



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

POLIANA ALVES SIDOL WOLF

**“ASPECTOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES EM TRÊS
ESPÉCIES DE HYPOSTOMINI (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE)”**

POLIANA ALVES SIDOL WOLF

**“ASPECTOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES EM TRÊS
ESPÉCIES DE HYPOSTOMINI (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE)”**

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

Orientadora: Professora Dra. Lucia Giuliano
Caetano

Co-orientador: Professor Dr. Fernando C. Jerep

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Wolf, Poliana .

Aspectos citogenéticos e moleculares em três espécies de Hypostomini (Siluriformes: Loricariidae) / Poliana Wolf. - Londrina, 2016.
76 f. : il.

Orientador: Lucia Giuliano Caetano.

Coorientador: Fernando Camargo Jerep.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Análise citogenética em Hypostomus e Pterygoplichthys - Teses. 2. Mapeamento físico de DNAs ribossômicos em Hypostomus e Pterygoplichthys - Teses. 3. Isolamento e caracterização do DNAr 5S de Hypostomus boulengeri - Teses. I. Giuliano Caetano, Lucia . II. Camargo Jerep, Fernando. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

POLIANA ALVES SIDOL WOLF

**“ASPECTOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES EM TRÊS
ESPÉCIES DE HYPOSTOMINI (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)”**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Professora Dra. Lucia Giuliano
Caetano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Professora Dra. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Professor Dr. Cláudio Henrique Zawadzki
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 16 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a duas pessoas muito especiais: minha avó Ingeborg Voight Alves, que fez eu me apaixonar ainda criança pelas letras, e ao meu primo Carlan Assis Alves, um grande guerreiro.

“Como na água o rosto corresponde ao rosto, assim o coração do homem ao homem.”

Provérbios, 27.

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente aos meus pais **Mario Sidol** e **Sandra Maria Alves Sidol**, e a minha irmã **Maiara Alves Sidol**. Vocês são o que tenho de mais precioso, e sem dúvida, meus maiores (e melhores) exemplos de vida. Sinto-me privilegiada pela educação e ensinamentos que recebi em nosso lar, pois ao sair dele percebi o quanto alguns valores, tão básicos, têm sido esquecidos. Obrigado por se fazerem presentes, mesmo na distância, e por todo apoio. **Amo vocês!**

Ao meu marido, **Ivan Rodrigo Wolf**. Sou grata por você ser um companheiro de verdade, que me apoia, alegra, e me acrescenta. Obrigado por fazer os nossos dias mais alegres! Seu sorriso e sua forma calma de levar a vida contagiam quem está do seu lado. **Eu te amo!**

A **Universidade Estadual de Londrina**, ao **Programa de Pós em Genética e Biologia Molecular**, e ao **Laboratório de Citogenética Animal (LACA)**, por fornecerem a estrutura física e os recursos necessários para a realização desta pesquisa.

A minha orientadora, Professora **Lucia Giuliano Caetano**, pelas oportunidades profissionais que me concedeu, e também, por sua enorme compreensão. Nestes três anos de convivência pude aprender muito mais do que citogenética, aprendi a admirá-la, e a me inspirar pela força com a qual luta por seus ideais. Poderia falar mais infinitas coisas, mas acredito que uma palavra simples resume todo meu sentimento: **Obrigada!**

Ao meu co-orientador, Professor **Fernando C. Jerep**, por sua disponibilidade, e por todas as correções feitas em meu trabalho, principalmente na área de filogenia; as discussões sobre este assunto ampliaram muito minha visão na área de biologia molecular.

Ao Professor **Cesar Martins**, e a sua orientada **Natália Venturelli**. Por me ajudarem a obter os resultados iniciais deste trabalho. Também agradeço a Nati por sua amizade e companheirismo.

Ao Professor **Cláudio Henrique Zawadzki** e a Professora **Renata da Rosa** por terem compartilhado comigo sua experiência profissional, e por enriquecerem o conteúdo deste trabalho com todas as suas sugestões.

Aos Professores e amigos, **Rafael Bueno Noletto**, **Renata da Rosa**, **Rogério Fernandes de Souza**, **Laurival Vilas-Bôas**, e **Gislayne Vilas-Bôas** (não quis separar o casal). Muito obrigado a vocês por todo incentivo e auxílio em questões profissionais e pessoais. Sempre lembrarei os momentos que dividimos, seja uma coleta nada produtiva em dia de geada (Rafael), um jantar de “caridade” e muitos pães de queijo pagos quando a bolsa não tinha “caído” (Rogério); coletas em rios poluídos na qual nem os maridos foram perdoados (Renata); ou a comemoração, com direito a foto no grupo, diante de uma placa com colônias brancas e azuis (Lori e Gis).

Aos meus companheiros da citogenética, **Ana Beatriz** (ou Ana B.), **Fábio**, **Jaqueline**, e **Juceli** (a maior incentivadora para que eu realizasse o isolamento do DNAr 5S de *Hypostomus boulengeri*). Por tudo que compartilhamos!

As minhas queridas amigas, **Rachel Milanezi** e **Raquel Bozini**. Agradeço igualmente as duas e as suas famílias, por serem pessoas tão generosas, humildes, e dispostas a ajudar. Sentirei saudades!

Aos colegas do **Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias**. Em especial: **Ana**, **Carla**, **Carol**, e **Priscilla**. Todas sempre muito prestativas! Obrigada pelo auxílio nos meus experimentos, pelas conversas, e cantorias (Sandy e Júnior que nos aguardem, porque a Sandy nós já temos hahaha).

A minha grande amiga **Ismara Oliveira** por ter cruzado meu caminho, e ter me feito voltar a acreditar que sou capaz. Às vezes me pego pensando que nada em nossas vidas ocorre por acaso, o sofrimento, a frustração, as alegrias; por isso sou grata por todas as situações que me levaram a conhecer você.

Ao **Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)**, por conceder a licença para a coleta dos exemplares.

Ao **CNPq**, pela bolsa de estudos. Que este recurso possa vir a privilegiar outros alunos em nosso país, incentivando a realização de pesquisas científicas, e possibilitando um acesso mais amplo a programas de pós-graduação.

WOLF, Poliana Alves Sidol. “**aspectos citogenéticos e moleculares em três espécies de hypostomini (siluriformes, loricariidae)**”. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Loricariidae é considerada uma das famílias de peixes mais diversas na região Neotropical. As variações exibidas por seus representantes, popularmente conhecidos como “cascudos”, estendem-se do nível intraespecífico ao populacional, o que dificulta o estabelecimento de filogenias, e estimativas da real diversidade dentro deste grupo. Recentemente, uma nova hipótese filogenética foi proposta, na qual, houve uma reorganização ao nível de subfamílias e tribos. Hypostomini, abordada no presente estudo, deixou o *status* de monogenérica e passou a ser representada por *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*. Desta forma, a fim de ampliar os dados citogenéticos existentes para estes dois gêneros, foram realizadas análises cromossômicas em espécimes de *Hypostomus boulengeri*, *Hypostomus ancistroides*, e *Pterygoplichthys ambrosettii*. Todos os espécimes de *H. ancistroides*, e *H. boulengeri*, apresentaram o $2n=68$, Ag-RONs múltiplas confirmadas pelo mapeamento físico com DNAr 18S, e sítios de DNAr 18S e 5S localizados em pares de cromossomos distintos. Porém, existiram características que possibilitaram a separação destas espécies, feito as fórmulas cariotípicas (FCs), o número dos sítios de Ag-RON e DNAr 18S, o tipo de cromossomo portador do sítio de DNAr 5S, e a maior quantidade de regiões heterocromáticas em *H. boulengeri*. Os exemplares de *P. ambrosettii* apresentaram o $2n=52$, Ag-RONs simples com heteromorfismo de tamanho confirmadas pelo mapeamento físico com DNAr 18S, sítios de DNAr 18 e 5S em um mesmo par cromossômico, e regiões heterocromáticas localizadas principalmente na região terminal dos cromossomos. Diferenças nas FCs podem indicar a ocorrência de rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica, que alteram a o tipo cromossômico sem modificar o número diploide, enquanto que polimorfismos em sítios de DNAs ribossômicos podem refletir a ocorrência de *crossing over* desigual, ampliações e/ou transposições. De fato, o isolamento do DNAr 5S de *H. boulengeri* possibilitou a identificação de elementos dentro da região espaçadora, que poderiam explicar as diferenças observadas em posição e tamanho destas repetições em um genoma. Dentre eles, sequências repetitivas que podem ter sido originadas por duplicações; regiões que podem formar estruturas secundárias e favorecer a ocorrência de rearranjos genômicos, e elementos transponíveis. Além disso, a caracterização desta sequência possibilita a utilização dos clones para mapeamento físico em estudos futuros.

