) Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, 242, 237-242.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 180-186.
- Kavalco KF (2008) Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Kelley WA, Atz JW (1964) A pygidiid catfish that can suck blood from goldfish. *Copeia*, 702-704.
- Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, 423:241-254.
- Kimura M (1980) A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111–120.
- Kirpichnikov VS (1981) Genetic Bases of Fish Selection. *Springer-Verlag*.
- Kner R (1853) Die Panzerwelse des K.K. Hof-naturalien-Cabinetes zu Wien. I. Abtheilung. Loricarinae. *Denkschr. Akad. Wiss. Wien.*, 6:65-98.
- Komiya H, Takemura S (1979) Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *Journal of Biochemistry*, 86:1067–1080.

- Kon T, Yoshino T, Mukai T, Nishida M (2007) DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: a lesson from the gobioid fish *Schindleria*. *Mol Phylogenet Evol*, 44:53-62.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Langeani F (1989) Ictiofauna do alto curso do rio Tietê (SP): taxonomia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Langeani F, Oyakawa OT, Montoya-Burgos JI (2001) New species of *Harttia* (Loricariidae, Loricariinae) from the Rio São Francisco basin. *Copeia*, 2001:136-142.
- Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, Shibatta OA, Pavanelli CS, Casatti L (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7(3):1-17.
- Leggatt RA, Iwama GK (2003) Occurrence of polyploidy in the fishes. *Fish Biology and Fisheries*, 13:237–246.
- Levan A, Fredga K, Sandbreg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- Limeira, DM, Renesto E, Zawadzki CH (2009) Allozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí River, upper Paraná River basin, Brazil. *Genetics Molecular Biology*, Vol. 32, nº 02.
- Long RG (1953) O vale do Médio Paraíba. *Revista Brasileira de Geografia*, 15:385–476.
- Lowe-McConnell RH (1969) Speciation in tropical freshwater fishes. *Biol J Linnean Soc*, 1:51-75.
- Lowe-McConnell RH (1975) Fish communities in tropical freshwaters – Their distribution, ecology and evolution. *Longman London*, 337p.
- Lundberg JG, Friel JP (2003) Siluriformes. Catfishes. Version 20 January 2003 (under construction). <http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerrero J, Horton B, Malabarba MCSL, Wesselingh F (1998) The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes (Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS eds.). *EDIPUCRS*, 13–48. Porto Alegre, RS.
- Machado C (2006) Diferenciação molecular de duas espécies de peixes antárticos do gênero *Notothenia* (Notothenioidei: Nototheniidae) através da análise do DNA mitocondrial. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Paraná, PR.
- Machado FA, Sazima I (1983) Comportamento alimentar do peixe hematófago *Branchioica bertonii* (Siluriformes, Trichomycteridae). *Ciência e Cultura*, 35:344-348.
- Maia TPA (2008) Estudos citogenéticos em peixes da subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

- Maia TPA, Giuliano-Caetano L, Rodriguez MS, Rubert M, Takagui FH, Dias AL (2010) Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). *Ichthyol Res*, 57:209–213
- Malabarba MCSL (1998) Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes (Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS eds.). *EDIPUCRS*, 69–84. Porto Alegre, RS.
- Marques MBA (2002) Estudos citogenéticos em *Conorhynchus conirostris* e *Lophiosilurus alexandri* (Pisces, Siluriformes), espécies endêmicas do rio São Francisco. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Marques MBA, Moreira-Filho O, Garcia C, Margarido VP (2008) Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco River basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl), 215-221.
- Martin AP, Bermingham E (2000) Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 267:1135-1141.
- Martínez JL, Morán P, García-Vázquez E, Pendás AM (1996) Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenet. Cell Genet.*, 73:149–152.
- Martins C (1997) Novas contribuições à citogenética de anostomidae (Pisces, Characiformes). Citotaxonomia e filogenia no gênero *Schizodon*. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom Res*, 7:363-367.
- Martins C (2000) Organização do DNA ribossômico 5S no genoma de peixes, com ênfase em *Leporinus*. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Martins C, Galetti Jr. PM (2001) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44:903-910.
- Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Focus on Genome Research (Williams CR ed.). *Nova Science Publishers*, Hauppauge, NY. 289-318.
- Martins C (2007) Chromosomes and Repetitive DNAs: A Contribution to the Knowledge of the Fish Genome. In: Fish cytogenetics (Pisano E, Costaz-Ozouf C, Foresti F, Kapoor BG, eds.). *Science Publishers*, New Hampshire, USA, 421-432.
- Matioli SR (Ed.) (2001) Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos.
- McElroy D, Moran P, Bermingham E, Kornfield I (1992) The Restriction Enzyme Analysis Package (REAP) Version 4.0. *J Hered*, 83:157-158.
- Mees GF (1974) Auchenipteridae and Pimelodidae. *Zool. Verh.*, 132:115-246.

