

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ALGUMAS ESPÉCIES DE  
PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE PERTENCENTES À  
BACIA DO RIO PIRACICABA**

FÁBIO MENDES CAMILO

SÃO CARLOS  
2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ALGUMAS ESPÉCIES DE  
PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE PERTENCENTES À  
BACIA DO RIO PIRACICABA**

FÁBIO MENDES CAMILO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

SÃO CARLOS

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C183ec

Camilo, Fábio Mendes.

Estudos citogenéticos em algumas espécies de peixes da família loricariidae pertencentes à Bacia do Rio Piracicaba / Fábio Mendes Camilo. -- São Carlos : UFSCar, 2005.  
61 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Citogenética. 2. Bagre (peixe). I. Título.

CDD: 574.87322 (20<sup>a</sup>)

---

Orientador

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho.

Dedico este trabalho à minha esposa  
Fabiana, que jamais deixou de acreditar em  
mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado a oportunidade da vida.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, amigo e orientador, pela confiança depositada e oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pelo auxílio na realização deste estudo.

Ao Profs. Drs. Luis A. C. Bertollo, Pedro M. Galetti Jr. e Gilberto Moraes, pelas efetivas contribuições dispensadas.

Ao Prof. Dr. Júlio C. Garavello, pela atenção e identificação das espécies do presente estudo.

À Companhia de coletas Evelise, por tudo auxílio.

Aos colegas de Laboratório: Liano, Wellington, Débora, Carol, Vítor, Mercival, Lêle, Paulo, Marcelo, Celeste, Marc, Elisângela e Ana Karina, pelo auxílio e momentos compartilhados.

A minha companheira Marilza, por me incentivar sempre.

Aos companheiros Luis (Piau), Nelson (in memorian), Sérgio Reis e Jorge, por estarem ao meu lado em momentos difíceis.

Às meninas da secretaria do programa Rosemeire, Tatiane e Regiane por toda atenção dispensada.

Ao meu amigo Paulo, poucas coisas valem a pena, o importante é ter prazer, obrigado.

Aos Familiares: meus irmãos, Raquel por estar confiante e Fausto por acreditar em mim e sempre me auxiliando quando me substituiu nas escolas enquanto realizava este trabalho, valeu mano; aos meus pais Orlando e Maria Rita e avós Armando e Alcides (in memorian) e Conceição e Vilma por sempre me incentivarem.

À minha companheira e esposa por estar ao meu lado em todos os momentos além das promessas incondicionais, obrigado Fá.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Tributários da Bacia do Rio Piracicaba.....	03
Figura 02- Mapa Topográfico da bacia do rio Piracicaba.....	04
Figura 03- Mapa indicando os principais pontos de coleta.....	19
Figura 04- Imagens dos locais de coleta: (a) Foto Ribeirão da Lapa, (b) Foto Córrego do Rochedo e (c) Foto Rio Piracicaba.....	20
Figura 05- Cariótipo convencional de <i>Hypostomus albopunctatus</i> do rio Piracicaba (SP) $2n=74$ (A). No destaque, cromossomos marcados com Nitrato de Prata. Em (B) exemplar de <i>H. albopunctatus</i> com 16 cm (comprimento total).....	31
Figura 06- Metáfases de <i>H. albopunctatus</i> . Em (A) metáfase apresentando a totalidade dos cromossômicos marcados com Nitrato de Prata. Em (B) metáfase evidenciando padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva (setas).....	32
Figura 07- Hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sonda DNAr 18S, em metáfase de <i>H. albopunctatus</i> . A setas indicam os sítios marcando três cromossomos, dois submetacêntricos e um acrocêntrico.....	33
Figura 08- Cariótipo convencional de <i>Liposarcus anisitsi</i> do rio Piracicaba (SP) $2n=52$ (A). Em (B) metáfase seqüenciada para banda C. Em destaque par cromossômico marcado com nitrato de prata. Em (C) exemplar de <i>L. anisitsi</i> com 28 cm (comprimento total).....	36
Figura 09- Em (A) metáfase de <i>L. anisitsi</i> apresentando o par ativo de cromossomos submetacêntricos marcados com nitrato de prata. Em (B) localização do genes ribossomais 18S por FISH em <i>L. anisitsi</i> , evidenciando associação entre RONS (setas).....	37
Figura 10- Em (A) cariótipo convencional de macho e fêmea de <i>Corumbataia cuestae</i> , do córrego da Lapa (SP) $2n=54$ . Em destaque nos quadros: (a), (b) e (c) constrições secundárias heteromórficas; (d) e (e) marcações das RONS; (f) e (g) marcação de heterocromatina constitutiva. Em (B) exemplar fêmea de <i>C. cuestae</i> , com 3,1cm de comprimento total.....	41

- Figura 11- Metáfases de *C. cuestas*, corada com Giensa (**A**) e sequencialmente com nitrato de prata (**B**), evidenciando a localização das Ag-RONs na contração secundária do par metacêntrico nº 2. Em (**C**) destaque para heterocromatina constitutiva localizada nesse mesmo par de cromossomos. .... 42
- Figura 12- Metáfases de fêmea e macho respectivamente mostrando a localização dos genes ribossomais 18S por FISH em *C. cuestas*..... 43



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Números cromossômicos diplóides de <i>Hypostomus albopunctatus</i> .....	30
Tabela 02- Números de regiões organizadoras de nucléolos <i>Hypostomus albopunctatus</i> ..	30
Tabela 03- Números cromossômicos diplóides de <i>Liposarcus anisitsi</i> .....	35
Tabela 04- Números de regiões organizadoras de nucléolos de <i>Liposarcus anisitsi</i> .....	35
Tabela 05- Números cromossômicos diplóides de <i>Corumbataia cuestae</i> .....	39
Tabela 06- Número de regiões organizadoras de nucléolos de <i>Corumbataia cuestae</i> .....	40

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Caracterização da Bacia do Rio Piracicaba.....	02
1.2. Estudos citogenéticos em peixes Neotropicais.....	05
1.3. Aspectos gerais da família Loricariidae.....	07
1.3.1. Subfamília Hypostominae.....	09
1.3.1.1. Estudos citogenéticos da subfamília Hypostominae.....	10
1.3.2. Subfamília Hypoptopomatinae.....	12
1.3.2.1. Estudos citogenéticos da subfamília Hypoptopomatinae.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Materiais.....	18
3.1.1. Espécies Analisadas.....	18
3.1.2. Locais de Coleta.....	19
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Obtenção de Cromossomos Mitóticos.....	21
3.2.1.1. Preparações Diretas.....	21
3.2.2. Bandamentos Cromossômicos.....	22
3.2.2.1. Detecção da Heterocromatina Constitutiva – Bandas C.....	22
3.2.2.2. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	23
3.2.2.3. Técnica de Hibridação “IN SITU” com DNAr (Pinkel <i>et al.</i> , 1986; Hankalo & Elgin, 1991) .....	23
3.2.3. Análise Cariotípica.....	27
3.2.4. Montagem dos Cariótipos.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Estudos cariotípicos em <i>Hypostomus albopunctatus</i> .....	29

4.2. Estudos cariotípicos em <i>Liposarcus anisitsi</i> .....	34
4.3. Estudos cariotípicos em <i>Corumbataia cuestae</i> .....	38
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS.....	54

## RESUMO

Com intuito de incrementar o número de registros citogenéticos em espécies de peixes pertencentes à família Loricariidae, o presente trabalho teve como objetivo básico caracterizar cromossomicamente três espécies de peixes da bacia do rio Piracicaba: *Hypostomus albopunctatus* e *Liposarcus anisitsi* pertencentes à subfamília Hypostominae, e *Corumbataia cuestae* pertencente à subfamília Hypoptopomatinae. As espécies *H. albopunctatus* e *L. anisitsi* já foram previamente analisadas em outras bacias e os dados citogenéticos disponíveis são correlacionados a aqueles ora obtidos neste trabalho. Quanto à espécie *C. cuestae*, os dados citogenéticos obtidos constituem a primeira caracterização da estruturação cromossômica de uma espécie pertencente a este gênero. Os exemplares foram submetidos a metodologias citogenéticas convencionais, complementadas com bandamento-C, Ag-RON e FISH (hibridação fluorescente *in situ*) com sonda de rDNA 18S. As espécies *H. albopunctatus* e *L. anisitsi* foram coletadas no rio Piracicaba (município de Piracicaba, SP) *H. albopunctatus*, apresentou  $2n=74$  cromossomos (10M, 20SM, 44ST/A).

As regiões organizadoras de nucléolo foram detectadas em até três cromossomos, pelo tratamento com o Nitrato de Prata, caracterizando RONS múltiplas, sendo um cromossomo acrocêntrico, com marcações terminais no braço longo e um par de submetacêntricos pequenos, com marcações teloméricas nos braços curtos, coincidindo com os resultados obtidos pela técnica de FISH. O bandamento C evidenciou grandes blocos de heterocromatina constitutiva na região intersticial do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos, no braço curto de um par de submetacêntricos, marcações pericentroméricas no braço longo de um par de metacêntricos grandes, além de marcações tênues em regiões centroméricas de cromossomos submetacêntricos. *L. anisitsi* apresentou  $2n=52$  cromossomos (16M, 28SM, 6ST, 2A). As Ag-RONS se localizaram na posição terminal do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, caracterizando RONS simples, confirmadas por FISH. A heterocromatina constitutiva apresentou-se localizada em blocos bem evidentes no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos portador da RON, adjacente à este sítio, na porção terminal do braço longo de um par submetacêntrico grande e também na região intersticial do braço longo de

um par de cromossomos acrocêntricos grandes. Os resultados citogenéticos obtidos com essas duas espécies, mostram uma boa correlação com os resultados descritos para espécimens pertencentes a outras bacias, sugerindo uma estabilidade cariotípica entre diferentes populações dessas espécies. A espécie *Corumbataia cuestae*, coletada no córrego da Lapa (município de Itirapina-SP), apresentou  $2n=54$  cromossomos (28M; 20SM; 6ST/A). Apenas duas regiões organizadoras de nucléolos foram observadas, localizadas na região terminal do braço curto do par metacêntrico número 2, apresentando-se heteromórficas quanto ao tamanho. Análises seqüenciais das metáfases coradas pelo Giemsa/ Nitrato de Prata/ bandeamento C, evidenciaram que as constricções secundárias no par número 2 correspondem as RONS. Regiões heterocromatina constitutiva são observadas nitidamente nesse par de cromossomos, com grandes blocos pericentroméricos. Os resultados obtidos oferecem novos subsídios para os estudos evolutivos dos Loricariidae, abrindo perspectivas para uma melhor compreensão das correlações entre as espécies de Hypostominae e Hypoptopomatinae.

## ABSTRACT

Willing to develop the number cytogenetically reports on fish species belonged to the Loricariidae family, the actual work had as the basic aim to feature chromosomically three specimen of fishes from the basin of the Piracicaba river: *Hypostomus albopunctatus*; *Liposarcus anisitsi* and *Corumbataia cuestae*. The specimen *H. albopunctatus* and *L. anisitsi* which were previously feature cytogenetically in other basins and these cytogenetically data are correlated to the data obtained on this work, concerning to the species *C. cuestae*, the cytogenetically data obtained puts together the first feature of chromosome framing of a specie belonging to this king. The samples were exposed to conventional and differential cytogenetically methodologies, involving bandings-C, Ag-ROn e FISH (hybridization fluorescent *in situ*) with probe 18S. The specimen *H. albopunctatus* and *L. anisitsi* were collected in Piracicaba river (Piracicaba country, SP), the *H. albopunctatus*, showed  $2n=74$  chromosomes (10M, 20SM, 44ST/A) the parts organized of nucleolus were seen as diversified, with until 3 chromosome marked by Silver Nitrate, featuring on this specie multiple RONs, being acrocentric chromosome with terminal bandings on short arms and of small submetacentric pair with telomeric bandings on short arms, coinciding to the results obtained by de FISH technique. The preparations to marking C, made it clear large heterochromatin interstitial arm of a acrocentric chromosomal pair, on short arm of a submetacentric pair pericentromeric marking of a long arm of a large metacentric pair beyond short markings in centromeric parts of chromosomal submetacentric. The samples of *L. anisitsi* showed  $2n=52$  chromosome (16M, 28SM, 6ST, 2A), after Silver Nitrate staining, the markings were placed on terminal position of a long arm by a submetacentric chromosomal pair, featuring a single RON, confirmed by FISH. The cytogenetical result obtained with two specimen on the actual work when compared to the same specimen already described belonged to other basins they show a considered conservation state. Differences were found, however, we might suggest that these specimen seem to be cytogenetically very preserved when we compare the cytogetical results already obtained to the species *H. albopunctatus* and *L. anisitsi* available in literature. The specie *Corumbataia cuestae*, colleted at Lapa river (Itirapina county-SP), showed  $2n=54$

chromosomes (28M; 20SM; 6ST/A) just to Nucleolus Organized Regions were observed, placed on the terminal part of short arm from number 2 pair featured as metacentric, and they were seen as heteromorphic thought the size, sequential analysis of metaphases in Giemsa/Silver and Giemsa/banding-C, discovered that the secondary constrictions correspond to RONS. The constitutive heterochromatin pattern is observed clearly nucleolus chromosomal pair, with large pericentromeric heterochromatic blocks. The results obtained to offer new subsidy for studies evolution of Loricariidae, to open perspective for best understanding of correlations between species of Hypostominae and Hypoptopomatinae.

## **1. INTRODUÇÃO**



### **1.1. Caracterização da Bacia do Rio Piracicaba**

A bacia do rio Piracicaba é considerada de porte médio, com cerca de 12.400 Km<sup>2</sup>, localizada no estado de São Paulo, com exceção da porção Nordeste que se situa no Estado de Minas Gerais.

É constituída pelos rios Atibaia, Jaguari e Piracicaba e tendo como seus dois mais importantes afluentes o rio Camanducaia e o Corumbataí.

O rio Atibaia tem suas cabeceiras no próprio Estado de São Paulo, sendo formado pelos rios Cachoeira e Atibainha. O rio Jaguari nasce no Sul do Estado de Minas Gerais, mas percorre sua maior distância no Estado de São Paulo. Na sua porção final, o rio Jaguari, recebe seu principal afluente, o Camanducaia.