Palavras-chave: Cariótipo. DNAs ribossômicos em eucariotos. *Double FISH*. Rearranjos genômicos.

WOLF, Poliana Alves Sidol. "Cytogenetic and molecular aspects in three species of hypostomini (siluriformes, loricariidae)". 2016. 73 p. Dissertation (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Loricariidae is considered one of the most diverse fish families in the Neotropics. The variations exhibited by their representatives, popularly known as "cascudos", extend the intraspecific level to population, making it difficult to establish phylogenies and estimates of the real diversity within this group. Recently, a new phylogenetic hypothesis was proposed, in which there was a rearrangement at the level of subfamilies and tribes. Hypostomini, addressed in this study, left the status of monogeneric and is now represented by *Hypostomus* and *Pterygoplichthys*. Thus, in order to expand the existing cytogenetic data for these two genera, chromosome analyzes were performed on specimens of *Hypostomus boulengeri*, *Hypostomus ancistroides* and *Pterygoplichthys ambrosettii*. All specimens of *H. ancistroides*, and *H. boulengeri* presented the $2n = 68$; multiple Ag-NORs confirmed by the physical mapping with 18S rDNA sites; and 18S rDNA and 5S rDNA located in different chromosome pairs. However, there were features that made possible the separation of these species, such as the karyotype formulas (KFs), the number of Ag-NORs and 18S rDNA sites; the chromosome bearing pair of the 5S rDNA site; and the most amount of heterochromatic regions *H. boulengeri*. The *P. ambrosettii* specimens presented the $2n=52$; simple Ag-NORs with size heteromorphism confirmed by physical mapping with 18S rDNA; rDNA 5S and 18S on the same chromosome pair; and heterochromatic regions located mainly in the terminal region of chromosomes. Differences in KFs may indicate the occurrence of chromosomal rearrangements like pericentric inversions, altering the chromosome type without modifying the diploid number; whereas polymorphisms in ribosomal DNA sites may reflect the occurrence of unequal crossing over, amplifications and / or transpositions. In fact, the isolation of the 5S rDNA of *H. boulengeri* enabled the identification of elements within the spacer region, which could explain the differences in position and size of these repeats in a genome. Among these are the following: repetitive sequences that may have been originated by duplication; regions that can form secondary structures and favour the occurrence of genomic rearrangements; and transposable elements. Furthermore, the characterization of this sequence makes possible the use of clones for physical mapping in future studies.

Keywords: Double FISH. Genetic rearrangements. Karyotype. Ribosomal DNA in eukaryotes.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

- Fig. 1:** Diagrama com a anotação dos elementos encontrados na sequência de DNAr 5S de *Hypostomus boulengeri*. Azul escuro: primers; Verde: gene de RNAr 5S; Azul claro: regiões que podem codificar ncRNAs; Roxo: repetições; Amarelo: TE; Vermelho: região TATA-Like..... 50
- Fig. 2:** a) Metáfase de *Hypostomus boulengeri* com o sinal de DNAr 5S (verde/biotina) em um par de cromossomos. b) Metáfase de *H. ancistroides* com sinal de DNAr 5S (verde/biotina) em um par de cromossomos 50

Artigo 2

- Figura 1:** Cariótipos das espécies analisadas. a) *Hypostomus boulengeri*. b) *Hypostomus ancistroides*. c) *Pterygoplichthys ambrosettii*. Nos boxes encontram-se os cromossomos portadores dos sítios de Ag-RONs 66
- Figura 2:** Fases meióticas em *Hypostomus boulengeri*. a) Leptóteno. b) Zigóteno. c) Paquíteno inicial. d) Paquíteno tardio. e) Diplóteno/Diacinese. f) Metáfase I 67
- Figura 3:** Metáfases dos exemplares analisados. a) Metáfase de *Hypostomus boulengeri* após bandamento-C. b) Metáfase de *Hypostomus ancistroides* após bandamento-C. c) Metáfase de *Pterygoplichthys ambrosettii* após bandamento-C. d) Metáfase de *H. boulengeri* após double FISH. e) Metáfase de *H. ancistroides* após double FISH. f) Metáfase de *P. ambrosettii* após double FISH. Setas pretas indicam as regiões heterocromáticas. Setas bancas indicam os

sítios de DNAr 18S (digoxigenina). Asteriscos indicam os sítios de DNAr 5S (biotina) 68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	ICTIOFAUNA NEOTROPICAL E FILOGENIA DE LORICARIIDAE	15
2.2	CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS EM HYPOSTOMUS: INFORMAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ANALISADAS	17
2.3	CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS EM PTERYGOPLICHTHYS: INFORMAÇÕES SOBRE PTERYGOPLICHTHYS AMBROSETTII	22
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	ESPÉCIES ANALISADAS	27
4.2	MÉTODOS	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ARTIGO 1:	Organização molecular e mapeamento físico do DNAr 5S de <i>Hypostomus boulengeri</i> (Eigenmann & Kennedy, 1903) (Loricariidae: Hypostominae): novas informações sobre a região espaçadora	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ARTIGO 2:	Citogenética comparativa e mapeamento físico dos DNAs ribossômicos 18S e 5S em três espécies de Hypostomini (Loricariidae, Hypostominae)	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	CONCLUSÕES GERAIS	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes são reconhecidos como o grupo mais diverso dentre os vertebrados vivos, totalizando aproximadamente 28.000 espécies, caracterizadas por uma variedade de adaptações anatômicas, fisiológicas e ecológicas, que acompanham sua complexa história evolutiva (LÉVÊQUE *et al.*, 2008; HELFMAN *et al.*, 2009; PEDRO *et al.*, 2011). Estima-se que em escala mundial possam existir mais de 15.000 espécies de peixes de água doce, destas, mais de 6.000 são descritas na região neotropical (REID, 2013).

A composição e riqueza da ictiofauna variam entre as diferentes bacias hidrográficas neotropicais. Isso porque, a distribuição de espécies é influenciada pela topologia regional, bem como, por diversos parâmetros ambientais (LUNDBERG *et al.*, 2000; OLDEN *et al.*, 2010). Ainda assim, grupos predominantes são verificados, como: Siluriformes (bagres e cascudos), Characiformes (lambaris, dourados, piavas), Perciformes (acarás e tilápias) e Gymnotiformes (túviras e poraquê) (KAVALCO; PAZZA, 2007).

Os representantes de Siluriformes estão distribuídos em 35 famílias válidas (NAKATANI *et al.*, 2011). Das quais, Loricariidae, que agrupa os peixes popularmente conhecidos como cascudos é considerada a mais especiosa (BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012; RIBEIRO; LIMA; PEREIRA, *et al.*, 2012). A diversidade existente nesta família dificulta a identificação de espécies e sua organização filogenética. Na hipótese mais recente, proposta por Lujan *et al.* (2015) Loricariidae é restrita a 6 subfamílias: Rhinelepineae, Lithogeninae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Loricariinae e Delturinae. Por sua vez, Hypostominae passa a compreender as tribos Corymbophanini, Ancistrini e

Hypostomini. Sendo esta última agora representada por *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*.

Hypostomus é endêmico das Américas do Sul e Central e corresponde, dentro de Loricariidae, ao gênero mais rico, enquanto que *Pterygoplichthys* tem a ocorrência originalmente delimitada a América do Sul, com uma menor quantidade de espécies descritas (FERRARIS JUNIOR, 2007). O predomínio de cascudos nas assembleias de peixes de rios brasileiros implica na necessidade da caracterização destas espécies, seja do ponto de vista taxonômico, ecológico, ou genético. Estas informações são fundamentais para o conhecimento da diversidade existente; estabelecimento de estratégias de conservação, e esclarecimento de relações evolutivas. Neste sentido, estudos citogenéticos podem fornecer importantes contribuições. Isso porque, possibilitam a aplicação de diferentes marcadores, convencionais ou moleculares.