- Mendes-Neto E (2008) Estudos citogenéticos em algumas espécies de Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) da região de transposição do rio Piumhi para o rio São Francisco. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Menezes NA (1972) Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das principais bacias fluviais do Brasil. In: Poluição e Piscicultura, notas sobre poluição, ictiologia e piscicultura. Comissão Estadual Bacia Paraná-Uruguaí. 73-78. Faculdade de Saúde Pública da USP. Instituto de Pesca. São Paulo, SP.
- Menezes NA (1988) Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. In: Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns (Vanzolini PE, Heyer WR eds.). *Academia Brasileira de Ciências*, 295-304. Rio de Janeiro, RJ.
- Menezes RS (1949) Incubação labial de ovos pelo macho de *Loricaria typus* Bleeker, da Lagoa do Peixe, Piauí, Brasil (Actinopterygii, Loricariidae, Loricariinae). *Rev. Bras. Biol.*, 9(3):381-387.
- Metcalf CF, Eldridge1 MDB, Johnston PG (2004) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the 2n = 14 ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research*, 12:405–414.
- Meyne J, Hirai H, Imai TI (1995) FISH analysis of the telomere sequences of bulldog ants (Myrmecia: Formicidae). *Chromosoma*, 104(1):14-18.
- Michelle JL (1977) Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42:539-546.
- Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Miller OJ (1976). Suppression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.*, 101:235-243.
- Mitchell A, Samways MJ (2005) The morphological ‘forms’ of *Palpopleura lucia* (Drury) are separate species as evidenced by DNA sequencing (Anisoptera: Libellulidae). *Odonatologica*, 34:173-178.
- Molina WF, Galetti Jr. PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish Chromis (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5s rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4):373-377.
- Montoya-Burgos JI, Muller S, Weber C, Pawlowski J (1998) Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes (Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS eds.). *EDIPUCRS*, 363–374. Porto Alegre, RS.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Genet. Mol. Biol.*, 14:331-357.
- Moysés CB (2005) Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes). *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

- Moysés CB, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Almeida-Toledo LF (2010) Cytotype-specific ISSR profiles and karyotypes in the Neotropical genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Genetica*, 138(2):179-189.
- Mullis K, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods of Enzymology*, 55:335-50.
- Nakatani K. *et al.* (2001) Ovos e larvas de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. *EDUEM*. Maringá, PR.
- Nei M, Tajima F (1981) DNA polymorphism detectable by restrictionendonucleases. *Genetics*, 125:873-879.
- Nelson SJ (1999) Editorial and introduction: the species concept in fish biology. *Rev Fish Biol Fisheries*, 9:277-280.
- Nelson SJ (2006) Fishes of the world. 4rd edition, *John Wiley e Sons*. New York – USA.
- Nur U (1973) Random arrangement of chromosomes in a radial metaphase configuration. *Chromosoma* (Berl.) 40:263-267.
- Obermiller LE, Pfeiler E (2003) Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 26:202–214.
- Oliveira C, Gosztonyi AE (2000) A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriforms. *Caryologia*, 53(1):31-37.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F (2007) Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. In: Fish cytogenetics (Pisano E, Costaz-Ozouf C, Foresti F, Kapoor BG, eds.). *Science Publishers*, New Hampshire, USA, 111-164.
- Oyakawa OT, Akama A, Mautari KC, Nolasco JC (2006) Peixes de Riachos da Mata Atlântica. *Editora Neotrópica*, 201, São Paulo, SP.
- Paxton JR, Eschmeyer WN (1995) Encyclopedia of fishes. 2^a. ed. *Academic Press*, San Diego.
- Paxton JR, Eschmeyer WN (1998) Encyclopedia of fishes. 3^a. ed. *Academic Press*, San Diego.
- Pazza R (2005) Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae). *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet Genome Res*, 112:313-319.
- Pendás AM, Mórán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E (1994) Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.*, 67:31-36.