Aproximadamente no centro da bacia, os rios Atibaia e Jaguari encontram-se para formar o rio Piracicaba, o qual recebe o rio Corumbataí, seu mais importante tributário. O rio Corumbataí possui pequenos afluentes em ambas as margens, sendo o rio Passa-Cinco à sua margem esquerda, um de seus mais importantes tributários (Figura 1).

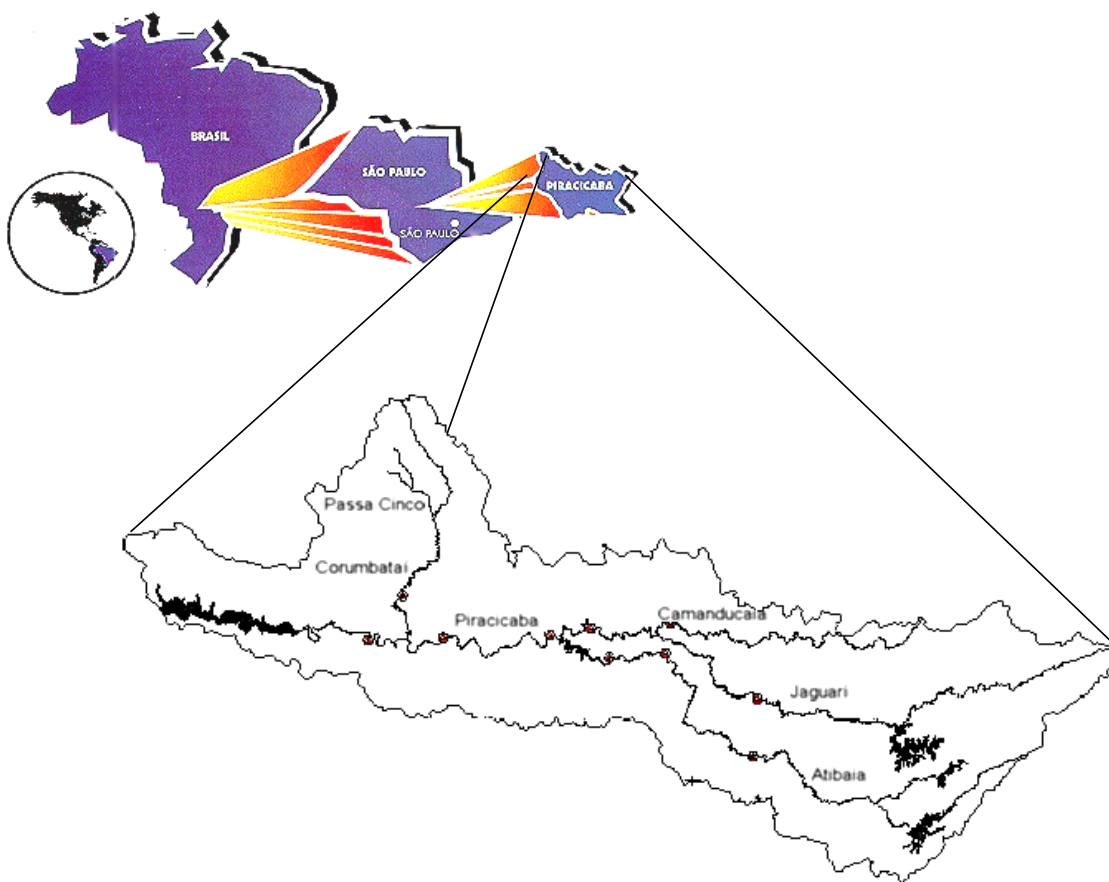
Assim após a confluência dessa complexa integração de rede de mananciais, o rio Piracicaba termina seu percurso desaguando no rio Tietê, que faz parte do sistema Paraná. Esse sistema é o segundo maior do continente, drenando cerca de 4.000.000 Km<sup>2</sup>, na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai.

Diferentes fatores determinam as características hidrográficas de uma bacia, entre os quais podemos destacar o índice pluviométrico, o solo e o relevo.

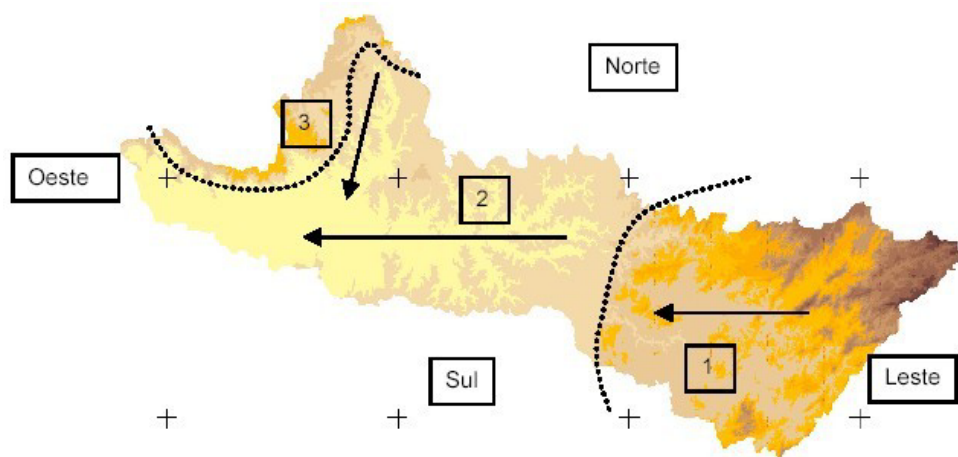
Importante fator que influencia a hidrografia é a quantidade de chuva que cai sobre a bacia. A bacia do rio Piracicaba apresenta um alto índice de pluviosidade, em média de 1300 a 1800mm/ano. Os solos dessa bacia são predominantemente argilosos (partículas < que 0,02mm).

Entretanto existem áreas em que predominam areias Quartzozas (partículas > que 2mm) e a textura do solo é responsável pela quantidade de água que o mesmo retém. Os rios desta bacia correm de leste para oeste, seguindo as diferenças em altitudes. É importante ressaltar que o relevo determina a direção que os rios correm, bem como a densidade da drenagem, pois quanto mais acidentado o terreno, mais riachos e córregos são formados, conforme indicações na figura (2) a bacia é classificada em três regiões: a região

1 (altitudes mais elevadas) pertencentes ao Planalto Atlântico; a região 2 (menores altitudes) correspondente à Depressão Periférica e a região 3 (relevo acidentado na região Noroeste da bacia) localizada na zona das Cuestas Basálticas.



**Figura 1-** Tributários da Bacia do Rio Piracicaba. ([www.cena.usp.br/piracena](http://www.cena.usp.br/piracena)).



**Figura 2-** Mapa Topográfico da bacia do rio Piracicaba; as cores mais claras representam menores altitudes e as mais escuras maiores altitudes ([www.cena.usp.br/piracena](http://www.cena.usp.br/piracena)).

Esta bacia, apresenta vários reservatórios importantes, 3 deles se localizam na região das cabeceiras e fazem parte do sistema Cantareira. Esse sistema é responsável pela exportação de água da bacia do Piracicaba para região metropolitana de São Paulo.

A bacia do Piracicaba abrange um total de 61 municípios, abastecendo aproximadamente 3 milhões de habitantes distribuídos de forma irregular, provocando urbanização desordenada e não planejada, que ao longo de seu desenvolvimento praticamente extinguiu a vegetação nativa, sendo substituída por culturas agrícolas, e que atualmente apresenta apenas 3,5% de área coberta por matas originais.

O longo processo de urbanização não planejado acentuou problemas tanto no consumo de água como na liberação de esgotos, o que hoje provoca desequilíbrios ambientais que aos poucos estão afetando a manutenção da bacia.

A retirada total de água da bacia do rio Piracicaba, para diferentes fins, é da ordem de 64m<sup>3</sup>/s. Desse total, 33m<sup>3</sup>/s é utilizado como recursos hídricos na própria bacia, gerando abastecimento ao público a indústria e a agricultura (sendo que os dois primeiros devolvem cerca de 80% desse volume na forma de esgoto e na forma de efluentes industriais) e 31m<sup>3</sup>/s é exportado para a região metropolitana de São Paulo, sendo que essa água

exportada corresponde à cerca de 60% do consumo total dessa região (www.cena.usp.br/piracena).

## 1.2. Estudos citogenéticos em peixes Neotropicais

Os peixes constituem um grupo extremamente favorável para estudo citogenético e evolutivo, uma vez que ocupam uma posição basal na filogenia dos vertebrados (Nelson, 1984). Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais iniciaram na década de 60 por pesquisadores europeus e no início da década de 70 por pesquisadores brasileiros (Artoni, 1996). Esses estudos, baseados inicialmente em cortes de tecidos ou esmagamento de embriões, testículos ou tecidos hematopoiéticos tiveram um notável avanço a partir da década de 70, com a utilização da técnica de suspensão de células e secagem ao ar.

Nos últimos anos, devido basicamente à utilização de novas técnicas para análise cromossômica, esses estudos apresentaram um razoável desenvolvimento, o que tem possibilitado a citogenética contribuir mais efetivamente não só para análises filogenéticas e taxonômicas, como para uma maior compreensão da estrutura cromossômica (Andreato, 1991).

Os peixes apresentam uma faixa de variação de números cromossômicos diplóides de  $2n=12$  a  $2n=250$  e de quantidade de ADN, de 0,4 pg a 140 pg, além de polimorfismos intrapopulacionais e intraespecíficos (Kirpichnikov, 1981). Dentre a ictiofauna neotropical, o menor número diplóide consiste de 20 cromossomos, descrito para *Pterolebis longipinnis*, e o maior consiste de 134 cromossomos, descrito para *Corydoras aeneus* (Oliveira *et al.*, 2000). Na família Loricariidae constata-se a existência de uma ampla variedade cariotípica numérica, com números entre  $2n=36$  cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998) a  $2n=80$  cromossomos em *Hypostomus sp.* (Artoni, 1996), e estrutural em populações de várias espécies, como por exemplo, *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreato *et al.*, 1994).

Essa variabilidade poderia ser explicada pelo fato de os peixes representarem um grupo de animais primitivos altamente heterogêneo, submetido a processos evolutivos em diferentes direções (Kirpichnikov, 1981). Outra explicação, segundo Bush *et al.*, (1977) e

Lande, (1979), estaria relacionada com o padrão de distribuição geográfica, uma vez que o isolamento das bacias hidrográficas, com a conseqüente formação de populações alopátricas, favoreceria o processo de especiação. Modelos propostos por esses mesmos autores, que levam em conta a vagilidade, tamanho das populações e a fixação de rearranjos, poderiam explicar a variabilidade cromossômica de determinados grupos de peixes. Assim, grupos caracterizados pela alta mobilidade e constituídos por um grande número de indivíduos, apresentariam uma estrutura cariotípica estável, ao passo que grupos com pequena mobilidade e baixa densidade populacional, mostrariam grande variação cariotípica ao nível inter e intraespecífico.

Dados indicam a descrição de cariótipos para cerca de 2.600 espécies de peixes em todo o mundo (Ozouf-Costaz e Foresti, 1992). A ictiofauna neotropical compreende aproximadamente 8.000 espécies, num total de 24.600 espécies taxonomicamente conhecidas (Nelson, 1984). Deste montante, atualmente são conhecidos dados citogenéticos (números diplóides/haplóides) de 921 espécies neotropicais, distribuídas em 252 gêneros e 44 famílias (Oliveira *et al.*, 2000).

Os estudos citogenéticos têm fornecido contribuições importantes à taxonomia de peixes. Bertollo *et al.* (1986) ressaltam como contribuições concretas da citogenética para a taxonomia uma boa caracterização cromossômica das espécies, a evidência cariotípica para as suas relações evolutivas, o suporte adicional para a identificação de espécies taxonomicamente problemáticas e a reunião de evidências de possíveis casos de espécies crípticas.

Ou ainda estudos que integram as duas abordagens, como evidência o trabalho de Moreira-Filho (1989), onde a associação dos dados cariotípicos e morfológicos possibilitou diferenciar, a priori, seis formas no “complexo” *A. scabripinnis*. Segundo o autor a integração das duas metodologias possibilitou a obtenção de informações mais conclusivas, pois formas não diferenciadas cromossomicamente puderam ser separadas por análises morfológicas, e formas morfológicamente idênticas puderam ser separadas cromossomicamente.

### 1.3. Aspectos gerais da família Loricariidae

Pertencente à Ordem dos Siluriformes, a família Loricariidae, segundo Isbrucker (1980); Burgess, (1989) e Armbruster (1997) apresenta cerca de 600 espécies já descritas, distribuídas em 70 gêneros e 7 subfamílias. Segundo Spix e Agassiz (1829, apud Montoya-Burgos *et al.*, 1998) o grupo dos loricariídeos foi primeiramente denominado de Gonyodontes. Posteriormente o grupo foi dividido em dois subgrupos: Loricariinae e Hypostominae por Kner (1853a, 1853b, apud Montoya-Burgos *et al.*, 1998). Bleeker (1862, apud Montoya-Burgos *et al.*, 1998) identificou duas subfamílias, Plecostomiformes e Loricariaefomes. Em seguida Eigenmann e Eigenmann (1890) propuseram a inclusão de mais uma subfamília ficando assim constituída: Loricariinae, Hypoptopomatinae e Plecostominae. Regan (1904) acrescentou mais duas subfamílias: Neoplecostominae e Argiinae. Gosline (1945) substituiu a sub família Argiinae por Astroplepinae, após revisão mais detalhada, e acrescentou mais uma subfamília ao contexto a Lithogeninae. Isbrucker (1980) reconheceu Astroplepinae como uma família e então sugeriu a distinção de duas subfamílias dentro de Plecostominae: Hypostominae e Ancistrinae. Howes (1983) ao estudar a miologia do crânio e o esqueleto, concluiu que essas duas subfamílias não formavam grupos naturais. Isbrucker (1981) propôs seis subfamílias: Lithogeninae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae, Hypostominae e Neuplecostominae. Em uma análise filogenética mais aprofundada das subfamílias de Loricariidae, Shaefer (1988) propõe a formação de seis grupos monofiléticos: Ancistrinae; Ancistrinae e Hypostominae; Loricariinae; Ancistrinae, Hypostominae e Loricariinae; Hypoptopomatinae; Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae e Ancistrinae. E nesta análise Lithogeninae e Neuplecostominae foram excluídas. Porém, através dos estudos de caracteres morfológicos (osteologia, anatomia externa e gastrintestinal), Armbruster (1997) propôs duas novas subfamílias, Hemipsilichthiinae e Upsilodinae, esta última considerada pelo autor como a mais basal entre os loricariídeos.