Hypostomus é conhecido por apresentar ampla variabilidade em diferentes aspectos cromossômicos (TRALDI *et al.*, 2012). Já, *Pterygoplichthys* parece seguir um padrão mais conservativo, principalmente em relação ao número diploide ($2n$) $2n=52$ e aos sítios simples de regiões organizadoras de nucléolo (RONs); que foram encontrados em todas as populações analisadas até o momento (ARTONI *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2006; OLIVEIRA; SOUZA; VENERE, 2006 ; FERNANDES *et al.*, 2015). Considerando a atual classificação de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* em Hypostomini, o presente trabalho teve por finalidade verificar aspectos citogenéticos e moleculares em algumas espécies pertencentes a estes gêneros, de forma a contribuir para a compreensão da diversificação cromossômica existente em Loricariidae.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ICTIOFAUNA NEOTROPICAL E FILOGENIA DE LORICARIIDAE

Atualmente a região Neotropical é delimitada pela maior parte da América do Sul; a América Central, sul do México e as ilhas do Caribe (MORRONE, 2014). De acordo com Joly (2008) o contato secundário entre as Américas do Sul e Central, datado em 3 milhões de anos atrás com o surgimento de uma ponte continental, foi precedido por 100 milhões de anos de isolamento entre a fauna, a flora e os microrganismos destes territórios. Este longo período de separação somado aos fatores ambientais como clima e disponibilidade de nutrientes, e aos evolutivos, como mutações, deriva genética, dentre outros, são apontados como os prováveis responsáveis pela biodiversidade existente na região Neotropical (ANTONELLI, 2008).

As bacias hidrográficas neotropicais diferem na composição e riqueza de suas assembleias de peixes. Tal heterogeneidade pode ser explicada por características topológicas regionais, que interferem no curso d'água, resultando no surgimento de barreiras e distanciamento geográfico (LUNDBERG *et al.*, 2000). Em conjunto, a quantidade de recursos, a qualidade do habitat e os fatores ambientais (pH, oxigênio dissolvido, etc) (FELIPE; SÚAREZ, 2010), podem contribuir com a distribuição das espécies.

A ictiofauna neotropical de água doce é considerada a mais diversificada do mundo, com números atuais de pouco mais de 6.000 espécies e estimativas de que possam existir até 8.000 (REIS; KULLANDER; FERRARIS JUNIOR, 2003; REID, 2013). Isso porque, a carência de informações biológicas e taxonômicas prejudica a descrição de novas espécies, e estudos de distribuição, até mesmo para os grandes rios onde a atividade pesqueira é corriqueira (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE,

2007; ARAÚJO; TEJERINA-GARRO, 2007). Ainda assim, é possível verificar que a ictiofauna dulcícola neotropical apresenta grupos predominantes, como: Siluriformes (bagres e cascudos), Characiformes (lambaris, dourados, piavas), Perciformes (acarás e tilápias) e Gymnotiformes (tuviras e poraquê) (KAVALCO; PAZZA, 2007).

Os representantes da ordem Siluriformes compreendem mais de 2.500 espécies, distribuídas em 35 famílias válidas (NAKATANI *et al.*, 2011). Destas, Loricariidae, que agrupa os peixes popularmente conhecidos como cascudos é considerada uma das mais especiosas e, além disso, é endêmica da região Neotropical (BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012).

A diversidade existente em Loricariidae dificulta a identificação de espécies e o estabelecimento de filogenias, especialmente ao nível de gêneros dentro de subfamílias, porém, revisões baseadas em caracteres morfológicos (ARMBRUSTER, 2004) e filogenias moleculares (MONTROYA-BURGOS, 2003; LUJAN *et al.*, 2015) tem tentado esclarecer estas relações. Até então, Loricariidae era dividida em sete subfamílias: Lithogeninae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Loricariinae, Neoplecostominae, Delturinae (ARMBRUSTER, 2004; REIS; PEREIRA; ARMBRUSTER, 2006) e Otothyriinae (CHIACHIO; OLIVEIRA; MONTROYA-BURGOS, 2008). Por sua vez, a subfamília Hypostominae era dividida em cinco tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini; (ARMBRUSTER, 2004).

Recentemente, uma nova classificação baseada em genes nucleares e mitocondriais foi proposta por Lujan *et al.* (2015). Nesta hipótese Rhineleporini adquiriu o *status* de subfamília (Rhineleporinae), Neoplecostominae e Otothyriinae se tornaram tribos de Hypoptopomatinae; e Hypostominae foi restrita a duas tribos (Ancistrini e Hypostomini) e sete clados (*Acanthicus*, *Chaetostoma*, *Lithoxus*, *Hemiancistrus*,

Peckoltia, *Pseudancistrus* e '*Pseudancistrus*'). *Hypostomini* deixou de ser monogenérica e passou a ser representada por *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*.

Hypostomus Lacépède, 1803 é considerado o gênero mais rico de Loricariidae e compreende aproximadamente 135 espécies válidas (ZAWADZKI; TENCATT; FROEHLICH, 2014), endêmicas das Américas do Sul e Central e predominantes nas bacias hidrográficas brasileiras (FERRARIS JUNIOR, 2007; POUND *et al.*, 2011). São dulcícolas, com exceção de *Hypostomus watwata* Hancock, 1828, encontrado em regiões estuarinas e águas salobras das Guianas (WEBER; COVAIN; FISCH-MULLER, 2012). *Pterygoplichthys* Gill, 1858 possui um menor número de espécies reconhecidas, somando 15 no total, todas de hábito dulcícola e com ocorrência delimitada oficialmente a rios e lagos da América do Sul (ARMBRUSTER; PAGE, 2006; FERRARIS JUNIOR, 2007).

Apesar de existirem citações de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* como invasores, que provavelmente foram dispersos por influência humana (NICO *et al.*, 2012; RÍOZ-MUÑOS, 2015), os cascudos exercem um papel ecológico primordial. Isso porque, ao ingerirem e fragmentarem a matéria orgânica presente no lodo, a tornam disponível para outros níveis das cadeias alimentares, garantindo que a produção primária entre efetivamente nos ecossistemas (LUJAN; WINEMILLER; ARMBRUSTER, 2012).

2.2 CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS EM *HYPOSTOMUS*: INFORMAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ANALISADAS

De acordo com Oliveira, Foresti e Hilsdorf (2009) no que se refere à citogenética de peixes, a maioria dos dados disponíveis na literatura concentram-se na ictiofauna neotropical. Entretanto, apenas cerca de cem espécies de Loricariidae

foram estudadas, dentre estas, menos da metade dos 30 gêneros reconhecidos para Hypostominae (RUBERT *et al.*, 2011, ALVES *et al.*, 2012).

Em Hypostominae, existem registros citogenéticos para *Hypostomus*; *Pterygoplichthys*; *Ancistrus* Kner, 1854; *Hemiancistrus* Bleeker, 1862; *Baryancistrus* Rapp Py-Daniel, 1989; *Panaque* Eigenmann e Eigenmann, 1889; *Pogonopoma* Regan, 1904 e *Rhinelepis* Agassiz, 1829; por isso esta subfamília é considerada a melhor estudada do ponto de vista cromossômico (MARTINEZ *et al.*, 2011; RUBERT *et al.*, 2011).

Hypostomus é conhecido por apresentar ampla variabilidade a nível macro e micro estrutural em diferentes aspectos cariotípicos (ARTONI; BERTOLLO, 1999; TRALDI *et al.*, 2012; LORSCHIEDER *et al.*, 2015). A maioria dos trabalhos traz a informação de que em *Hypostomus* os números diploides variam entre 54 em *Hypostomus plecostomus* (ARTONI; BERTOLLO, 2001 apud MAURUTTO *et al.*, 2012), a 84 em *Hypostomus perdido* (CEREALI *et al.*, 2008). Porém, Traldi *et al.* (2013) sugerem que *H. plecostomus* possa ter sido erroneamente identificado, e que o $2n=62$ encontrado em *Hypostomus cochliodon* por Cereali *et al.* (2004) seria menor para o gênero.

Ao contrário da ampla faixa de variação observada nos números diploides, os sistemas sexuais são raramente citados para *Hypostomus*. Michele, Takahashi e Ferrari (1977 apud Alves *et al.*, 2006), reportaram o sistema de determinação sexual cromossômico XX/XY em *Hypostomus macrops*. Por sua vez, Artoni, Venere e Bertollo (1998 apud Endo *et al.*, 2012), propuseram o sistema ZZ/ZW para *Hypostomus* sp. No entanto, os dados citogenéticos disponíveis, incluindo estudos recentes (RUBERT *et al.*, 2011; BUENO *et al.*, 2013; BECKER *et al.*, 2014), mostram que a presença de cromossomos sexuais é rara.

Grande parte das informações cariotípicas disponíveis para *Hypostomus* restringem-se as técnicas convencionais, como a coloração e montagem de cariótipos, impregnação por nitrato de prata para detecção de sítios nucleolares onde há resquício de atividade transcricional devido à presença de proteínas acídicas; e o bandamento-C, que detecta regiões heterocromáticas.