- Perdices A, Bermingham E, Montilla A, Doadrio I (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei:Pimelodidae) in Central America. *Mol Phylogenet Evol*, 25:172-189.
- Petri S, Fúlfaro VJ (1983) Geologia do Brasil. *Edusp*, São Paulo, SP.
- Peyer B (1922) Über die Flossenstacheln der Welse und Panzerwelse, sowie des Karpfens. *Morph. Jahrb.*, 51:493-554.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:2934-2938.
- de Pinna MCC (1993) Higher-level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi). *Tese de Doutorado*, The City University of New York, New York, USA.
- de Pinna MCC (1998) Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Phylogeny and classification of Neotropical Fishes (Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS eds.) *Edpurcs*, Porto Alegre, 279-330.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14:917-818.
- Post A (1965) Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen dei Susswasser Teleosteen. *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 3:47.93.
- Pough FH, Janis CM, Heiser JB (2008) Vertebrate Biology, 8th ed., *Hardcover*, Washington, USA.
- Provenzano RF, Machado-Allison A, Chernoff B, Willink P, Petry P (2005) *Harttia merevari*, a new species of catfish (Siluriformes: Loricariidae) from Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 3(4):519-524.
- Rapp Py-Daniel LH (1991) *Chaetostoma jegui* new mailed catfish from the Rio Uruaricoera, Brazil (Osteichthyes: Loricariidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 2 (3):239-246.
- Rapp Py-Daniel LH (1997) Phylogeny of the neotropical armored catfishes of the subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae). *PhD. Thesis*, University of Arizona, USA.
- Rapp Py-Daniel LH, Oliveira EC (2001) Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 12(1):79-96.
- Ratnasingham S, Hebert PN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 2-10.
- Reis RE, Pereira EHL (2000) Three New Species of the Loricariid Catfish Genus *Loricariichthys* (Teleostei: Siluriformes) from Southern South America. *Copeia*, 4:1029–1047.
- Reis RE, Cardoso, AR (2001) Two new species of *Rineloricaria* from southern Santa Catarina and northeastern Rio Grande do Sul, Brazil (Teleostei: Loricariidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 12:319–332.

- Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. *EDUPUCRS*, Porto Alegre, RS.
- Reis RE, Pereira EHL, Armbruster J (2006) Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revision of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zool. Jour. Linn. Soc.*, 147:277-299.
- Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution association with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4:225-246.
- Ribeiro AC, Lima FCT, Riccomini C, Menezes NA (2006) Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 17:157-164.
- Rodriguez MS, Miquelarena AM (2005) A new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the Paraná and Uruguay River basins, Misiones, Argentina. *Zootaxa*, 945:1-15.
- Rodriguez, MS, Reis RE (2008) Taxonomic review of *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from the Laguna dos Patos drainage, southern Brasil, with the descriptions of two new species and recognition of two species groups. *Copeia*, 2:333-349.
- Roncati HA, Corio C, Malone G, Fenocchio AS, Pastori, MC (1999) Relevamiento citogenético em pees del rio Paraná (Argentina). VII Subfamilias Loricariinae e Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Genet. Mol. Biol.*, 22:82.
- Sabaj MH, Armbruster JW, Page LM (1999) Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes; Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 10(3):217-229.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425.
- Savage JM (1995) Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience*, 45:637-679.
- Scavone MDP, Julio Jr. HF (1994) Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. females (Loricariidae-Siluriformes) from the Paraná river basin. *Revista de Ictiologia*, 2/3(1/2):41-47.
- Scavone MDP, Julio Jr. HF (1995) Cytogenetics analysis and heterochromation distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platimetopon* (Loriidae: Siluriformes). *Rev. Brasil. Genet.*, 18(1):31-35.
- Schaefer SA (1987) Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogeny analysis of the Loricariid Subfamilies (Pisces: Siluriformes), *Contributions in Science*, 394:1-31.
- Schneider H (2007) Métodos de análise filogenética – Um guia prático. 3ª ed. *Editora Holos*, São Paulo, SP.