Os peixes desta família ocupam habitats variados demonstrando assim uma grande capacidade adaptativa que pode ser exemplificada pela sua respiração, que além das brânquias, também é realizada pelas paredes vascularizadas do estômago, fato que lhe permite ficar fora da água por longo período. Comumente conhecidos como cascudos ou

limpa-vidro (algumas espécies são ornamentais, comuns por realizarem limpeza em aquários), Giuliano-Caetano (1998), resume algumas de suas principais características propostas para os Loricariidae:

- primeiro raio dorsal não aculeado, mas em forma de raio forte e indiviso;
- hábito predominantemente bentônico;
- ausência de barbilhões maxilares e mentoniano e presença de apenas um par de barbelas rictais;
- aparelho de Weber (cadeia de ossículos que comunica o ouvido interno à bexiga natatória);
- quatro séries longitudinais de placas ósseas sendo o abdômen revestido por numerosas placas pequenas; mecanismo de trava das nadadeiras dorsal e peitoral (às vezes ausente);
- membranas branquiais ligadas ao istmo (aberturas branquiais pequenas); boca ventral em forma de ventosa (com maxilas soltas);
- tendência da cabeça, corpo e especialmente pedúnculo caudal se tornarem achatados;
- nadadeira adiposa, quando precedida por espinho.

Alguns loricariídeos têm hábito iliófago. Adicionalmente sua alimentação consiste de vegetais e pequenos invertebrados. Em geral são caracterizados por uma baixa fecundidade, ocasionada pela liberação de poucos ovos. Em certos casos observa-se pronunciado dimorfismo sexual (Menezes, 1949a e 1949b).

Segundo Angelescu & Gneri (1949), os cascudos possuem características biológicas que lhes proporcionam acentuada importância ecológica, o que é salientado pelo hábito alimentar detritívoro-herbívoro, que varia em função das características fisiográficas do ambiente sendo, o alimento aproveitado por estas espécies, produto dos processos metabólicos do circuito nutritivo do meio aquático.

Além da importância ecológica, algumas espécies de cascudos representam grande importância bioeconômica, como é o caso da espécie *Rhinelepis aspera* que é amplamente distribuída na bacia do rio Paraná, onde se constitui um importante recurso pesqueiro,

representando uma média de 45,5 toneladas/mensais na região de Guairá (Paraná, Brasil) no início do reservatório de Itaipu (Agostinho *et al.*, 1989).

Apesar de constituir uma das maiores famílias de peixes de água doce, grande importância biológica e extensa distribuição por todo neotrópico, análises citogenéticas ainda são relativamente escassas, frente ao número de espécies (Artoni, 1996; Alves, 2000 e Artoni e Bertollo, 2001). Segundo Oliveira e Gosztanyi (2000) dados citogenéticos estão disponíveis para apenas 56 espécies desse grupo, das 600 espécies já descritas.

### **1.3.1. Subfamília Hypostominae**

Os Hypostominae, conhecidos como cascudos, são peixes teleósteos, siluriformes, de grande porte (*Hypostomus plecostomus* pode atingir até 35 cm de comprimento) encontrados em diversos rios brasileiros. Segundo Mo, (1991), a subfamília Hypostominae, constitui um dos grupos de siluriformes mais recentes na América do Sul, o que estimula estudos sobre a especiação desses peixes.

Esta subfamília é composta por 19 gêneros (Isbrucker, 1981), e em apenas cinco desses gêneros (*Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhnielepis*, *Pogonopoma* e *Ptrygoplichthys*) foram desenvolvidos algum tipo de trabalho citogenético. O gênero *Hypostomus* é o que apresenta o maior número de espécies já cariotipadas e, segundo Britski (1972), é o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros.

De acordo com Reis *et al.*(1990), a identificação ao nível de espécie, assim como a sistemática deste gênero se apresenta problemática, refletindo o que acontece em toda a família Loricariidae, devido à ausência de revisões mais recentes nesse grupo, além da falta de conhecimento geral da distribuição destes peixes pelos rios da América do Sul.

Assim como os demais Loricariídeos, os Hypostominae apresentam ampla distribuição e diversidade biológica, sendo considerados por Angelescu & Gneri (1949), animais de acentuada importância ambiental, uma vez que atuam como pré-mineralizadores da matéria orgânica antes que essa reingresse na cadeia alimentar.



### 1.3.1.1. Estudos citogenéticos da subfamília Hypostominae

Dentre as seis subfamílias dos Loricariidae a Hypostominae é a mais especiosa.

A maioria dos estudos citogenéticos já realizados são referentes ao gênero *Hypostomus* (Giuliano-Caetano, 1998). Este gênero de cascudos domina os rios brasileiros, apresentando número diplóide bastante variável, compreendido entre  $2n=52$  a  $80$ , sendo  $2n=72$  o valor mais freqüente, sugerindo que os rearranjos cromossômicos os mecanismos Robertsonianos desempenharam um papel significativo na evolução cariotípica desse grupo (Giuliano-Caetano, 1998). Artoni (1996) estudou 12 espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus*, dentre elas *Hypostomus albopunctatus*  $2n=74$  e *Liposarcus anisitsi*  $2n=52$ , e pode constatar que os diferentes números diplóides ficaram entre  $52$  e  $80$ , determinando uma freqüência mais acentuada de  $2n=72$ . Além da diversidade no número diplóide desse gênero ainda são observadas variações quanto ao número fundamental (NF), como constatou Michele (1975) ao analisar quatro espécies e detectou para *Hypostomus ancistroides*  $2n=68$  com NF= 105 para machos e NF=106 para fêmeas; para *Hypostomus macrops*  $2n=68$  sendo NF=92 para machos; para *Hypostomus strigaticeps* com  $2n=74$  e NF=86; e *Hypostomus paulinus* com  $2n=72$  e NF=78.

Nos *Hypostomus* as regiões organizadoras de nucléolo (RONS) também apresentam fenótipos variados. Além de um freqüente polimorfismo de tamanho dessas regiões, entre cromossomos homólogos, verifica-se a presença de espécies com um só par de RONS e outras com RONS múltiplas, sendo essas últimas as mais freqüentes (Artoni & Bertollo, 1992). Entretanto, segundo Artoni (1996) a situação mais comum entre os peixes é a existência de somente um par de cromossomos portadores de genes para RNA ribossômico.

Em peixes, a localização do DNAr 45S ( $18S + 5,8S + 28S$ ) é um importante marcador citogenético, onde se observa grupos nos quais usualmente predomina um único par de RONS (Curimatidae, Anastomidae, Parodontidae, Prochilodontidae e Cichidae), grupos que apresentam RONS múltiplas (Characidae, Lebiasiniade, Loricariidae, Erythrinidae e Callichthyidae), ou ainda podendo estar localizadas em cromossomos sexuais (Bertollo e Cavallaro, 1992; Born e Bertollo, 2000; Artoni e Bertollo, 2002). Sua localização pode ser feita diretamente através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas específicas, ou indiretamente, através da utilização do Nitrato de Prata.

Atualmente a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), torna possível a localização de fragmentos de DNA de diversos tamanhos nos cromossomos metafásicos (Ozouf-Costaz *et al.*, 1997). Apesar de que seqüências gênicas de cópia única possam ser detectadas por essa metodologia, aquelas que se apresentam em multiplicidade são mais fáceis de serem visualizadas e as mais utilizadas em peixes (Phillips & Reed, 1996). Nos peixes a visualização dos genes ribossomais maiores, por FISH, é muitas vezes equivalente às marcações obtidas por impregnação pela prata (Wasko & Galetti, 2000). Em *Hypostomus affinis*, por exemplo, de 2 a 5 Ag-RONs foram evidenciadas pelo nitrato de prata e através da hibridação *in situ*, foram observados 5 sítios de DNAr 18S, os quais confirmam o número máximo de Ag-RONs obtidas (Kavalco *et al.*, 2004). Atualmente as técnicas de (FISH), têm sido muito empregadas como ferramenta freqüente na citogenética de peixes.

Segundo Scavone & Julio Jr., H.F. (1994) nos Hypostominae não são raros os exemplos de polimorfismos relacionados ao número cromossômico devido a cromossomos supranumerários ou por rearranjos cromossômicos.

Os peixes são caracterizados por uma variabilidade de determinação de sistemas sexuais. Já foram descritos oito tipos de sistemas cromossômicos de determinação de sexo, com a presença de sistemas múltiplos e simples (Takako *et al.*, 2000). Heteromorfismo sexual, com sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, pode ser observado por Artoni (1996) em uma espécie de *Hypostomus* (*Hypostomus sp.G*; 2n=64).

Em *Hypostomus macrops* foi encontrado um possível par de cromossomos heteromórficos indicando um sistema de cromossomos sexuais XX/XY (Michele *et al.*, 1977).

A heterocromatina é uma classe da cromatina que replica o DNA mais lentamente e possui atividade transcricional baixa ou inexistente. A heterocromatina classificada como constitutiva é detectada pela técnica de bandamento C, embora com alguma variabilidade (Sumner, 1990). Os dados referentes à banda C são pouco expressivos e revelam marcações preferencialmente centroméricas e pericentroméricas. Também se tem constatado a coincidência das regiões organizadoras de nucléolos com as bandas heterocromáticas, em várias espécies de Siluriformes (Fenocchio & Bertollo, 1990; Oliveira 1991). Nos *Hypostomus*, como em outros peixes, tem ocorrido com freqüência a presença

de bandas bem evidentes, ao lado de outras mais discretas em cromossomos submetidos ao bandamento C (Artoni, 1996).

Há poucos relatos na literatura sobre outros gêneros de Hypostominae. Para *Liposarcus* por exemplo, apenas duas espécies até o momento foram citogeneticamente estudadas: *Liposarcus anisitsi*  $2n=52$  (Artoni *et al.*, 1999) e *Liposarcus sp.*  $2n=52$  (Fenerich, 1998), apresentando esta última apenas dados referentes ao número diplóide.

### **1.3.2. Subfamília Hypoptopomatinae**

A subfamília Hypoptopomatinae é a melhor reconhecida como um grupo natural dentre os Loricariídeos, representada por cerca de 70 espécies de peixes, alocadas em 16 gêneros largamente distribuídos por cursos de água doce da América do Sul cis-andina, da Venezuela, e até o Norte da Argentina (Reis e Schaefer, 1992; Reis e Schaefer, 1998; Isbrucker, 2001).

A subfamília atualmente está dividida em duas tribos, os Hypoptopomatini e os Otothyriini. Estes peixes são geralmente referidos como “cascudinhos” no Brasil, onde o grupo é mais diversificado. Peixes da subfamília Hypoptopomatinae são de pequeno porte (maioria menores que 60mm de comprimento), geralmente compartilham uma fisionomia adulta e morfologia peculiar no esqueleto do raio peitoral (Schaefer, 1991). São primariamente herbívoros, porém, ao contrário de outros loricariídeos encontrados primariamente em nascentes de rios, os Hypoptopomatinae são encontrados com maior frequência em ou próximo da porção superior da coluna d’água em associação direta com estruturas próximas da superfície, tal como galhos de árvores submersos, macrófitas aquáticas e gramas laminares terrestres crescendo ao longo das margens correntes e estendendo-se dentro da água (Schaefer, 1998)

Diferenciam-se morfológicamente dos demais Loricariidae, principalmente pela presença de 5 placas de cada lado da borda rostral e cintura escapular (cleitro e coracóide) total ou parcialmente exposta (Britski, 1972; Boeseman, 1974).

A grande diversidade de formas biológicas e a ampla distribuição dos representantes de Hypoptopomatinae tornam os estudos citogenéticos nessa subfamília bastante interessantes do ponto de vista taxonômico, sistemático e evolutivo (Andreato, 1991).

Nos últimos anos, tem sido descritos novos gêneros e espécies para esse grupo (Britski, 1997; Garavelo, J.C., Britski, H.A., Schaefer, S.A., 1998; Reis e Schaefer, 1998; Reis e Schaefer, 1992; Schaefer, 1996, 1997; Schaefer e Provenzano, 1998). Recentemente foi criado, o gênero *Corumbataia* (Britski, 1997), no qual já foram identificadas duas espécies, *C. tocantinensis* e *C. cuestae* e sendo a última, alvo do presente estudo.

#### **1.3.2.1. Estudos citogenéticos da subfamília Hypoptopomatinae**

Estudos citogenéticos realizados por Andreato *et al.* (1994) demonstram que nos hypoptopomatídeos há uma tendência para manter o número cromossômico diplóide  $2n=54$ , variando apenas em *Otocinclus aff. vestitus* com  $2n=72$  e *Hisonotus gibbosus*  $2n=58$  (Andreato *et al.*, 1993; 2000), sendo assim considerado um grupo bastante conservado.

A regiões organizadoras de nucléolos (RONs) geralmente encontram-se em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, podendo ser localizadas em posição intersticial, terminal ou subterminal, sendo a maioria intersticial. De acordo com trabalhos realizados por Andreato *et al.* (1992) as RONs, intersticiais, das espécies de Hypoptopomatinae estão localizadas em cromossomos metacêntricos grandes, possivelmente os do par 2. Contudo, apesar dessas tendências, podem ocorrer variações quanto à morfologia cromossômica, localização das regiões organizadoras de nucléolo e padrão de heterocromatina constitutiva tanto em nível específico quanto populacional. Segundo Andreato *et al.* (2000), em duas populações de *Hisonotus sp.*, as RONs ativas, observadas através da impregnação de nitrato de prata, sempre corresponderam à localização dos cístrons ribossomais 18S no cariótipo. O padrão de heterocromatina constitutiva é uma importante ferramenta da citogenética, principalmente quando se analisa a sua constituição, comparando-as entre espécies de peixes de um mesmo grupo (Almeida-Toledo *et al.*, 2000).

Tratando especificamente da subfamília Hypoptopomatinae, a distribuição da heterocromatina constitutiva, apresenta-se bastante heterogênea. As marcações estão localizadas em diferentes cromossomos, podendo ser: intersticial, pericentromérica, terminal ou subterminal (Takako *et al.*, 2000).