Em *Hypostomus*, as regiões organizadoras de nucléolo (RONs), localizam-se comumente na posição terminal dos cromossomos e podem ser coincidentes a constrições secundárias (RUBERT; ZAWADZKI; GIULIANO-CAETANO, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2011). Também são registrados polimorfismos de tamanho e número. Esta variação é considerada comum em peixes neotropicais e já foi registrada em outros gêneros, como *Oligosarcus* e *Astyanax* (KANTEK *et al.*, 2007); *Pseudopimelodus* (GOUVEIA *et al.*, 2013), dentre outros.

Assim como os números diploides e sistemas sexuais variam dentro do gênero, o bandamento-C revela padrões distintos de bandas heterocromáticas em *Hypostomus*. As marcações localizam-se principalmente na região centromérica e terminal dos cromossomos, porém, existem registros de bandas intersticiais (ARTONI; BERTOLLO, 1999). Ademais, um par cromossômico que apresenta heterocromatina adjacente a RON parece ser uma condição comum na maioria das espécies analisadas até o momento (RUBERT *et al.*, 2011).

Ao utilizar a digestão com endonucleases de restrição (Alu I, Hae III, Bam HI, e Dde I) nos cromossomos de *Hypostomus* cf. *wuchereri*, Bitencourt *et al.* (2011) verificaram heterogeneidade entre as populações analisadas, indicando que a heterocromatina é composta por diferentes classes de sequências repetitivas de DNA. Estes resultados confirmam o que é observado após a coloração com fluorocromos em *Hypostomus*, no qual há espécies que apresentam regiões AT e

GC ricas intercalares (BITENCOURT *et al.*, 2012), bem como, blocos ricos apenas em pares de bases GC (CEREALI *et al.*, 2008).

No decorrer dos últimos anos a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ganhou destaque nos estudos de citogenética animal. Isso porque, a localização física de sequências permitiu o estabelecimento de marcadores moleculares, que complementam técnicas convencionais e auxiliam em questões taxonômicas e evolutivas. Em *Hypostomus* a FISH vem sendo utilizada no mapeamento de sítios específicos, feito DNAs ribossômicos (DNAr) 18S e 5S (MENDES-NETO *et al.*, 2011; RUBERT *et al.*, 2011; BITENCOURT *et al.*, 2012; TRALDI *et al.*, 2013a); sequências teloméricas repetitivas (TRALDI *et al.*, 2013b), e elementos transponíveis (TEs) (PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013).

Os DNAr 5S e 18S são considerados importantes marcadores cromossômicos em peixes, e dentro de *Hypostomus* se revelam como mais uma característica de notável variabilidade, sendo encontrados sítios múltiplos ou simples; com ambos localizados em uma mesma região de cromossomos mitóticos metafásicos, ou em localizações distintas (KAVALCO *et al.*, 2005; MENDES-NETO *et al.*, 2011; TRALDI *et al.*, 2013a). Sugere-se que a localização visualmente “sobreposta” dos sítios de DNAr 18S e 5S em cromossomos metafásicos, seja vestígio de uma característica primitiva em Loricariidae. Pois a maioria das espécies analisadas apresentam sítios ribossômicos em cromossomos distintos (TRALDI *et al.*, 2013a). Desta forma, postula-se que a dispersão dos DNAr em peixes possa estar associada à ação de TEs, que já foram encontrados por meio de mapeamentos físicos na mesma região cromossômica de sítios de DNAr (PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2013).

De acordo com diferentes hipóteses filogenéticas, as duas espécies de *Hypostomus* analisadas no presente estudo, sendo elas *Hypostomus boulengeri* e *Hypostomus ancistroides*, são consideradas proximamente relacionadas (MONTROYA-BURGOS, 2003; MARTINEZ, 2009; CARVALHO *et al.*, 2015). Desta maneira, uma vez que os dados citogenéticos são incipientes para peixes do Pantanal, região onde foram coletados os espécimes de *H. boulengeri*, diferentes marcadores cromossômicos foram empregados em uma análise citogenética comparativa entre estes, e os exemplares de *H. ancistroides* capturados em um afluente do rio Cambé, no município de Londrina.

Estudos cariotípicos com *H. ancistroides* iniciaram-se na década de 70. Desde então nas diferentes populações estudadas, observou-se que apesar das FCs divergentes, o $2n=68$ é constante (Tabela 1). A manutenção do $2n=68$ somada às distintas FCs pode indicar a ocorrência de rearranjos do tipo inversão, que estão dentre os mais comumente apontados em *Hypostomus* por serem capazes de alterar o tipo de cromossomos sem influenciar no $2n$ (RUBERT; ZAWADZKI; GIULIANO-CAETANO, 2008). Entretanto, diferenças nos níveis de condensação, que interferem diretamente na classificação cromossômica, não devem ser desconsideradas.

Hypostomus ancistroides apresenta um padrão de RONS múltiplas, confirmadas pela FISH com DNAr 18S e localizadas preferencialmente, na região subterminal do braço curto dos cromossomos (ALVES *et al.*, 2006; RUBERT *et al.*, 2011; ENDO *et al.*, 2012; PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2014). A FISH com o DNAr 5S mostra sítios simples nas populações de *H. ancistroides* analisadas por Pansonato-Alves *et al.* (2013) e Bueno *et al.* (2014). Porém, sítios

múltiplos de DNAr 5S, que podem ou não estar coincidentes ao sítio de DNAr 18S, foram verificados por Traldi *et al.* (2013a).

No que diz respeito aos mecanismos envolvidos nos polimorfismos de tamanho e número observados no DNAr 5S, Pansonato-Alves *et al.* (2013) sugerem que possam ter sido originados por eventos de dispersão independentes entre as diferentes linhagens de *Hypostomus*, tais como transposições ou duplicações.

Até o momento, o bandamento-C tem mostrado que *H. ancistroides* parece seguir um padrão. Pequenas bandas são observadas na região centromérica e/ou terminal de alguns cromossomos; enquanto que, adicionalmente, um par pode apresentar uma marcação mais conspícua na região terminal do braço curto ou longo, que pode ser coincidente a RON (RUBERT *et al.*, 2011; PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013; TRALDI *et al.*, 2013a).

2.3 CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS EM *PTERYGOPLICHTHYS*: INFORMAÇÕES SOBRE *PTERYGOPLICHTHYS AMBROSETTII*

Pterygoplichthys, ao contrário de *Hypostomus*, possui aparente conservação em relação ao 2n. Até o momento, todas as espécies cariotipadas apresentaram o 2n=52 (ARTONI *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2006; OLIVEIRA; SOUZA; VENERE, 2006; FERNANDES *et al.*, 2015). Porém, mostram diferenças em suas fórmulas cariotípicas (FCs). De acordo com Fernandes *et al.* (2015), a presença de cromossomos acrocêntricos em *Pterygoplichthys ambrosettii* (ARTONI *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2006) e a ausência destes em *Pterygoplichthys joselimaianus* (OLIVEIRA; SOUZA; VENERE, 2006), *Pterygoplichthys multiradiatus* e *Pterygoplichthys gibbiceps* (ALVES *et al.*, 2006), sugere a ocorrência de inversões

pericêntricas, que alteraram a morfologia dos cromossomos sem modificar o $2n$ dentro do gênero.

No que se refere às Ag-RONs, em *Pterygoplichthys* observam-se sítios simples; localizados na região subterminal do braço curto ou longo de tipos distintos de cromossomos (FERNANDES *et al.*, 2015). Análises realizadas por Camilo (2004) e Alves *et al.* (2012), confirmaram esta condição por meio da FISH com o DNAr 18S.

De acordo com Dimitri *et al.* (2009) a organização dos cromossomos em regiões eucromáticas e heterocromáticas constitui um dos aspectos mais importantes e enigmáticos da evolução genômica. Ainda assim, estudos com bandamento-C em *Pterygoplichthys* são escassos. Os resultados disponíveis referem-se a *P. ambrosettii*, na qual foram observadas bandas centroméricas e terminais; e uma banda adjacente à constrição secundária subterminal correspondente a RON (ARTONI *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 2015).

Pterygoplichthys ambrosettii, analisada no presente estudo, é também referida na literatura por seus sinônimos *Liposarcus anisitsi* e *Pterygoplichthys anisitsi*, e apresenta a conservação do $2n=52$, e assim como em *Hypostomus*, as variações nas FCs podem ser atribuídas à ocorrência de rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica (Tabela 1).