- Serra JP, Carvalho FR, Langeani F (2007) Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo: composition and biogeography. *Biota Neotrop.* 7(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+BN01707012007>
- Simões, DF (1977) Paraíba - o rio da sobrevivência. *Saneamento*, 51:8–18.
- Sivasundar A, Bermingham E, Orti G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American Rivers. *Mol Ecol*, 10:407-417.
- Sorenson MD (1999) TreeRot, version 2. Boston University, Boston MA.
- Sullivan JP, Lundberg JG, Hardman M (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 41:636-662.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromation. *Exp. Cell*, 75:304-306.
- Sutherland of Houndswood (2008) Systematics and taxonomy: follow-up. *Science and Technology Committee*. House of Lords.
- Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and g + c- content biases. *Mol Biol Evol*, 9:678-687.
- Thomas MR, Rapp Py-Daniel LH (2008) Three new species of the armored catfish genus *Loricaria* (Siluriformes:Loricariidae) from river channels of the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 6(3):379-394.
- Thomas MR, Pérez MHS (2010) A New Species of Whiptail Catfish, Genus *Loricaria* (Siluriformes: Loricariidae), from the Rio Curuá (Xingu Basin), Brazil. *Copeia*, 2:274–283.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibons TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680.
- Triantafyllidis A, Abatzopoulos TJ, Economidis PS (1999) Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Heredity*, 82:503-509.
- Valdez-Moreno M, Ivanova NV, Elías-Gutiérrez M, Contreras-Balderas S, Hebert PDN (2009) Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, 74:377–402.
- Venere PC, Galetti Jr. PM (1989) Chromosome relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Braz. J. Genet.*, 12:17-25.

- Venere PC, Artoni RF, Galetti Jr. PM (1994) Citogenética de Chilodontidae com descrição do cariótipo de *Caenotropus* cf. *labyrinthicus*, do Médio Araguaia. In: V Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada de peixes neotropicais. Botucatu, SP.
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenet Genome Res*, 101:24-28.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360:1847-1857.
- Ward RD, Holmes BH, White WT, Last PR (2008) DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Mar Freshw Res*, 59:57-71.
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology*, 9:1077-1085.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74:329-356.
- Weitzman SH, Menezes NA, Weitzman MJ (1988) Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns (Vanzolini PE, Heyer WR eds.), 379-427. *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, RJ.
- Weitzman SH, Malabarba LR (1999) Systematics of *Spinterobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from eastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 10, 1-43.
- White MJD (1954) Animal Cytology and Evolution. 2nd edition. Cambridge University Press.
- White MJD (1969) Chromosomal rearrangements and speciation in animals. *Annual Review of Genetics*, 19(2):225-230.
- White MJD (1973) Chromosomal rearrangements in mammalian populations: polymorphism and speciation. In: Cytotaxonomy and vertebrate evolution (Chiarelli AB, Capanna E eds.). *London Academic Press.*, 95-128.
- White MJD (1978) Chain processes in chromosomal speciation in animals. *Systematic Zoology*, 27(3):285-298.
- Wilson EO (2003) The encyclopaedia of life. *Trends Ecol. Evol.*, 18:77-80.
- Wilson EO (2004) Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 359:739.
- Witt JDS, Threlloff DL, Hebert PDN (2006) DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol Ecol*, 15:3073-3082.
- Wolf C, Burgener M, Hubner P, Luthy J (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Labensm. -Wiss. -Technol.*, 33:144-150.

- Wong E, Hanner RH (2008) DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Res. Int*, 41:828–837.
- Xia X, Xei Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J Heredity*, 92:371-373.
- Yunis JJ, Yasmineh WG (1971) Heterochromatin, satellite DNA and cell function. *Science*, 174:1200-1209.
- Zakian VA (1997) Life and cancer without telomerase. *Cell*, 91:1-3.
- Zawadzki CH, Reis RE, Renesto E (2000) Allozyme discrimination of three species of *Loricariichthys* (Siluriformes, Loricariidae) from Southern Brazil. *Rev suis Zool*, 107:1-12.

Figura 8.2: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima *Alu I*.

Figura 8.2: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima *Eco RI*.

Figura 8.3: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima *Hae III*.

Figura 8.4: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima *Hinf I*.

Figura 8.5: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima *Mbo I*.

Figura 8.6: Haplótipos gerados a partir do padrão de corte da enzima *RSA I*.

Figura 9.1: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 10000 réplicas.

Figura 9.2: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 10000 réplicas.

Figura 9.3: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.

Figura 9.4: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies de *Rineloricaria* estudadas no presente trabalho. Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.