Polimorfismos relacionados ao número cromossômico, devidos a cromossomos supranumerários (cromossomos B) foram encontrados em *Microlepdogaster leucofrenatus* (Andreato *et al.*, 1993; 1994). Também já foram registrados sistemas de determinação sexual cromossômica em *Pseudotocinclus tietensis* (sistema XX/XY), *Microlepdogaster leucofrenatus* e *Otocinclus aff. vestitus* (sistema ZZ/ZW), conforme Andreato *et al.*, (1992; 1993).

## **2. OBJETIVOS**

Em se considerando os aspectos anteriormente citados, foi proposto neste trabalho:

- Estudar as características cromossômicas em algumas espécies da família Loricariidae, visando a estrutura cariotípica, variabilidade das RONS e possíveis mecanismos de determinação de sexo.
- Analisar citogeneticamente espécie representante da subfamília Hypoptopomatinae, ainda não estudada sob aspecto citogenético.
- Aplicar fluorocromos base-específicos e hibridizar *in situ* sondas fluorescentes de DNAr 18S nos cromossomos das espécies analisadas pelas técnicas citogenéticas básicas.
- Inferir sobre a evolução cariotípica do grupo, com base nos resultados obtidos e em dados já disponíveis na literatura, em relação às espécies estudadas desta bacia, comparadas às mesmas espécies já estudadas em outras bacias.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



### 3.1. MATERIAIS

#### 3.1.1. Espécies Analisadas

Foram coletados e analisados exemplares (macho e fêmea) de três espécies, pertencentes à família Loricariidae, sendo elas *Liposarcus anisitsi*, *Hypostomus albopunctatus* e *Corumbataia cuestae*.

A posição taxonômica dessas espécies é a seguinte:

**Classe** Osteichthyes

**Ordem** Siluriformes

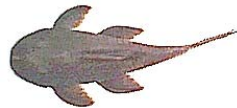
**Subordem** Siluroidei

**Família** Loricariidae

**Subfamília** Hypostominae

**Gênero** *Hypostomus*

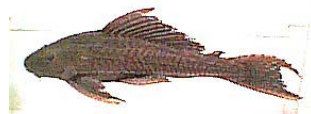
*Hypostomus albopunctatus*



**Subfamília** Hypostominae

**Gênero** *Liposarcus*

*Liposarcus anisitsi*



**Subfamília** Hypoptopomatinae

**Gênero** *Corumbataia*

*Corumbataia cuestae*



### 3.1.2. Locais de Coleta

Os exemplares da espécie *Corumbataia cuestae* foram coletados no Ribeirão da Lapa (e em seu tributário Córrego do Rochedo) – constituinte da sub-bacia do rio Passa-Cinco, que por sua vez é pertencente à bacia do rio Piracicaba (Figuras 3, 4a e 4b).



**Figura 3** - Mapa indicando os principais pontos de coleta

Os exemplares das espécies *Liposarcus anisitsi* e *Hypostomus albopunctatus* foram coletados no Rio Piracicaba no município de Piracicaba.(Figuras 3 e 4c)



(a) Foto Ribeirão da Lapa



(b) Foto Córrego do Rochedo



(c) Foto Rio Piracicaba

**Figura 4-** Imagens dos locais de coleta.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Obtenção de Cromossomos Mitóticos**

#### **3.2.1.1. Preparações Diretas**

Esta foi descrita por Egozcue (1971) e modificada por Bertollo (1978), para obtenção dos cromossomos mitóticos. Seguiu-se os seguintes passos.

- Injetar no dorso do animal suspensão (levedura);
- Deixar o peixe em aquário bem arejado, por um período de 48hs. Decorrido esse tempo, sacrificar o animal e retirar o rim;
- Acondicionar o material em pequenas cubas contendo de 5 a 10ml de solução salina (Hanks).
- Fragmentar bem o material, com o auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de suaves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até obter uma suspensão celular homogênea;
- Adicionar quatro gotas de Colchicina a 0,025%, e aguardar por 30 minutos;
- Ressuspender o material com auxílio de uma pipeta Pasteur, transferindo-o para tubos de centrifuga;
- Centrifugar por 10 minutos a 900rpm;
- Retirar o sobrenadante e acrescentar 10ml de solução hipotônica de KCl (0,075M).
- Incubar a suspensão obtida em estufa a 36-37°C, durante 20 minutos;
- Ressuspender o material com bastante cuidado, acrescentar algumas gotas de fixador recém preparado (metanol: ácido acético – 3:1);
- Ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos a 900rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur;
- Adicionar, vagarosamente, 5-7 ml de fixador, recém preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo;

- Centrifugar por 10 minutos a 900rpm;
- Ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de pipeta Pasteur;
- Repetir as etapas 12 a 14 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1 ml de fixador e ressuspender bem o material;
- Acondicionar em pequenos frascos tipo “eppendorf”, ou trabalhando conforme os seguintes passos;
- Pingar 3 a 4 gotas de suspensão obtida, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, mantida em água destilada, na geladeira ou sobre uma lâmina seca, aquecida suavemente (35 a 30°C), em chapa aquecedora;
- Escorrer o excesso de material, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel filtro;
- Secar diretamente ao ar;
- Corar com Giemsa a 5% em tampão (pH 6,8) durante 8 minutos;
- Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar.

### **3.2.2. Bandamentos Cromossômicos**

#### **3.2.2.1. Detecção da Heterocromatina Constitutiva – Bandas C**

Para o estudo da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações, de uso corrente no Laboratório de Citogenética (DGE/UFSCar).

- Tratar a lâmina preparada segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos com HCl 0,2 N em Banho-Maria à temperatura 40°C, por 10 minutos;
- Lavar a lâmina em água deionizada;
- Incubar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário a 5% durante cerca de 1 minuto, a 40°C.
- Após o tempo lavar rapidamente em uma solução de HCl 0,2N;

- Lavar em água deionizada e secar ao ar;
- Incubar a lâmina em solução de 2x SSC, por 30 minutos a 60°C;
- Lavar em água deionizada e secar ao ar;
- Corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8), por 8 minutos;
- Lavar em água deionizada e secar ao ar.

### **3.2.2.2. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs)**

A caracterização das regiões organizadoras de nucléolo utilizou-se a técnica descrita por Howell & Black (1980), obedecendo aos seguintes passos:

- Pingar sobre a lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, uma gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1ml para cada 100 ml de solução);
- Adicionar, sobre a gota anterior, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%; 03. Misturar bem o cobrir com lamínula;
- Incubar em estufa a 60°, por um período de aproximadamente 5 minutos, dependendo de um monitoramento de coloração de lâmina e dos cromossomos, ao microscópio;
- Após o tempo apropriado, quando os cromossomos assumem uma totalidade amarelada e as RONS e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água deionizada, possibilitando que a lamínula seja retirada naturalmente pela própria água.

### **3.2.2.3. Técnica de Hibridação “IN SITU” com DNAr (Pinkel *et al.*, 1986; Hankalo & Elgin,1991)**

*Preparação da sonda de DNA*

- Adicionar em um tubo de 1,5mL mantido no gelo: 5µL 10x dNTP mix; 1µgDNA;5µL de água destilada (q.s.p.45µL); 5µL 10x Enzima mix.
- Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g);
- Incubar a 16°C por uma hora
- Adicionar 5µL de Stop Buffer;
- Precipitar o DNA com acetato de sódio(5µL) e etanol absoluto gelado (110µL).  
Misturar invertendo o tubo. Levar ao freezer -20°C por duas horas;
- Centrifugar a 15000g por dez minutos;
- Cuidadosamente remover o sobrenadante e secar o pellet;
- Ressuspender o pellet em 50µL de água autoclavada;
- Repetir os passos 5 e 6 ;
- Ressuspender em 80µL de tampão TE[10mM Tris-HCl (pH 7.5)- 1mMEDTA] e armazenar a 20°C.

#### *Preparação das Lâminas*

##### *(Tratamento com RNase):*

- Incubar as lâminas em 90µL de RNase 0,4% em2xSSC, por uma hora em câmara úmida a 37°C.
- Lavar três vezes em 2xSSC por cinco minutos cada;
- Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

##### *(Pós-Fixação):*

- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM de cloreto de magnésio durante dez minutos em temperatura ambiente;
- Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente;

- Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%(agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada;

#### *Pré-Hibridação*

- Desnaturar o DNA em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70°C;
- Desidratar o material em série alcoólico de etanol 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada;
- Deixar secar ao ar, enquanto prepara-se a solução de hibridação.

#### *Solução de Hibridação*

- Adicionar aos 80µL de sonda marcada: 200µL de formamida pura; 80µL de sulfato dextrano 50% (concentração final de 10%); 40µL de 20xSSC.

#### *Hibridação*

- levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois;
- colocar 40µL da solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula;
- Deixar as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida a 37°C overnight.

#### *Lavagens*

- Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por cinco minutos apenas para tirar a lamínula.



- Lavar duas vezes em formamida 20% em 0,1xSSC a 42°C durante cinco minutos cada;
- Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42°C durante cinco minutos cada;
- Lavar uma vez em 2xSSC a 42°C durante cinco minutos ;
- Lavar as lâminas em Tween 20/20xSSC durante 5 minutos em temperatura ambiente;

Comentário:

Comentário:

Comentário:

#### *Detecção do Sinal:*

- Incubar as lâminas em tampão NFDm por quinze minutos;
- Lavar duas vezes em Tween 20/2xSSC durante 5 minutos em temperatura ambiente;
- Incubar as lâminas com 90µL de solução de FITC-avidina, durante trinta minutos em câmara úmida escura em temperatura ambiente;
- Lavar três vezes em Tween 20/2xSSC durante 5 minutos em temperatura ambiente;
- Incubar as lâminas com 90µL de solução de anti-avidina (conjugada com biotina), durante trinta minutos em câmara úmida escura em temperatura ambiente;
- Repetir passo 4 (lavagem)
- Repetir passo 3 (FITC)
- Repetir passo 4 (lavagem)
- Repetir passo 5 (anti-avidina)
- Repetir passo 4 (lavagem)

- Repetir passo 3 (FITC)
- Repetir passo 4 (lavagem)
- Desidratar em série alcoólica de etanol 70% (agitação), 85% e 100%, por cinco minutos cada e deixar secar ao ar.

### 3.2.3. Análise Cariotípica

As preparações foram analisadas em microscópio de campo claro, usando-se uma objetiva de imersão (aumento 1000 X), estabelecendo-se os números diplóides modais nos diferentes espécimes. As melhores metáfases foram selecionadas e fotografadas em microscópio Apophot Nikon, usando-se filme Copex Pan A.H.U. Tri 13, Agfa, regulado para 25 ASA, revelado em Dektol, da Kodak.

As cópias dos negativos foram reproduzidas em papel Kodabromide F3. Os cromossomos foram recortados, sendo feito o pareamento dos prováveis homólogos.

A classificação dos cromossomos foi realizada mediante medidas cromossômicas, com auxílio de compasso de ponta seca e paquímetro, determinando-se o comprimento do braço menor, do braço maior e o comprimento total do cromossomo.

Os cromossomos foram identificados de acordo com os critérios de relação de braço (RB), propostos por Levan *et al.* (1964) e classificados como metacêntricos (M: RB = 1,00 a 1,70), submetacêntricos (SM: RB = 1,71 a 3,00), subtelocêntricos (ST: RB = 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (A: RB > 7,00).

### 3.2.4. Montagem dos Cariótipos

O cariótipo final foi organizado dispondo os cromossomos em ordem decrescente de tamanho, combinando o ajuste visual e as medidas efetuadas. Foram considerados os quatro grupos cromossômicos : **M** (metacêntrico), **SM** (submetacêntrico), **ST** (subtelocêntrico) e **A** (acrocêntrico), os quais se mostraram adequados para as espécies em estudo.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Estudos cariotípicos em *Hypostomus albopunctatus*.**

Foram analisados 10 exemplares. Destes, 7 apresentaram melhores resultados sendo 4 fêmeas e 3 machos (Figura 5B). O número diplóide encontrado foi  $2n=74$  para ambos os sexos (Tabela 1).

Na figura (5) observa-se o cariótipo dessa espécie, que é constituído por 5 pares de cromossomos metacêntricos, 10 pares submetacêntricos e 22 pares subtelo/acrocêntricos. Não foi verificada nenhuma diferenciação cromossômica entre os sexos.

As regiões organizadoras de nucléolo se apresentaram diversificadas, com até 3 cromossomos marcados pelo Nitrato de Prata, caracterizando nesta espécie RONS múltipla (Tabela 2), sendo um cromossomo acrocêntrico com marcações terminais no braço longo e um par de submetacêntricos pequenos, com marcações teloméricas nos braços curtos (Figura 6A e 5A em destaque).

As preparações para bandeamento C evidenciaram grandes blocos de heterocromatina constitutiva na região intersticial do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos e no braço curto de par de cromossomos submetacêntricos. Também puderam ser identificadas marcações bem evidentes, na região pericentromérica do braço longo de um par de cromossomos metacêntricos grandes, assim como marcações tênues em regiões centroméricas de cromossomos submetacêntricos (Figura 6B).