O padrão de Ag-RONs simples, localizadas na região subterminal do braço longo de um par classificado como submetacêntrico (sm), se repete nas diferentes populações analisadas e foi confirmado pela FISH com sonda de DNAr 18S (CAMILO, 2004; BUENO, 2012). Além disso, em posição intersticial do braço curto dos mesmos cromossomos portadores da RON, verificou-se a existência de sítios simples de DNAr 5S (BUENO, 2012). Em adição, são reportadas bandas heterocromáticas moderadas nas regiões centromérica, intersticial e terminal dos

cromossomos; e também, um bloco mais conspícuo adjacente à constrição secundária subterminal correspondente a Ag-RON (ARTONI *et al.*, 1999; CAMILO, 2004; FERNANDES *et al.*, 2015).

Assim sendo, diante da problemática ecológica e filogenética que envolve *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, e da aplicação de estudos citogenéticos na avaliação da biodiversidade existente entre os peixes, incluindo os pertencentes à Família Loricariidae, o presente estudo procura fornecer dados cromossômicos provenientes de marcadores convencionais, e moleculares, que podem auxiliar em análises comparativas entre estes dois gêneros.

Tabela 1: Números diploides e fórmulas cariotípicas disponíveis para as espécies analisadas no presente estudo.

ESPÉCIES	LOCAL DE COLETA	2n	FC	RF
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Não consta	68	10m+28sm+30st/a	1
<i>H. ancistroides</i>	Rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo (SP), Brasil	68	16m+18sm+34st/a	2
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá (SP)	68	18m+10sm+12st+28a	3
<i>H. ancistroides</i>	Rios Taquari, Água do Pato, Água das Pedras e Ribeirão Três Bocas, Estado do Paraná (PR), Brasil	68	10m+26sm+32st/a	4
<i>H. ancistroides</i>	Rio Piquiri, município de Nova Laranjeiras, (PR), Brasil	68	14m+14sm+40 st/a	5
<i>H. ancistroides</i>	Rio Piquiri, município de Nova Laranjeiras, (PR), Brasil	68	14m+14sm+8st+32a	6
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Dourados, município de Mandaguari, (PR), Brasil	68	14m+12sm+18st+24a	7
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Maringá, município de Maringá, (PR), Brasil	68	16m+12sm+18st+22a	7
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Ximbaúva, município de Ourizona, (PR), Brasil	68	8m+10sm+18st+32a	7
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Hortelã (bacia do Paranapanema), município de Botucatu, (SP), Brasil	68	10m+20sm+10st+28a	8
<i>H. ancistroides</i>	Rio Piquiri, (PR), Brasil	68	14m+14sm+8st+32a	9
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Lapa, município de Ipeúna (SP), Brasil	68	14m+16sm+22st+16a	10
<i>Liposarcus anisitsi</i>	Rio Miranda, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil	52	8m+14sm+30st/a	3
<i>L. anisitsi</i>	Rio Tietê, município de Botucatu (SP), Brasil	52	28m+12sm+12st/a	3
<i>L. anisitsi</i>	Rio Preto, município de Mirassolândia (SP), Brasil	52	16m+24sm+12st/a	11
<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	Córrego Água Boa (MS), Brasil	52	14m+26sm+8st+4a	12
<i>L. anisitsi</i>	Rio Piracicaba, município de Piracicaba (SP), Brasil	52	16m+28sm+6st+2a	13

Legenda: Número diploide (2n); Fórmula cariotípica (FC); Referência (RF).

Fonte: (1) Michele, Takahashi e Ferrari (1977 apud ALVES *et al.*, 2006); (2) Artoni e Bertollo (1996); (3) Alves *et al.* (2006); (4) Rubert *et al.* (2011); (5) Bueno, Zawadzki e Margarido (2012); (6) Bueno *et al.* (2014); (7) Endo *et al.* (2012); (8) Pansonato-Alves *et al.* (2013); (9) Bueno *et al.* (2013); (10) Traldi *et al.* (2013a); (11) Artoni *et al.* (1999); (12) Fernandes *et al.* (2015); (13) Camilo (2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral verificar aspectos citogenéticos e moleculares em três espécies pertencentes à tribo Hypostomini. Sendo elas: *Hypostomus boulengeri*, *Hypostomus ancistroides* e *Pterygoplichthys ambrosettii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o número diploide e fórmula cariotípica nas três espécies;
- Localizar regiões heterocromáticas nos cromossomos das três espécies;
- Verificar quais são os cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) nas três espécies;
- Isolar e caracterizar o DNAr 5S de *H. boulengeri*;
- Mapear os sítios de DNAr 18S e 5S nas três espécies;
- Comparar os resultados citogenéticos obtidos com os disponíveis na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIES ANALISADAS

O presente trabalho consiste de um subprojeto dentro da proposta “Análise Citogenética de algumas espécies da ordem Siluriformes: ênfase em Loricariidae e Doradidae”, aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina, e registrada sob o processo de número 507.2014.96. As coletas foram realizadas sob a licença de liberação número 11399-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) utilizando tarrafas e peneiras para captura.

Sete espécimes de *Hypostomus boulengeri* (3♂ e 4♀) e onze de *Pterygoplichthys ambrosettii* (3♀, 1♂ e 7 imaturos), foram coletados no rio Miranda, e em lagoas próximas que se formam durante o período de cheias; no município de Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul (19°34'36.88"S 57° 1'5.87"W; 19°36'42.25"S 57°02'5.13W e 19°32'27.52"S 57°02'22.57"W). Cinco espécimes de *Hypostomus ancistroides* (3♀, 1♂ e 1 imaturo) foram coletados em um afluente do rio Cambé, município de Londrina, Estado do Paraná (23°22'00.73"S 51°06'30.50"W).

Todos os exemplares analisados encontram-se tombados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), e no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA/NUP), da Universidade Estadual de Maringá. *Vouchers*: *H. boulengeri* - MZUEL 14257, MZUEL 14258, MZUEL 14260, MZUEL 14261 e NUP 17751; *H. ancistroides* - NUP 17770; *P. ambrosettii* - MZUEL 14259 e MZUEL 14262.

4.2 MÉTODOS

Indução ao aumento do número de mitoses pela técnica de suspensão de levedura (LEE; ELDER, 1980)

Foi injetada nos peixes uma solução de suspensão de levedura (fermento biológico seco) dissolvida em água, na proporção de 1ml/100g de peso animal. Os exemplares foram mantidos vivos em aquário aerado durante 48 horas, após as quais, se processou o material para a preparação dos cromossomos mitóticos.

Técnica de suspensão celular para obtenção de cromossomos mitóticos (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978)

Foi injetada intra-abdominalmente nos peixes uma solução aquosa de colchicina 0,0125%, na proporção de 1ml/100g de peso animal. Após 30 minutos em aquário aerado, os exemplares foram anestesiados com óleo de cravo por aproximadamente 15 minutos. Após isso foram sacrificados para a retirada do rim anterior.

O rim foi colocado em placas de petri contendo cerca de 6-10ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) e fragmentado com pinças de dissecação. Esta solução foi então homogeneizada com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha para que ocorresse a separação das células. Posteriormente, a suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 37°C, durante 30 minutos. Decorrido este tempo, o material foi pré-fixado com 10 gotas de fixador (metanol: ácido acético – 3:1) e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado com pipeta Pasteur. Então, foram adicionados de 5-7ml de fixador, o material foi novamente homogeneizado com a pipeta Pasteur e em seguida novamente centrifugado. Este procedimento de retirada do sobrenadante e centrifugação foi repetido de 2-3 vezes. Após a última centrifugação e retirada do sobrenadante, foi adicionado 1ml de

fixador. O material foi armazenado em microtubos de 1,5 ml e acondicionado em freezer.

De 2-3 gotas da suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina, que foi corada com Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5-8 minutos; e em seguida lavada com água destilada. A secagem ocorreu ao ar e na sequência, as lâminas foram analisadas ao microscópio.

Preparação de cromossomos meióticos (KLIGERMAN; BLOOM, 1977 adaptada por BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978)

Em função dos dados citogenéticos incipientes para *H. Boulengeri*, para confirmação do 2n, foram obtidos cromossomos meióticos a partir dos testículos dos mesmos exemplares machos (♂) utilizados na obtenção dos cromossomos mitóticos. Após a retirada dos testículos estes foram seccionados em pequenos fragmentos e colocados em solução hipotônica de KCl a 0,075M por 20 minutos. Após isso o material foi transferido para o fixador (metanol: ácido acético, 3:1) recém preparado. Alguns fragmentos foram então transferidos para uma placa escavada com ácido acético 50% e foram seccionados com auxílio de pinças para obtenção de uma suspensão celular. Com uma pipeta Pasteur uma gota de suspensão foi colocada sob uma lâmina aquecida a 30-35°C e espalhada. Após secar a lâmina foi corada com Giemsa 5%.

Classificação cromossômica

Os cromossomos foram analisados em microscópio Leica DM 2000 e as imagens capturadas por meio do *software* Motic Images Plus 2.0.

A classificação dos cromossomos teve por base a relação entre os braços (RB) maior/menor proposta por Levan *et al.* (1964), que considera:

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

Bandamento-C (SUMNER, 1972)

As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico (HCl 0,2N) a 42°C durante 15 minutos. Logo após foram lavadas em água destilada e na sequência, incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 37°C por 45 segundos. Terminado este tratamento, as lâminas foram lavadas rapidamente em HCl 0,2N e água destilada. Depois de secarem ao ar, foram incubadas em solução salina 2XSSC (cloreto de sódio 0,29M e citrato de sódio) a 60°C por 25-30 minutos. Para finalizar, foram lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 2%.

Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) (HOWELL; BLACK, 1980)

A lâmina foi colocada sob um suporte e sobre ela foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de gelatina (1g/100ml de água destilada e 0,5ml de ácido fórmico), juntamente com quatro gotas de solução aquosa de nitrato de prata –

AgNO₃(50%). A lâmina foi coberta com uma lamínula e incubada a 60°C por aproximadamente 5-7 minutos, ou até que atingisse uma coloração âmbar. Após a retirada da lamínula com água destilada e secagem da lâmina ao ar foi feita a análise ao microscópio óptico.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNAr 5S de *H. Boulengeri* e clonagem

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR conforme descrito por Martins e Galetti Junior (2001), utilizando os primers 5SA 5' – TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC- 3' e 5SB 5' – CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC – 3'. As reações foram montadas com 20ng de DNA genômico extraído do tecido muscular de *H. Boulengeri*; 10 pmol de cada primer, 2.5 mM de cada dNTP, 50 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerase para um volume final de 25 µL. Os ciclos foram: 2 minutos a 94°C (denaturação), seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C, 1 minuto a 72 °C e finalmente, 5 minutos a 72°C. As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1%.

Uma das amostras foi utilizada para clonagem no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega), conforme instruções do fabricante, e transformação nas células competentes TOP10 de *Escherichia coli*. Os 11 clones positivos obtidos passaram pelo processo de isolamento de DNA plasmidial a partir de bactérias lisadas, por meio do kit innuPREP Plasmid Mini Kit Plus (Analytik Jena). As amostras foram sequenciadas em um sequenciador automático 3500 x L (Applied Biosystem) de acordo com as instruções do fabricante. A montagem das sequências de cada clone e detecção de contaminantes foi realizada por meio dos softwares *Phred*, *Phrap*, *Consed* (Ewing *et al.*, 1998; Gordon, Abajian & Green; 1998; Gordon, Desmaraias &

Green, 2001; Gordon, 2004). As sequências foram submetidas a buscas no Blastn (Altschul *et al.*, 1990) no *Web site* do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). A sequência consenso do DNAr 5S de *H. bouleengeri* foi determinada manualmente utilizando o *software* Ugene (Okonechnikov *et al.*, 2012) e depositada na base de dados do NCBI sob o número de acesso KT943722. A busca por elementos repetitivos foi feita contra o banco de dados Repbase (Kohani *et al.*, 2006) pela interface *web* dos *softwares* RepeatMasker (Tarailo-Graovac & Chen, 2009) e Censor (Kohani *et al.*, 2006). O *software* Inference of RNA alignments (Infernal) (Nawrocki & Eddy, 2013) foi utilizado contra o banco de dados Rfam v 11.0 (Burge *et al.*, 2013) para busca de perfis de estruturas secundárias de RNAs não codificantes (ncRNAs). A anotação da sequência com os elementos encontrados pelas ferramentas acima citadas foi realizada com o *software* Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). A visualização circular foi criada com o *software* Circos (Krzywinski *et al.*, 2009).

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986)

A FISH foi realizada com a sonda de DNAr 5S isolada de *H. bouleengeri* (SIDOL-WOLF *et al.*, em preparação); e de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JUNIOR, 2004).

As lâminas foram incubadas em RNase (0.4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação, realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada.

O mix de hibridação para *double* FISH consistiu em 12 µL de sonda (7,5 µL de 18S e 2 µL de 5S), 30 µL de formamida (concentração final de 50%), 12 µL de

sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6 μL de 20xSSC, por lâmina. A hibridização foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridização as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 45°C por 5 minutos cada; uma vez em 1xPBS por 10 minutos a 45°C; e posteriormente incubadas em 1xPBD (200 μL 20xSSC, 6 ml Triton 100, 10g leite desnatado em pó, 800ml de água destilada). Para detecção do sinal foi utilizada uma solução contendo 0,5 μL de anti-Digoxigenina + 5 μL de FITC (1:100) + 44 μL de BSA 5% , por lâmina, durante 60 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 5 minutos cada, os cromossomos foram corados com DAPI (50 $\mu\text{g/ml}$). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência com câmera Leica DFC 300FX. Para captura das imagens foi utilizado o *software* Leica Application Suite V 3.1.0.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, 2007.
- ALVES, A. L. et al. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genética**, 128:1-9.
- ALVES, A. L. et al. 2012. Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with discussion on the Ag-NOR evolution. **CompCytog.**, 6(3):315-321.
- ALTSCHUL, S. F. et al. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403–410.
- ANTONELLI, A. 2008. **Spatiotemporal Evolution of Neotropical Organisms: New Insights into an Old Riddle**. Doctoral Thesis. Department of Plant and Environmental Sciences, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden.
- ARAÚJO, N. B.; TEJERINA-GARRO, F. L. 2007. Composição e diversidade da Ictiofauna em riachos do Cerrado, bacia do Ribeirão Ouvidor, alto Rio Paraná, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24 (4):981-990.
- ARMBRUSTER, J. W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 141:1-80.
- ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. 2006. Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, 4(4):401-409.
- 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, 81-90.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. 1999. Nature and distribution of heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, 106: 209-214.
- ARTONI, R. F. et al. 1999. Heterochromatin analysis in *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 21, 1, 39-44.
- BECKER, Q. M. C. et al. 2014. Cytogenetic Characterization of Two Species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) From Tributaries of The Vermelho River, Upper Paraguay River Basin. **Biodiversidade**, v. 13, n1.

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

BURGE, S. W. et al. 2013. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. **Nucleic Acids Research**, v. 41.

BITENCOURT, J. A. et al. 2011. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. **Neotropical Ichthyology**, 9(2):317-324.

BITENCOURT, J. A. et al. 2012. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genet. Mol. Res.**, 11 (2): 933-943.

BUENO, V. **Caracterização Citogenética Básica e Molecular em *Hypostomus* spp. Lacépède, 1803 do Rio Piquiri (PR)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo dos Recursos Naturais), Universidade do Centro Oeste do Paraná.

BUENO, V.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. 2012. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Fish Biol. Fisheries**, 22:241-250.

BUENO, V. et al. 2013. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. **Fish Biol. Fisheries**, 23: 103-112.

BUENO, V. et al. 2014. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary tendencies in the genus. **The Scientific World Journal**, 2014.

CAMILO, F. M. **Estudo citogenéticos em algumas espécies de peixes da Família Loricariidae pertencentes à Bacia do Rio Piracicaba**. 2004. Dissertação (Mestrado em Genética em Evolução), Universidade Federal de São Carlos.

CARVALHO, P. H. et al. 2015. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. **Mitochondrial DNA**, ISSN 1940-1744.

CEREALI, S. S. et al. 2008. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Gen. Mol. Res.**, 7(3):583-591.

CHIACHIO, M. C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:606-617.

- DIMITRI, P. et al. 2009. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. **Chromosoma**, 118:419-435.
- ENDO, K. S. et al. 2012. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2.
- EWING, B. et al. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, 8:175-185.
- FELIPE, T. R. A.; SÚAREZ, Y. R. 2010. Caracterização e influência dos fatores ambientais nas assembleias de peixes de riachos em duas microbacias urbanas, Alto Rio Paraná. **Biota Neotrop.**, v. 10, n. 2.
- FERNANDES, C. A. et al. 2015. Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Parana River drainage) in Brazil. **CompCytogen**, 9(1):67-78.
- FERRARIS JUNIOR, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. 2007. **Zootaxa**, 1418:1-628.
- GORDON D.; ABAJIAN C.; GREEN P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, 8:195-202.
- GORDON D.; DESMARAIS C.; GREEN P. 2001. Automated finishing with Autofinish. **Genome Research**, 11:614-625.
- GORDON, D. 2004. "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in **Current Protocols in Bioinformatics**, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley & Co., 11.2.1-11.2.43.
- GOUVEIA, J. G. et al. 2013. Comparative cytogenetics between two species of the family Pseudopimelodidae (Siluriformes): occurrence of natural triploidy and supernumerary chromosomes. **Cytotechnology**, DOI 10.1007/s10616-013-9676-x.
- HATANAKA, T.; GALETTI JUNIOR, P. M. 2004. Mapping of the 18S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122: 239-244.
- HELFMAN, G. S. et al. **The Diversity of Fishes**. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009.
- 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.
- JOLY, C. A. 2008. Biodiversity and climate change in the Neotropical region. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1.