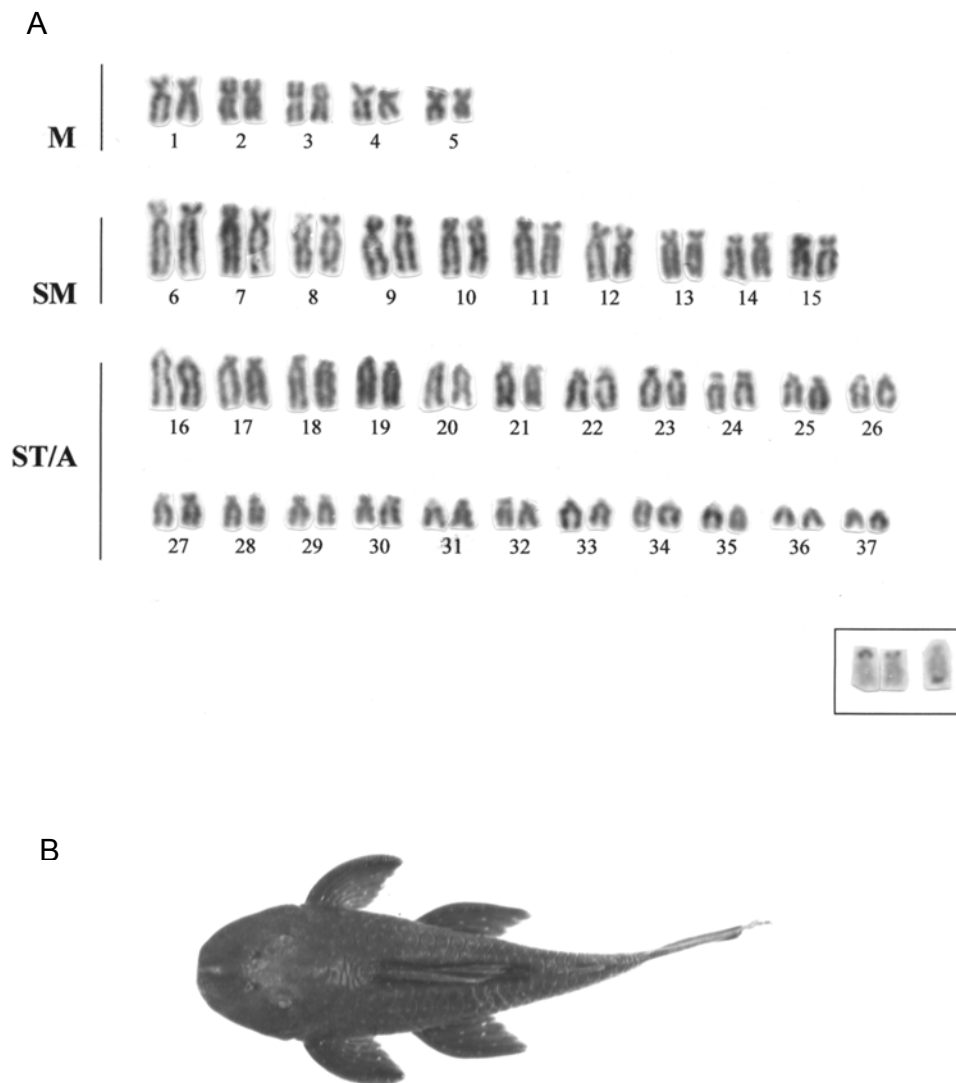
Um par de cromossomos submetacêntricos e outro cromossomo acrocêntrico apresentaram marcas conspícuas após hibridação fluorescente *in situ* (sonda DNAr 18s), sendo estas marcações coincidentes às das Ag-RONS (Figura 7).

**Tabela (1).** Números cromossômicos diplóides de *Hypostomus albopunctatus*:

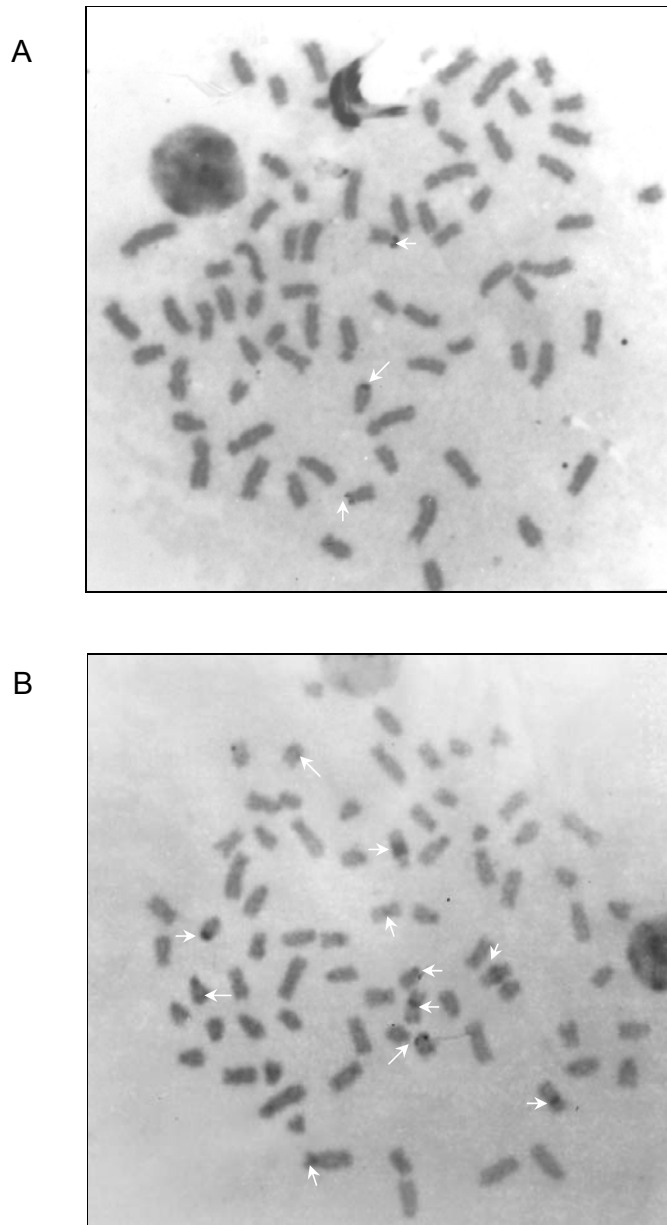
Número do Peixe	Sexo	Números Diplóides			Total de cel.
		73	74	75	
15438	♀	02	10	01	13
15439	♀	03	27	01	31
15610	♀	01	05	01	07
16142	♀	02	30	-	32
15618	♂	03	16	01	20
15616	♂	01	27	01	29
15615	♂	01	08	-	09
-	<b>Total de cel.</b>	13	123	05	<b>141</b>

**Tabela (2).** Números de regiões organizadoras de nucléolos de *Hypostomus albopunctatus*:

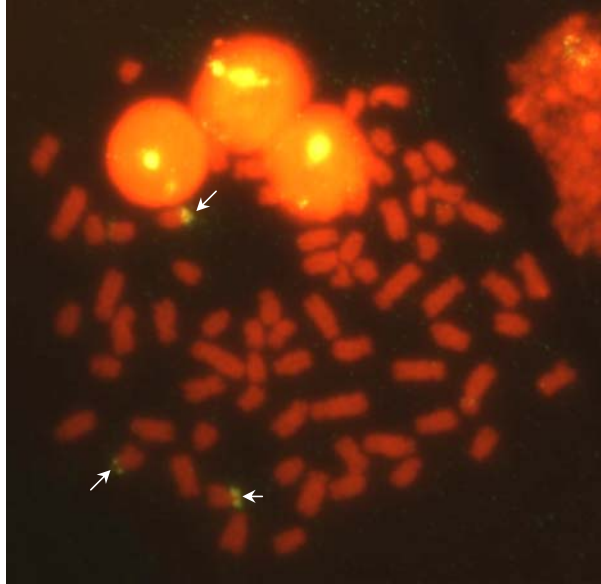
Número do Peixe	Sexo	Número de RONS			Total de cel.
		1	2	3	
15438	♀	-	10	03	13
15439	♀	01	24	05	30
15610	♀	-	05	01	06
16142	♀	01	23	02	27
15618	♂	01	15	03	19
15616	♂	-	22	04	26
15615	♂	-	06	02	08
-	<b>Total de cel.</b>	03	106	20	<b>129</b>



**Figura (5).** Cariótipo convencional de *Hypostomus albopunctatus* do rio Piracicaba (SP)  $2n=74$  (A). No destaque, cromossomos marcados com Nitrato de Prata. Em (B) exemplar fêmea de *H. albopunctatus* com 16 cm (comprimento total).



**Figura (6).** Metáfases de *H. albopunctatus*. Em (A) metáfase apresentando a totalidade dos cromossômicos marcados com Nitrato de Prata. Em (B) metáfase evidenciando padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva (setas).



**Figura (7).** Hibridação fluorescente *in situ* com sonda DNAr 18S , em metáfase de *H. albopunctatus*. A setas indicam os sítios marcando três cromossomos, dois submetacêntricos e um acrocêntrico.



#### **4.2. Estudos cariotípicos em *Liposarcus anisitsi*.**

Foram analisados 14 exemplares. Destes 10 apresentaram melhores resultados, sendo 7 fêmeas e 3 machos.

O número diplóide verificado para ambos os sexos foi de  $2n=52$  (Tabela 3). Em todos exemplares analisados não foi observada nenhuma diferenciação cromossômica entre os sexos.

A figura (8A) corresponde ao cariótipo da espécie que é constituído por 8 pares de cromossomos metacêntricos, 14 pares de cromossomos submetacêntricos, 3 pares de subtelocêntricos e 1 par de acrocêntricos.

Pela impregnação com Nitrato de Prata, foi observado nesta espécie até duas RONS ativas (Tabela 4), caracterizando, portanto, RONS simples (Figura 9A). A marcação se localizada na posição terminal do braço longo do par 10 submetacêntrico (Figura 8 em destaque).

O padrão de heterocromatina constitutiva apresentou-se em blocos mais conspícuos na região terminal do braço longo do par 10 (sendo esta marcação adjacente à zona de marcação das RONS), e no par 11, assim como na região intersticial do braço longo do par 23 (Figura 8B).

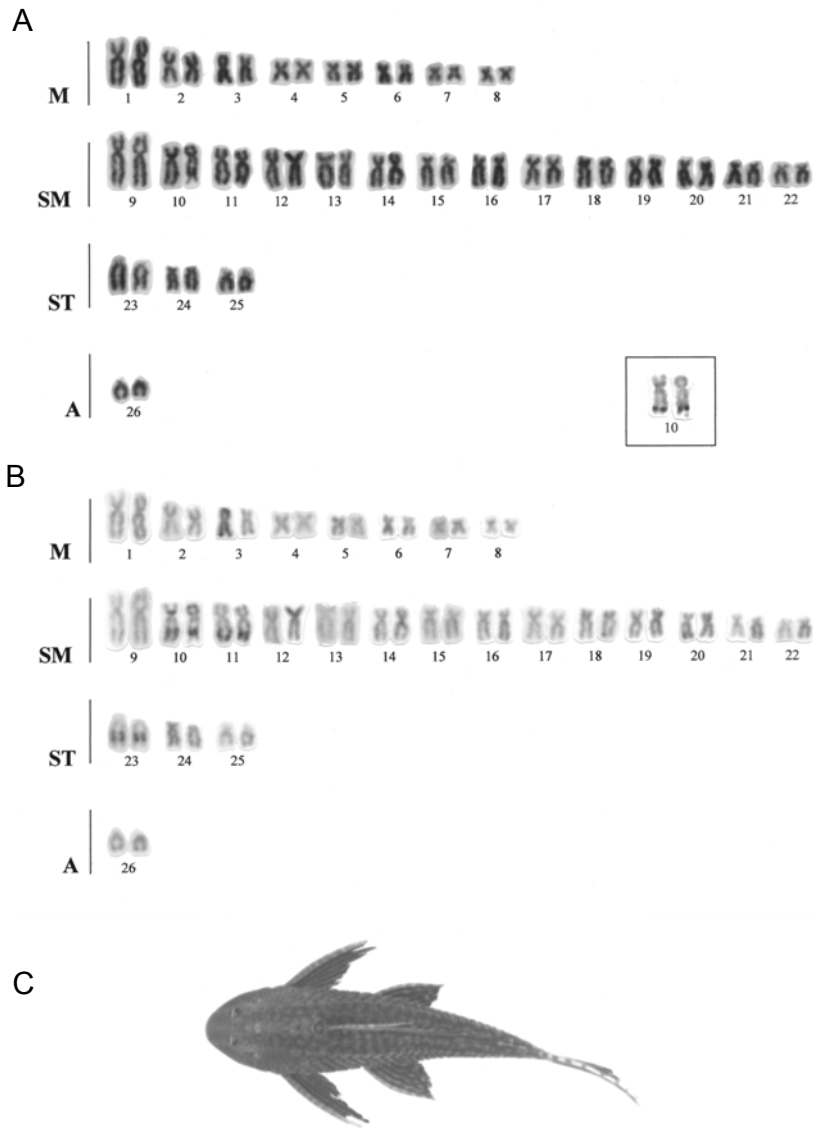
A técnica de FISH, mostrou a presença de genes ribossômicos localizados na porção terminal do braço longo do par 10, correspondente as Ag-RONS, não sendo observado nenhum sinal adicional (Figura 9B).

**Tabela (3).** Números cromossômicos diplóides de *Liposarcus anisitsi*:

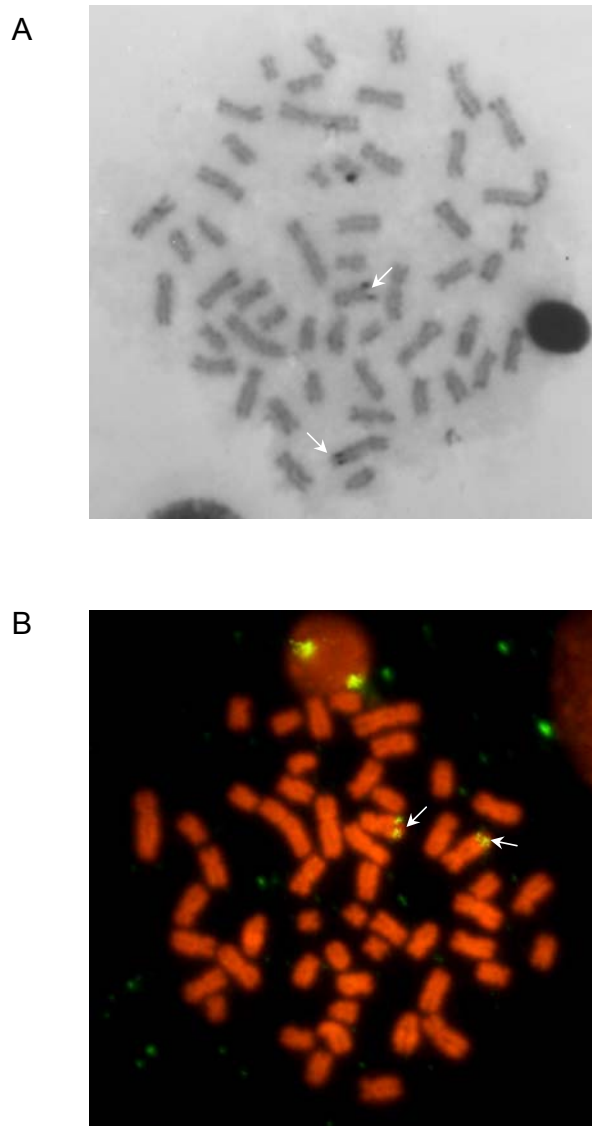
Número do Peixe	Sexo	Números Diplóides			total de células
		51	52	53	
15427	♀	04	18	01	23
15429	♀	06	34	-	40
15430	♀	01	10	-	11
15432	♀	-	09	01	10
15433	♀	03	27	01	31
15434	♀	03	44	02	49
15435	♀	04	24	01	29
15436	♂	01	06	-	07
15437	♂	02	13	-	15
16141	♂	01	30	01	32
-	<b>Total de cel.</b>	25	215	7	<b>247</b>

**Tabela (4).** Números de regiões organizadoras de nucléolos de *Liposarcus anisitsi*:

Número do Peixe	Sexo	Número de RONS		total de células
		1	2	
15429	♀	-	17	17
15433	♀	01	28	29
15434	♀	03	33	36
15435	♀	01	24	25
15436	♂	-	04	04
15437	♂	01	10	11
16141	♂	02	29	31
-	<b>Total de cel.</b>	08	145	<b>153</b>



**Figura (8).** Cariótipo convencional de *Liposarcus anisitsi* do rio Piracicaba (SP)  $2n=52$  (A). Em (B) metáfase seqüenciada para banda C. Em destaque par cromossômico marcado com nitrato de prata. Em (C) exemplar de *L. anisitsi* com 28 cm (comprimento total).



**Figura (9).** Em (A) metáfase de *L. anisitsi* apresentando o par ativo de cromossomos submetacêntricos marcados com nitrato de prata. Em (B) localização dos genes ribossomais 18S por FISH.

### 4.3. Estudos cariotípicos em *Corumbataia cuetae*.

Foram analisados 90 exemplares. Destes 28 apresentaram melhores resultados, sendo 17 fêmeas e 11 machos. O número diplóide determinado foi de  $2n = 54$  cromossomos, para ambos os sexos. (Tabela 5).

Os cariótipos de fêmeas e machos são apresentados na Figura 10, onde se observa 14 pares de cromossomos metacêntricos, 10 pares de cromossomos submetacêntricos e 3 pares de cromossomos subtelocêntricos. Nesses exemplares não foi verificada nenhuma diferenciação cromossômica entre os sexos.

Duas regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram observadas (Tabela 6), localizadas na região terminal do braço curto do par número 2, caracterizado como metacêntrico (Figura 11B). As marcações apresentaram-se heteromórficas quanto ao tamanho (Figuras 10 *a*, *b* e *c*) e após análises seqüenciais das metáfases em Giemsa/Prata e Giemsa/bandeamento C, observou-se que as constrições secundárias evidenciadas no segundo par de cromossomos metacêntricos correspondem as RONs (Figuras 10 *d* e *e*).

O padrão de heterocromatina constitutiva foi semelhante para ambos os sexos, sendo encontrado no par de cromossomos portador das RONs em grandes blocos heterocromáticos próximos ao centrômero (Figura 11C). A região de heterocromatina constitutiva localiza-se adjacente à região de constrição secundária, as quais são bandas C negativas (Figuras 10 *f* e *g*).

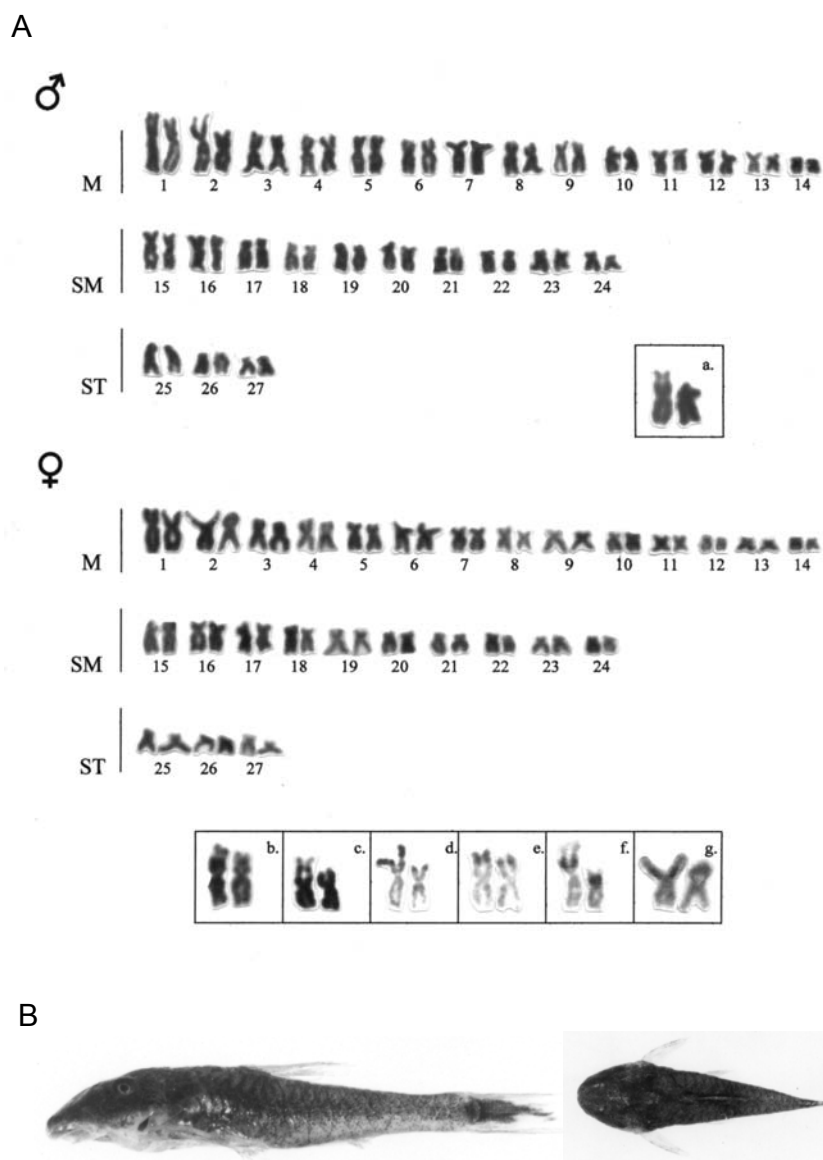
A técnica de FISH, mostrou a presença de genes ribossômicos localizados na porção terminal do braço curto do par 2, correspondente as Ag-RONs, confirmando também o heteromorfismo de tamanho dessas regiões (Figura 12).

**Tabela (5).** Números cromossômicos diplóides de *Corumbataia cuestasae*:

Número do Peixe	Sexo	Números Diplóides			Total de células
		53	54	55	
15919	♀	01	03	-	04
15961	♀	-	02	-	02
16102	♀	01	09	-	10
16103	♀	05	31	01	37
16110	♀	01	12	-	13
16185	♀	01	05	-	06
16186	♀	-	07	01	08
16187	♀	-	03	-	03
16188	♀	01	09	-	10
16197	♀	-	03	-	03
16202	♀	01	07	01	09
16203	♀	-	07	-	07
16205	♀	01	03	-	04
16246	♀	01	05	-	06
16258	♀	01	06	-	07
16264	♀	01	05	-	06
16265	♀	04	11	01	16
15856	♂	01	02	-	03
15891	♂	03	08	-	11
15920	♂	01	05	-	06
16247	♂	-	02	-	02
16259	♂	-	02	-	02
16267	♂	-	04	-	04
16268	♂	-	03	01	04
16269	♂	01	04	-	06
16270	♂	-	02	01	03
16271	♂	01	08	-	09
16272	♂	01	04	-	03
-	<b>Total de cel.</b>	27	168	06	<b>201</b>

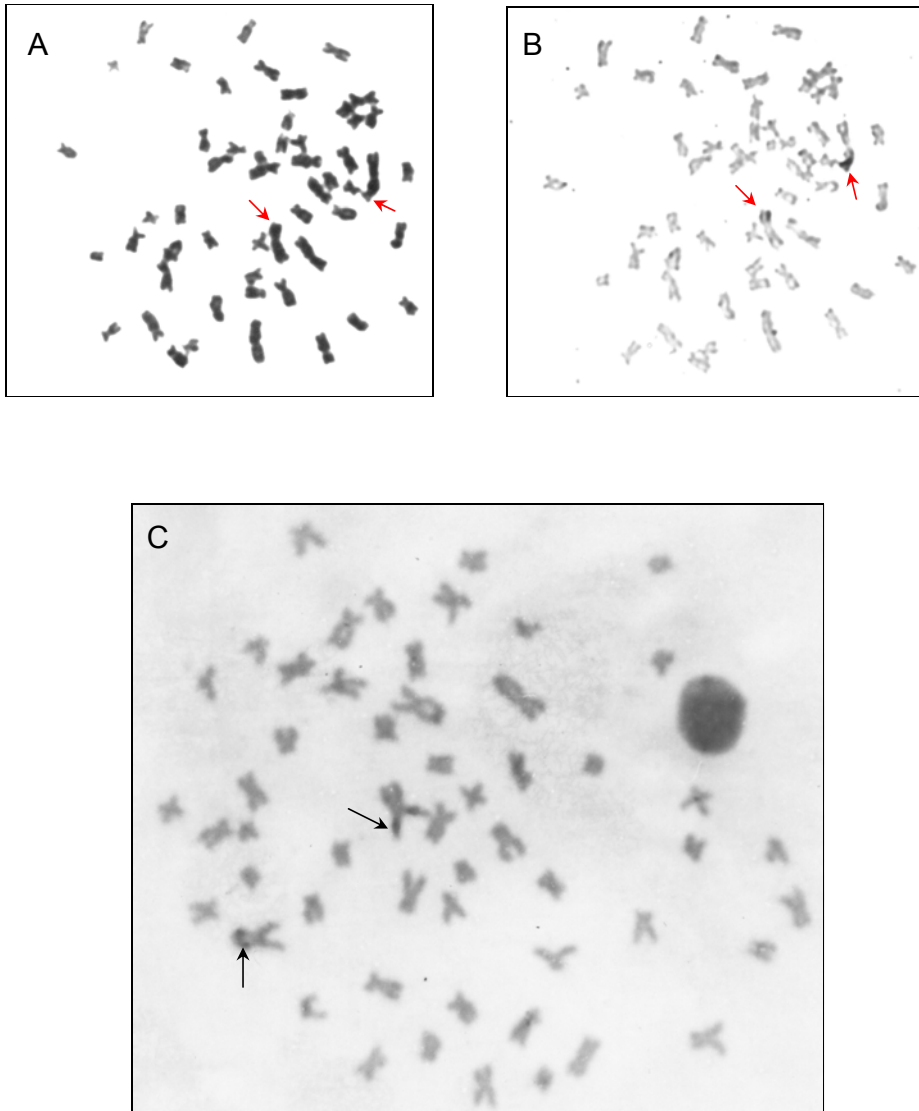
**Tabela (6).** Número de regiões organizadoras de nucléolos de *Corumbataia cuetae*:

Número do Peixe	Sexo	Número de RONS		Total de células
		1	2	
16103	♀	-	02	02
16258	♀	01	04	05
16264	♀	-	03	03
16265	♀	-	03	03
16247	♂	-	01	01
16267	♂	-	02	02
16268	♂	-	02	02
16270	♂	-	04	04
16271	♂	-	05	05
-	<b>Total de cel.</b>	01	26	<b>27</b>

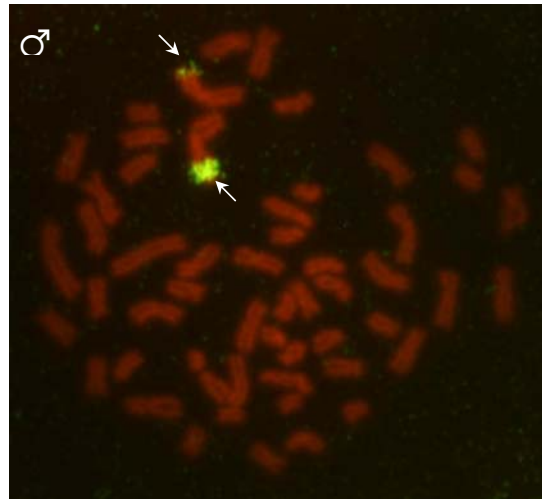
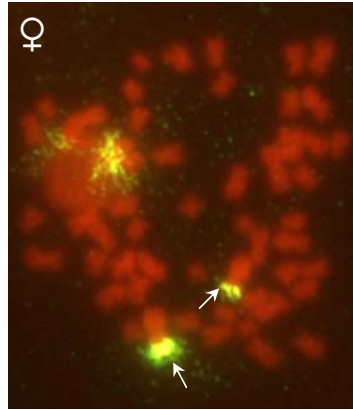


**Figura : (10).** Em (A) cariótipo convencional de macho e fêmea de *Corumbataia cuestae*, do córrego da Lapa (SP)  $2n=54$ . Em destaque nos quadros: (a), (b) e (c) constrições secundárias heteromórficas; (d) e (e) marcações das Ag-RONS; (f) e (g) marcação de heterocromatina constitutiva. Em (B) exemplar fêmea de *C. cuestae*, com 3,1cm de comprimento total.





**Figura (11).** Metáfases de *C. cuestae*, corada com Giemsa (A) e seqüencialmente com nitrato de prata (B), evidenciando a localização das Ag-RONs na contração secundária do par metacêntrico nº 2. Em (C) destaque para heterocromatina constitutiva localizada nesse mesmo par de cromossomos.



**Figura (12).** Metáfases de fêmea e macho respectivamente mostrando a localização dos genes ribossomais 18S por FISH em *C. aestae*.