- KANTEK, D. L. Z. et al. 2007. Cytotaxonomic and Evolutionary Considerations about Karyotypic Data of Fishes from de Iguaçú River Basin in South of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, p. 793-802.
- KAVALCO, K. F. et al. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, 94, 180-186.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R. 2007. Aspectos Biogeográficos de componentes da Ictiofauna da América Central. **Conscientia e Saúde**, 6:147-153.
- KOHANI, O. et al. 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in RepBase: RepBaseSubmitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, 7:474.
- LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. 1980. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 26, p. 36-40.
- LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A. 1964. A Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220.
- LÉVÊQUE, C. et al. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595:545-567.
- LORSCHIEDER, C. A. et al. 2015. Karyotypic diversity of the armoured catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) in the context of its occurrence and distribution. **Journal of Fish Biology**, 87(4):1099-110.
- LUJAN, N. K.; WINEMILLER, K. O.; ARMBRUSTER, J. W. 2012. Trophic diversity in the evolution and community assembly of loricariid catfishes. **BMC Evolutionary Biology**, 12:124.
- LUJAN, N. K. et al. 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 82 269–288.
- LUNDBERG, J. G. et al. 2000. So Many Fishes, So Little Time: An Overview of Recent Ichthyological Discovery in Continental Waters. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 87:26-62.
- MARTINEZ, E. R. M. **Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e sequências de DNA**. 2009. Tese de Doutorado, UNESP-Botucatu.
- MARTINEZ, E. R. M. et al. 2011. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and Molecular Biology**, 34(4): 562-568.
- MARTINS, C.; GALETTI JUNIOR, P. M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, 44:903-910.

- MAURUTTO, F. A. M. et al. 2012. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**, v. 66, n. 4, 340-346.
- MENDES-NETO, E. O. et al. 2011. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **CompCytogen.**, 5(2): 133-142.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, 12: 1855-1867.
- MORRONE, J. J. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, 3782 (1):001-110.
- NAKATANI, M. et al. 2011. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. **BMC Evolutionary Biology**, 11:177.
- NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. 2013. Infernal 1.1:100-fold faster RNA homology searches. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, 2933-2935.
- NICO, L. G. et al. 2012. Discovery of South American suckermouth armored catfishes (Loricariidae, *Pterygoplichthys* spp.) in the Santa Fe River drainage, Suwannee River basin, USA. **Bioinvasions Records**, v.1, 3:179-200.
- OKONECHNIKOV, K., et al. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics Applications Note**, v. 28, n. 8.
- OLDEN, J. D. et al. 2010. Conservation biogeography of freshwater fishes: recent progress and future challenges. **Diversity and Distributions**, 16: 496–513.
- OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. 2006. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda. *Neotropical Ichthyology*, 4(1):93-97.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiol. Biochem.**, 35:81-100.
- PANSONATO-ALVES, J. C. et al. 2013. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Fish Biol. Fisheries**, 23:477-489.
- PEDRO, J. et al. 2011. Cytogenetics of Chilean fishes: a commented database. **Byocyt**, 4(16): 316-326.

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

POUND, K. L. et al. 2011. Trophic ecology of a nonnative population of suckermouth catfish (*Hypostomus plecostomus*) in a central Texas spring-fed stream. **Environ. Biol. Fish.** 90:277-285.

RIBEIRO, A. C.; LIMA, F. C. T.; PEREIRA, F. C. et al. 2012. A New Genus and Species of a Minute Suckermouth Armored Catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Tocantins Drainage, Central Brazil: The Smallest Known Loricariid Catfish. **Copeia**, n. 4, 637–647.

RÍOZ-MUÑOZ, C. A. 2015. Depredación de pez diablo (Loricariidae: *Pterygoplichthys*) por el cormorán oliváceo (*Phalacrocorax brasilianus*) en Villahermosa, Tabasco, México. **Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología**, 16, (2): 62-65.

REID, G. M. 2013. Introduction to Freshwater Fishes and Their Conservation. **Int. Zoo. Yb.**, 47:1-5.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. 2006. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes) with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 147, 277-299.

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

RUBERT, M. **Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (LORICARIIDAE: HYPOSTOMINAE)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina.

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

RUBERT, M. et al. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **CompCytogen.**, 5(5):397-410.

RUTHERFORD, K. et al. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics Applications Note**, v. 16, n. 10.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHNEIDER, C. H. et al. 2013. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex1, Rex3 and Rex6 in neotropical cichlid genomes. **BMC Evolutionary Biology**, 13:152.

- KRZYWINSKI, M. et al. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, 19: 1639–45. doi:10.1101/gr.092759.109.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75: 304-306.
- TARAILO-GRAOVAC, M.; CHEN, N. 2009. Using Repeat Masker to Identify Repetitive Elements in Genomic Sequences. **Current Protocols in Bioinformatics**, 4.10.1- 4.10.14.
- TRALDI, V. B. et al. 2012. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. **CompCytogen** 6(2): 115–125.
- TRALDI, J. B. et al. 2013a. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**, 12(1): 463-471.
- TRALDI, J. B. et al. 2013b. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Genetics**, v. 92, n. 1.
- WEBER, C.; COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S. 2012. Identity of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus, 1758), with an overview of *Hypostomus* species from the Guianas (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Cybium**, 36(1):195 – 227.
- ZAWADZKI, C. H.; TENCATT, L. F. C.; FROEHLICH, O. 2014. A new unicuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin. **Neotropical Ichthyology**, 12(1): 97-104.

ARTIGO 1:**Organização molecular e mapeamento físico do DNAr 5S de *Hypostomus boulengeri* (Eigenmann & Kennedy, 1903) (Loricariidae: Hypostominae): novas informações sobre a região espaçadora**

Poliana Alves Sidol-Wolf¹, Natália Bortholazzi Venturelli², Ivan Rodrigo Wolf¹, Juceli Gonzalez Gouveia¹, Cesar Martins², Laurival Antônio Vilas-Bôas¹, Fernando Camargo Jerep³, Lucia Giuliano-Caetano¹.

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. ² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Morfologia, Distrito de Rubião Junior, s/n, Caixa Postal 51018618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. ³ Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil.

Resumo

O DNA ribossômico 5S (DNAr 5S) consiste de sequências codificantes altamente conservadas, arranjadas em múltiplas cópias de unidades repetidas em *tandem*, que são separadas umas das outras por espaçadores não transcritos (NTS) variáveis. As variações exibidas pelo NTS em tamanho e composição de sequência têm sido apontadas como as prováveis responsáveis pela organização genômica e dinamismo acentuado das sequências de DNAr 5S em peixes. Em *Hypostomus* os dados referentes ao mapeamento físico do DNAr 5S são recentes, e não existem

sequências deste DNA ribossômico isoladas dentro deste gênero. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar o DNAr 5S de *Hypostomus boulengeri*, buscando fornecer um primeiro relato sobre a organização desta sequência para *Hypostomus*, e uma sonda que possa ser utilizada no processo de hibridização *in situ*. Os resultados obtidos neste trabalho mostram elementos no NTS, tais como transposons; sequências repetitivas; e regiões com alta probabilidade de formar estruturas secundárias e favorecer a ocorrência de rearranjos; que podem explicar as modificações em posição e tamanho destas repetições em um genoma. Além disso, a caracterização desta sequência possibilita a utilização dos clones para mapeamento físico em estudos futuros.

Palavras-chave: DNAs ribossômicos, família multigênica, Hypostomini, peixes, sonda.

Introdução

De acordo com Nazar (2004), os RNAs ribossômicos (RNAr) são moléculas que passam por um processo complexo de biogênese e incorporação para formação dos ribossomos. Nos eucariotos superiores, os RNAr são transcritos a partir de duas famílias multigênicas distintas, divididas em DNAr 45S, que codifica para os genes de RNAr 18S, 5,8S e 28S; e DNAr 5S, que codifica para os genes de RNAr 5S (Long & David, 1980; Wasko *et al.*, 2001).