## **5. DISCUSSÃO**

### 5.1. A Variabilidade Cariotípica da Subfamília Hypostominae e suas Implicações para Estudos Citotaxonômicos

Segundo Artoni & Bertollo (1996), ocorre uma grande variação no número diplóide em Loricariidae, particularmente em algumas subfamílias como em Hypostominae, cujo gênero *Hypostomus* apresenta o número diplóide variando interespecificamente de  $2n=52$ , em *Liposarcus* sp., a  $2n=80$  cromossomos, em *Hypostomus* sp.E. Nas espécies com números diplóides menores predominam cromossomos com dois braços (metacêntricos e submetacêntricos), situação que de modo geral se inverte nas espécies com maiores números diplóides, onde predominam cromossomos subteloicêntricos e acrocêntricos. Os cariótipos com menor número diplóide são considerados os mais conservados enquanto que os cariótipos com maior número diplóide são tidos como derivados. Segundo aqueles autores essas alterações cromossômicas teriam como base principal os rearranjos Robertsonianos, principalmente fissões cêntricas, que teriam incidido com maior relevância durante a evolução desse grupo, não implicando, contudo, que as espécies cariotipicamente mais conservadas sejam consideradas menos evoluídas que as demais.

Outras subfamílias pertencentes aos Loricariídeos apresentam uma diversidade cariotípica bastante acentuada em relação ao número diplóide, como ocorre em Loricariinae, com as populações de *Rineloricaria*, alvo dos trabalhos realizados por Giuliano-Caetano (1998), onde se observou a existência de correlação entre o aumento do número diplóide e à diminuição na quantidade de cromossomos de dois braços, a exemplo do que ocorre em *Rineloricaria* sp. ( $2n=70$ ), que apresenta um cariótipo dotado de 68 cromossomos subteloicêntricos (ST) e acrocêntricos (A) e na espécie *Loricaria* sp. ( $2n=66$ ) que apresenta 62 cromossomos ST/A.

Esses dados reforçam a idéia de que rearranjos cromossômicos sucessivos, possivelmente do tipo fissão cêntrica, poderiam estar envolvidos no processo evolutivo desse grupo e, dessa maneira, pode-se sugerir que um alto número diplóide represente um carácter derivado na subfamília Loricariidae (Alves, 2000). Pressupondo que o estado ancestral para o número diplóide entre os loricariídeos seja ao redor de  $2n=54$  cromossomos, Artoni e Bertollo (2001) consideram que espécies com  $2n$  acima desse valor devam representar formas cariotípicas mais derivadas. Em conjunto, os dados disponíveis

para os gêneros *Hypostomus*, *Liposarcus*, *Rhinelepis*, *Pognopoma* e *Pterygoplichthys*, indicam que tanto rearranjos Robertsonianos quanto inversões pericêntricas atuaram no processo de diversificação cariotípica dos Hypostominae (Kavalco, 2003). Entretanto, é possível que esta diversidade cromossômica seja também reflexo de uma possível origem polifilética dos Hypostominae, como indicado por estudos de filogenia morfológica (Schaefer, 1987).

Por outro lado, também são encontradas nesta subfamília variações quanto aos tipos cromossômicos, como pode ser observado, por exemplo, em espécimens de população de *Hypostomus sp.D*, do rio Mogi-Guaçu (Artoni, 1996). O mesmo também pode ser observado em outras subfamílias, como em Loricariinae, onde foi encontrado para espécie *Rineloricaria latirostris* (Rio Passa-Cinco-SP), um número diplóide  $2n=44$  cromossomos para a maioria dos indivíduos desta população, havendo, porém, pequenas diferenças na fórmula cariotípica intrapopulacional (Giuliano-Caetano, 1998).

De acordo com Artoni (1996), em virtude da estrutura não conservativa dos *Hypostomus*, é possível se caracterizar individualmente diferentes espécies, podendo-se considerando como caracteres diagnósticos alguns dados cromossômicos tais como: número diplóide, fórmula cariotípica, número e posição das RONS, além da quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva. Além disso, pode-se observar diferentes tendências evolutivas dentro de um mesmo grupo fazendo uso dessas informações.

Os dados citogenéticos obtidos pelo presente estudo, pertinentes as espécies de *Hypostomus albopunctatus* e *Liposarcus anisitsi* coletadas no Rio Piracicaba (SP), se mostram congruentes aos resultados citogenéticos obtidos por Artoni (1996) em espécies de *H. albopunctatus* coletadas no Rio Mogi-Guaçu (SP) e espécies de *L. anisitsi*, coletadas no Rio Preto (SP). Quando comparados, mostram que diferentes populações dessas espécies estão mantendo o número diplóide e a conservação da macroestrutura cromossômica, além da notória semelhança no padrão das RONS e na distribuição da heterocromatina constitutiva para ambas as espécies.

Para a espécie *H. albopunctatus*, observou-se uma variação no padrão das RONS. A impregnação por Nitrato de Prata evidenciou marcações em três cromossomos (no braço menor de um par de cromossomos submetacêntricos pequenos e no braço maior de um cromossomo acrocêntrico grande), enquanto a população de *H. albopunctatus* do Rio

Mogi-Guaçu, evidenciou marcações em quatro cromossomos (um par de cromossomos submetacêntricos pequenos e um par de cromossomos acrocêntricos grandes), marcações estas, que se apresentaram coincidentes para ambas as populações analisadas. Admite-se, para detecção das Ag-RONs, a necessidade de atividade transcricional dos genes ribossomais durante a interfase precedente (Howell, 1977; Hubbel, 1985), uma vez que a Prata se agrega a proteínas nucleolares e não diretamente ao DNAr (Miller *et al.*, 1976), o que poderia explicar os resultados obtidos no presente estudo.

Contudo, a utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sonda de rDNA 18S, também evidenciou marcações em apenas três cromossomos, os equivalentes aos obtidos por impregnação pelo Nitrato de Prata, confirmando assim RONS do tipo múltipla para esta espécie. A marcação pertinente de 3 sítios com FISH, determina a provável deleção de um sítio no par de cromossomos acrocêntricos, determinando assim a possível explicação para a divergência encontrada na quantidade de cromossomos portadores das RONS da população do Rio Mogi-Guaçu.

Para a espécie *L. anisitsi*, foram encontradas apenas pequenas variações na classificação quanto à macroestrutura cariotípica entre as populações, onde as espécies analisadas pelo presente trabalho apresentaram um cariótipo constituído por  $2n=52$  (8M; 14SM; 3ST; 1A), enquanto as espécies analisadas do Rio Preto, apresentaram um cariótipo constituído por  $2n=52$  (8M; 12SM; 4ST; 2A). Essas diferenças se apresentaram apenas na classificação cromossômica, não inferindo quaisquer alterações significativas quanto à configuração dos cromossomos de ambas as populações analisadas. A sutil diferença encontrada pode ser explicada se considerarmos que possíveis erros de interpretação ou na mensuração dos cromossomos tenham ocorrido. Segundo Marques (2002), populações de espécies como o mesmo número cromossômico, porém coletadas em localidades diferentes, podem apresentar variações na estrutura cariotípica. Estas variações podem estar acontecendo devido a diferenças nas medidas cromossômicas adotadas entre os diferentes autores, devido a classes cromossômicas muito próximas ou podem mesmo ser resultado de rearranjos cromossômicos não Robertsonianos, como inversões e translocações, além da adição de heterocromatina, caracterizando citótipos distintos.

Nos demais aspectos as 2 populações de *L. anisitsi* mostram-se concordantes, apresentando o mesmo número, localização e tipo de RONS, (confirmadas a partir da

utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sonda 18S, nas espécies do presente trabalho) e um padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva muito semelhante.

Em síntese, podemos considerar que *H. albopunctatus* e *L. anisitsi*, ora analisadas, mantêm uma estrutura cariotípica relativamente estável quando comparamos os resultados citogenéticos já obtidos para outras populações dessas mesmas espécies disponíveis na literatura. Paralelamente, os Hypostominae, ao lado de sua grande variabilidade cariotípica, apresentam algumas tendências mais conservativas, como a presença de heterocromatina constitutiva adjacente ou coincidente com as RONS e a posição telomérica dessas regiões, na maioria das vezes no braço longo dos cromossomos.

## **5.2. A Variabilidade Cariotípica da Subfamília Hypoptopomatinae e suas Implicações para Estudos Citotaxonômicos**

A escassez de estudos citogenéticos, assim como as descrições de novos gêneros e espécies, despertam o interesse de pesquisadores a desenvolverem trabalhos que visem a caracterização cariotípica e estudos moleculares da subfamília Hypoptopomatinae. Assim como grande parte dos loricariídeos, o gênero *Corumbataia* não apresentava informações citogenéticas até o momento, sendo a espécie *Corumbataia cuestae*, objeto do presente trabalho, a primeira fonte de informações citogenéticas desse grupo.

Embora a família Loricariidae, como um todo, apresente uma extensa variabilidade em número cromossômico diplóide, uma situação bastante divergente é verificada para os Hypoptopomatinae, onde se evidencia uma elevada constância quanto ao número diplóide entre as espécies já estudadas (Artoni, 1996). Das 15 espécies cariotipadas desta subfamília (incluindo do presente trabalho), 13 apresentam  $2n=54$  cromossomos, exceto em *Otocinclus aff. vestitus* com  $2n=72$  (Andreatta *et al.*, 1993) e *Hisonotus gibbosus* com  $2n=58$  (Andreatta *et al.*, 2000). Esses dados sugerem que as espécies da subfamília Hypoptopomatinae parecem ser mais conservadas e provavelmente as melhores reconhecidas como um grupo natural dentre os loricariídeos.

Entretanto a constância no número diplóide  $2n=54$ , não parece ser uma característica exclusiva da subfamília Hypoptopomatinae, pois também é observada em todas as outras espécies cariotipadas das subfamílias Neoplecostominae e Hemipsilichthiinae. Segundo Alves (2000), essas subfamílias (Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Hemipsilichthiinae) são consideradas basais dentre os Loricariidae.

*Corumbataia cuestae*, também evidencia número diplóide ( $2n=54$ ). Contudo apesar da constância do número diplóide, verificada na maioria das espécies dos hypoptopomatídeos, a macroestrutura do cariótipo apresenta grande variabilidade, ocorrendo constituições cariotípicas distintas para as diferentes espécies analisadas. Assim sendo, eventos que alteram a morfologia e não o número de cromossomos como as inversões pericêntricas, poderiam estar relacionados com a variabilidade da macroestrutura cariotípica verificada nas espécies com  $2n=54$ . Já eventos Robertsonianos, como fissão, poderiam explicar, em parte, a ocorrência do número cromossômico  $2n=72$  em *Otocinclus aff. vestitus* (Andreato *et al.*, 1992).

Os resultados também evidenciaram a ocorrência de RONS simples em *C. cuestae*, que, segundo Gold (1984) e Moreira-Filho *et al.* (1984) tem se mostrado mais freqüente entre os peixes, o que é uma característica também observada em todas as outras espécies da subfamília Hypoptopomatinae, como descrito por Andreato *et al.* (1994). Igualmente a sua localização na região intersticial de um único par de cromossomos metacêntricos grandes, pode ser observada em outros gêneros dessa subfamília, como: *Otocinclus affinis*, *Microlepdogaster leucofrenatus*, *Microlepdogaster sp.* e *Pseudotocinclus tietensis* (Andreato, *et al.*, 1994).

Artoni (1996), propôs que o fenótipo ancestral para a RON nos Loricariidae seja a localização terminal no braço longo de um par de cromossomos metacêntricos grandes, uma vez que este caráter está presente em Hypoptopomatinae e Hypostominae. Entretanto, existem também Loricariídeos que evidenciam RONS múltiplas, como verificado em muitos Hypostominae (Artoni e Bertollo, 2001).

Outro aspecto observado na espécie *C. cuestae*, foi o heteromorfismo quanto ao tamanho das RONS, fato também constatado por Andreato *et al.* (1994), onde o autor considera que essas regiões são muitas vezes heteromórficas quanto ao tamanho e estão



localizadas em diferentes posições nos cromossomos da maioria das espécies, evidenciando a variabilidade cromossômica do ponto de vista estrutural que ocorre nessa subfamília.

Situações polimórficas, que envolvem diferenças de tamanho das RONS entre cromossomos homólogos, são muito freqüentes entre espécies que apresentam RONS simples (Foresti *et al.*, 1981). Segundo Markovic *et al.* (1978), a diferença no tamanho das RONS entre cromossomos homólogos é possivelmente resultante de provável duplicação em tandem de uma das RONS ou são resultados de permutas desiguais, podendo ainda ser transmitidos por herança.

Os resultados das marcações obtidas pela técnica de hibridação fluorescente *in situ*, com sonda de rDNA 18S, foram coincidentes aos dados obtidos pela impregnação por Nitrato de Prata, confirmando o par 2 de cromossomos metacêntricos, como portador de RONS. Deve-se destacar que a diferença de tamanho das RONS entre os homólogos também foi bem evidenciada por FISH nesta espécie, caracterizando um heteromorfismo estrutural destas regiões. Até o presente momento, somente as espécies *C. cuestae* e *Hisonotus* sp. apresentam dados referentes à técnica FISH.

A correspondência entre as RONS e as constrições secundárias foi bem evidenciada em *C. cuestae*, o que é também observada em outras espécies de Hypoptopomatinae e de outros grupos de peixes. Entretanto, é importante salientar que este tipo de relação apesar de muito comum, nem sempre se faz presente em todas espécies de peixes (Paganelli, 1990).

As regiões de heterocromatina constitutiva (bandas C) se apresentaram tênues, presentes em regiões centroméricas e teloméricas de alguns cromossomos. Blocos heterocromáticos bem evidentes estão restritos a um par de homólogos, sendo esta marcação adjacente às RONS. Outras espécies da subfamília Hypoptopomatinae evidenciam bandas C em vários cromossomos, apresentando padrões de distribuição da heterocromatina distintos e característicos (Andreatta *et al.*, 1992). Segundo Takako *et al.* (2002), a distribuição da heterocromatina constitutiva na subfamília Hypoptopomatinae, apresenta-se bastante heterogênea, cujas marcações encontram-se em diferentes cromossomos, podendo ser intersticial, pericentromérica, terminal ou subterminal.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a espécie *C. cuestae* se enquadra nos padrões cariotípicos gerais presentes na subfamília Hypoptopomatinae,

principalmente no tocante ao número diplóide conservado ( $2n=54$ ), reforçando as indicações existentes de que, na evolução cariotípica desse grupo, os rearranjos cromossômicos numéricos tiveram um papel secundário comparativamente aos rearranjos cromossômicos estruturais.

## **6. CONCLUSÕES**

Estudos cromossômicos em três espécies pertencentes às subfamílias Hypostominae e Hypoptopomatinae permitiram concluir que:

- Entre os Hypostominae parecem ocorrer diferentes tendências de evolução cariotípica. Entretanto as espécies *Hypostomus albopunctatus* e *Liposarcus anisitsi* (analisadas pelo presente estudo) coletadas no rio Piracicaba (SP), apresentam-se relativamente conservadas, quando comparadas aos estudos citogenéticos de exemplares destas mesmas espécies coletadas em outras bacias.
- *H. albopunctatus* do rio Piracicaba-SP, mostram-se discrepantes quanto ao número de Ag-RONs (3), comparativamente à população do rio Mogi-Guaçu (4). Ao que tudo indica, a ocorrência de uma única RON no par acrocêntrico das espécimens do rio Piracicaba seja devido à uma deleção, visto que os resultados com o FISH também confirmaram apenas 3 RONs presentes nessas espécimens.
- Pequenas variações nas fórmulas cariotípicas, observadas entre as populações de *H. albopunctatus* e *L. anisitsi* (presente trabalho), e de outras populações dessas espécies (descritas na literatura) podem ser atribuídas à diferenças na classificação de alguns tipos de cromossomos mais problemáticos do cariótipo.
- Os dados obtidos com a espécie *Corumbataia cuestae*, primeira espécie descrita deste gênero, confirmam a marcante tendência conservativa dos hypoptopomatinae, não apenas na manutenção do número diplóide ( $2n=54$ ), mas também na caracterização de RONs simples e heteromórficas observadas em cromossomos metacêntricos grandes na maioria das espécies descritas desta subfamília.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGOSTINHO, A.A.; BORGHETTI, J.R.; DOMANICZKY, C.M. & OKADA, E.K. (1989). Produção pesqueira e situação de pesca no reservatório de Itaipu. **Seminário Nacional de Grandes Barragens**, 2: 1059-1075.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & FORESTI, F. AND TOLEDO-FILHO, S.A. (2000). Karyotypic evolution in Neotropical freshwater. **Chromosomes Today**, 13:169-182.

ALVES, A.L. (2000). Análise e evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichtiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. 129p. **Dissertação de mestrado** – Instituto de Biociências, área de concentração em zoologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP.

ANDREATTA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1992). Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariinae) I: XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. **Cytologia**, 57: 369-372.

ANDREATTA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1993). Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariinae) ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. **Cytogenetic. Cell Genet.**, 63: 215-220.

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

ANDREATTA, A.A.; ALVES, A.L.; FORESTI, F., OLIVEIRA, C. (2000). *Hisonotus gibbosus* (Teleostei, Loricariidae) segundo Hypoptopomatíneo com número diplóide diferente de 54 cromossomos. **Genet. Mol. Biol.**, 23 suppl.: p57.

ANGELESCU, O.R. & GNERI, F.S. (1949) Adaptaciones del aparato digestivo al regimen alimenticio en algunos peces del rio Uruguay del rio de La Plata. HI tipo omnívoro y ilifago en representantes de las familias “Loricariidae”y “Anostomidae”. **Revista Inst. Nacional de Investigación de Las Ciencias Naturales.**(6) : 159 – 272.

ARMBRUSTER, J.W. (1997). Phylogenetic relationships of the sucker mouth armored catfishes of the *Rhinelepis* group (Loricariidae: Hypostomine). **Copeia**, 1998: 620-636.

ARTONI, R.F., (1996). Estudos Citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus Lacépède (1803)*, (Pisces, Siluriformes). **Dissertação de mestrado**. PPG-Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos.p.162.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C., (1992). Regiões Organizadoras de Nucléolos e Heterocromatina Constitutiva em Peixes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). **IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. p.36.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C., (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v.49 (1): p.81-9.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C., (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, 63: 421-425.

ARTONI, R.F.; MOLINA, W.F.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI JR., P.M. (1999). Heterochromatin analysis in the fishes species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). **Genet. Mol. Biol.**, 22: 1-6.

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

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

BERTOLLO, L.A.C. (1978). Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae). **Tese doutorado**. Departamento de Genética e Matemática Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. 164p.

BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI JR., P.M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J. Fish Biol.**, 28: 153-159.

BERTOLLO, L.A.C.; CAVALLARO, Z.I. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish *Triplotheus guentheri*. **Cytogenet. Cell Genet.**, 60: 60-63.

BOESEMAN, M. (1974). On two Surinam species of Hypoptopomatinae, both new to science (Loricariidae, Siluriformes, Ostariophysi). **Proc. K. Ned. Akad. Wet.** 77(3): 257-271.

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

BRITSKI, H.A., (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. **In: Poluição e Piscicultura**: 79-108. Faculdade de Saúde Pública da USP- Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, SP.

- BRITSKI, H.A. (1997). Descrição de um novo gênero de Hypoptopomatinae, com duas espécies novas (Siluriformes, Loricariidae). *Papéis Avulsos Zool.*, v. 40: p. 231-55.
- BUSH, G.L.; CASE, S.M.; WILSON, A.C. & PATTON, J.L. (1977). Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74(9): 3942-3946.
- BURGESS, W.E. (1989). An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. Canadá. *T.F.H. Publications*. 784p.
- CENA. USP. SPN imaging modes. Disponível em: <[http:// www.cena.usp.br/piracena](http://www.cena.usp.br/piracena)>. Acesso em: 23 outubro 2003.
- EGOZCUE, J. (1971). Técnicas em citogenética. *Editorial Espax*, Barcelona
- EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. (1890). A revision of the South American nematognathi, or cat-fishes. *Occas. Papers Calif. Acad. Sci.*, v.1, p.1- 508.
- FENERICH, P.C. (1998). Estudo de conteúdo de DNA nuclear em células de peixes da ordem Siluriformes (Pices, Ostaryophysi), da região de Botucatu, SP. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- FENOCCHIO, A.S. & BERTOLLO, L.A.C. (1990). Supranumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genética*, 81: 193-198.
- FORESTI, F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & TOLEDO-FILHO, S.A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 31:137-144.
- GARAVELLO, J.C., BRITSKI, H.A., SCHAEFER, S.A.(1998). Systematics of the genus *Otothyris myers* 1927, with comments on geographic distribution (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae). *Am.Mus.Novit.*,v.3222,p.19.
- GIULIANO-CAETANO, L. (1998). Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). *Tese de doutorado*. Departamento de Genética e evolução, Universidade Federal de São Carlos-SP.
- GOLD, J.R. (1984). Silver staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer region in north American cyprinid fishes. *Copéia*, 1:133-139.
- GOSLINE, W.A. (1945). Catálogo dos nematognathos de água doce da América do Sul e Central. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro*, Ser. Zool., v.33, p. 1-138.
- HAMKALO, B.A. & ELGIN, S.C.R. (1991). Functional organization of the nucleolus: a laboratory guide. In: *Methods in Cell Biology*, 35: 670 pp.
- HOWELL, W.M. (1977). Visualization of ribosomal gene activity: silver stain proteins associated with RNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.



- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, **36**: 1014-1015.
- HOWES, G.J. (1983). The cranial muscles of loricarioid catfishes, their homologies and value as taxonomic characters (Teleostei: Siluridei). *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*, n 45, v.6, p. 309-345.
- HUBBEL, H.R. (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.*, **60**: 285-294.
- ISBRÜQUER, I.J.H. (1980). Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Verlagen en technische Gegevens*, **22**: 1-181.
- ISBRÜQUER, I.J.H., (1981). A treatise of the Loricariidae BONAPARTE 1831, a family of South American mailed catfishes, with emphasis on the subfamily Loricariinae (Pisces, Siluriformes). *Unpublished dissertation*, Univ. of Amsterdam, 224p.
- ISBRÜCKER, I.J.H. (2001). Nomenklator der gattungen und arten der harnischwelse, familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi). Datz – *Sonderheft Hamischwelse 2*, p. 25-32.
- KAVALCO, K.F. (2003). Contribuição citogenética à análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Paraitinga. *Dissertação de mestrado*. Departamento de Genética e evolução, Universidade Federal de São Carlos-SP.
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.C.A. AND MOREIRA-FILHO, O. (2004). Gene mapping of 5s rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cit. Gen. Res.* **106**: 107-110.
- KIRPICNIKOV, V.S. (1981). Genetic basis of fish selection. New York: *Springer-Verlag*.
- LANDE, R. (1979). Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. *Evolution*, **33**: 234-251.
- LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, **42**: 210-220.
- MARKOVIC, V.D., WORTON, R.G. & BERG, J.M. (1978). Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. *Hum. Genet.*, **41**: 181-187.
- MARQUES, M.B.A. (2002). Estudos citogenéticos em *Conorhynchus conirostris* e *Lophiosilurus alexandri* (Pisces, Siluriformes), Espécies endêmicas do rio São Francisco. *Dissertação de mestrado*. Departamento de Genética e evolução, Universidade Federal de São Carlos-SP.

- MENEZES, R.S. de (1949a). Alimentação de carí chicote, *Loricaria typus* Bleeker, da bacia do rio Parnaíba, Piauí, Brasil (Actinopterygii, Loricariidae, Loricariinae). **Ver. Brás. Bio.**, 9 (1): 479-484.
- MENEZES, R.S. de (1949b). Incubação labial de ovos pelo macho de *Loricaria typus* Bleeker, da Lagoa do Peixe, Piauí, Brasil (Actinopterygii, Loricariidae, Loricariinae). **Ver. Brás. Bio.**, 9 (3): 381-387.
- MICHELE, J.L. (1975). Estudos cariotípicos de algumas espécies da família loricariidae (*Pices*). Ribeirão Preto. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP.
- MICHELE, J.L.; TAKAHASHI, C. S. AND FERRATI, I. (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (*Pices*). **Cytologia**, 42: 539-546.
- MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAH, R.; & MILLER, O.J. (1976). Supresión of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Expl. Cell Res.**, 101: 235-243.
- MO, T., (1991). Anatomy and systematics of Bagridae (Teleostei), and silurid phylogeny. **Koeltz Scientific Books Press**, Koenigstein.
- MONTOYA- BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C. AND PAWLOWSKI, J. (1998). Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) basen on mitochondrial rRNA gene sequences. *In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 363-375.
- MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C. & GALETTI, JR., P.M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Can. J. Genet. Cytol.**, 26:564-568.
- MOREIRA-FILHO, O. (1989). Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scariipinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae Tetragonopterinae). **Tese de Doutorado**. Departamento de Ciências Biológicas- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.
- NELSON, J.S. (1984). **Fishes of the world**. 3rd edition, John Wiley & Sons. New York – USA, 600p.
- OLIVEIRA, C. (1991). Estudos citogenéticos e conteúdo de ADN na família Callichthyidae (*Pices*, Siluriformes). **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. SP, 155p.
- OLIVEIRA, C. & GOSZTONYI, A.E. (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. **Cariologia**, 53(1): 31-37.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L.F.A.; FORESTI, F. (2000). Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: *VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Manaus – AM, p24.

OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F. (1992). Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. *Netherlands J. Zoology*, **42**(2-3): 277-290.

OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; THAERON, C. & HUREAU, J. (1997). Antarctic fish chromosome banding: significance for evolutionary studies. *Cybium*, **21**(4): 399-409.

PAGANELLI, H. (1990). Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax* com especial referência a *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Considerações citotaxonômicas e evolutivas. *Dissertação de mestrado*. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos –SP.

PHILLIPS, R.B. & REED, K.M. (1996). Applications of Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, **140**: 197-216.

PINKEL, D. ET AL. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitive, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **83** : 2934-2938.

REGAN, C.T. (1904). A monograph of the fishes of the family Loricariidae. *Trans. Zool. Soc. London*, vol.17, p. 191-324.

REIS, R.E.; WEBER C. & MALABARBA, L.R., (1990). Review of genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pices, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse Zool.*, **97**: 729-766.

REIS, R.E., SCHAEFER, S.A. (1992). *Eurycheilus pantherinus* (Siluroidei: Loricariidae), a new genus and species of from southern Brazil. *Copeia*, v. **1992**, p.215-23.

REIS, R.E., SCHAEFER, S.A. (1998). New cascudinhos from southern Brazil: Systematics, Endemism, and Relationships (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Am. Mus. Novit.*, v. **3254**, p.1-25.

SCAVONE, D.P. & JÚLIO JR.,H.F. (1994). Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria sp.* females (Loricariidae-Siluriformes) from the Paraná river basin. *Revista de Ictilogia*, **2/3(1/2)**: 41-47.

SCHAEFER, S.A. (1987). Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the loricariids subfamilies (Pisces, Siluridei). In: \_\_\_\_\_. *Natural history museum of Los Angeles county*.30p.

SCHAEFER, S.A. (1988). A new species of loricariids genus *Parotocinclus* from Southern Venezuela (Pisces: Siluroidei). **Copeia**, v. **1988(1)**: 182-188.

SCHAEFER, S.A. (1991). Phylogenetic analysis of loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluridei, Loricariidae), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. **Zool. J. Linn. Soc.**, **102**: 1-41.

SCHAEFER, S.A. (1996). Nannoptopoma, a new genus of loricariid catfishes (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon and Orinoco river basins. **Copeia**, v. **1996**, p. 913-26.

SCHAEFER, S.A. (1997). The Neotropical cascudinhos: Systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Proc. Acad. Natl. Sci.**, v. **148**, p. 1-120.

SCHAEFER, S.A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., eds). Porto Alegre: EDIPCCRS, pp.375-400.

SCHAEFER, S.A., PROVENZANO, R. (1998). *Niobichthys ferrarisi*, a new genus and species of armored catfish from southern Venezuela (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyology Explore Freshwaters**, v. **8**, p. 221-30.

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

SUMNER, A.T. (1990) Chromosome banding. **Cambridge University Press**. 434p.

TAKAKO, A.K.; ANDREATA, A.A., OLIVEIRA, C. E FORESTI, F. (2000). Estudos citogenéticos preliminares em *Pseudotocinclos tietensis* do alto rio Juquiá, Vale do Ribeira (SP). **Genet. Mol. Biol.**, **23**: 67.

WASKO, A.P. & GALETTI JR., P.M. (2000). Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetics and Molecular Biology**, **23(1)**: 135-138.