O DNAr 5S consiste de uma sequência codificante altamente conservada de 120 pares de bases (pb), arranjada em múltiplas cópias de unidades repetidas em *tandem*, separadas umas das outras por espaçadores não transcritos (NTS) variáveis (Martins & Wasko, 2004; Campo *et al.*, 2009). As variações exibidas pelo NTS em tamanho e composição de sequência, mesmo entre espécies proximamente

relacionadas, têm sido apontadas como as prováveis responsáveis pela organização genômica e dinamismo acentuado das sequências de DNAr 5S em peixes (Santos *et al.*, 2006; Pinhal *et al.*, 2009). Em adição, existem registros de que podem influenciar no processo de hibridização *in situ* (Martins & Galetti Jr., 2001; Gouveia *et al.*, em preparação), isso porque, geram diferenças que resultam na ausência de complementariedade entre o DNA “alvo” e a sonda.

Se considerada a grande diversidade existente em *Hypostomus* (Zawadzki, Tencatt & Froehlich, 2014), os dados de mapeamento físico do DNAr 5S estão disponíveis para menos de 4% das espécies. Sendo elas: *Hypostomus affinis* (Kavalco *et al.*, 2004); *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus tapijara*, *Hypostomus nigromaculatus* (Traldi *et al.*, 2013); e *Hypostomus commersoni* (Bueno *et al.*, 2014). Além disso, não existem trabalhos que envolvam o isolamento e a caracterização do DNAr 5S neste gênero, o que dificulta a compreensão de características moleculares que poderiam explicar as variações observadas no tamanho e no número de sítios.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar o DNAr 5S de *Hypostomus boulengeri*, buscando fornecer um primeiro relato sobre a organização desta sequência dentro de *Hypostomus*, e uma sonda que possa ser utilizada para mapeamento físico em estudos futuros.

Material e Métodos

Os sete espécimes de *Hypostomus boulengeri* (3♂ e 4♀) foram coletados no rio Miranda, município de Corumbá, Mato Grosso do Sul (19°34'36.88"S 57°1'5.87"W; 19°36'42.25"S 57°02'5.13W e 19°32'27.52"S 57°02'22.57"W), e encontram-se depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), e no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e

Aquicultura (NUPÉLIA/NUP), da Universidade Estadual de Maringá. *Vouchers*: *H. boulengeri* - MZUEL 14257, MZUEL 14258, MZUEL 14260, MZUEL 14261 e NUP 17751. Como parte integrante da proposta “Análise Citogenética de algumas espécies da ordem Siluriformes: ênfase em Loricariidae e Doradidae”, o presente estudo conta ainda com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual de Londrina, sob o número de processo 507.2014.96.

O DNA total foi extraído a partir de tecido muscular utilizando o método fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001). A PCR do DNAr 5S foi realizada nos sete espécimes como descrito por Martins & Galetti Jr. (2001) utilizando os primers 5SA 5' – TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC- 3' e 5SB 5' – CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC – 3'. Uma das amostras foi utilizada para clonagem no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e transformação nas células competentes TOP10 de *Escherichia coli*, conforme instruções do fabricante. Os 11 clones positivos obtidos passaram pelo processo de isolamento de DNA plasmidial a partir de bactérias lisadas, por meio do kit innuPREP Plasmid Mini Kit Plus (Analytik Jena). As amostras foram sequenciadas em um sequenciador automático 3500 x L (Applied Biosystem) de acordo com as instruções do fabricante.

A montagem das sequências de cada clone e detecção de contaminantes foi realizada por meio dos *softwares Phred, Phrap, Consed* (Ewing *et al.*, 1998; Gordon, Abajian & Green; 1998; Gordon, Desmaraias & Green, 2001; Gordon, 2004). As sequências foram submetidas a buscas no Blastn (Altschul *et al.*, 1990) no *Web site* do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). A sequência consenso do DNAr 5S de *H. boulengeri* foi determinada manualmente utilizando o *software* Ugene (Okonechnikov

et al., 2012) e depositada na base de dados do NCBI sob o número de acesso KT943722. A busca por elementos repetitivos foi feita contra o banco de dados Repbase (Kohani *et al.*, 2006) pela interface *web* dos *softwares* RepeatMasker (Tarailo-Graovac & Chen, 2009) e Censor (Kohani *et al.*, 2006). O *software* Inference of RNA alignments (Infernal) (Nawrocki & Eddy, 2013) foi utilizado contra o banco de dados Rfam v 11.0 (Burge *et al.*, 2013) para busca de perfis de estruturas secundárias de RNAs não codificantes (ncRNAs). A anotação da sequência com os elementos encontrados pelas ferramentas acima citadas foi realizada com o *software* Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). A visualização circular foi criada com o *software* Circos (Krzywinski *et al.*, 2009).

A obtenção de cromossomos mitóticos foi feita de acordo com Bertollo, Takahashi & Moreira-Filho (1978), e a hibridização *in situ* com a sonda de DNAr 5S isolada foi realizada de acordo com Pinkel, Straume & Gray (1986), nos sete espécimes de *H. boulengeri*, e em cinco espécimes (3♀, 1♂ e 1 juvenil) de *Hypostomus ancistroides* (*voucher* NUP 17770) coletados em um afluente do rio Cambé, município de Londrina, Paraná (23°22'00.73"S 51°06'30.50"O).

Todos os espécimes analisados foram coletados com a licença de liberação número 11399-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

Resultados

As diferentes estratégias aplicadas possibilitaram a identificação de uma sequência de DNAr 5S composta por 1186 pb, na qual 117 pb corresponderam à unidade transcricional (gene) incompleta do RNAr 5S e 1069 pb ao NTS completo (Figura 1).

A comparação manual da sequência do DNAr 5S de *H. Boulengeri* com as sequências disponíveis no GenBank para outras espécies de peixes, como *Imparfinis shubarti*, *Leporinus obtusidens*, *Brycon cephalus*, *Salmo gairdnerii*, *Oreochromis niloticus*, dentre outras, possibilitou a identificação de elementos considerados típicos, como o TATA-like no NTS, localizado a 24 pb *upstream* do gene de RNAr 5S detectado na região 3' da sequência, e os elementos da região codificante, A box, C box e elemento intermediário (Figura 1 e Tabela 1).

Buscas no NCBI utilizando o Blastn detectaram 90% de similaridade entre a região 5' da sequência parcial do gene de RNAr 5S de *H. Boulengeri* e as sequências de 5S RNAr de *Brycon microlepis* e *Rhizoprionodon porosus*. Entretanto, não houve correspondência entre o NTS e outras sequências previamente reportadas.

Dentro do NTS o *software* RepeatMasker identificou uma repetição simples (AATG)_n e o *software* Censor detectou regiões com similaridade a uma sequência RP5S intercalar incompleta e um elemento transponível (TE) hAT-30HM incompleto (Figura 1 e Tabela 1).

O *software* Infernal, além de detectar o gene de RNAr 5S na posição 5' da sequência, identificou outros ncRNAs. Porém, apenas os resultados com e-value menor que 0,01 foram selecionados. Sendo eles: mir-23, na fita reversa complementar sobreposto a região 3' do gene de RNAr 5S; MIR 2118, Stnc410, Flavo-1, mir-33 e SNORD 95 na região do NTS (Figura 1 e Tabela 1).

No mapeamento físico em *H. Boulengeri* e *H. ancistroides* foram verificados sinais na região pericentromérica de apenas um par de cromossomos (Figura 2a e b).

Discussão

A conservação da região codificante dos genes de RNAr 5S, mesmo entre táxons não relacionados, sugere que esta sequência seja comandada por fortes pressões seletivas (Martins & Galetti Jr., 2001; Pinhal *et al.*, 2009). Dentro desta região, o *box A*, um elemento intermediário (IE), e o *box C*, são componentes típicos que agem conjuntamente como reguladores da transcrição (Pieler, Hamm & Roeder, 1987). Logo, a presença destes elementos fornece indícios de que a sequência isolada de *H. boulengeri* pode conter um gene ativo de 5S na extremidade 5' da sequência.

As extensivas variações do NTS em tamanho e composição de sequência tem sido apontadas como as responsáveis pelo dinamismo e plasticidade do DNAr 5S. De acordo com Santos *et al.* (2006), a ocorrência de pequenas repetições, duplicações e/ou deleções, e inserções, podem explicar estas diferenças. De fato, na região espaçadora do DNAr 5S de *H. boulengeri*, as repetições (AATG)_n e RP5S podem ter sido originadas por duplicação, pois suas sequências fornecem regiões de micro homologia que podem favorecer a ocorrência de rearranjos (ver Mani & Chinnaiyan, 2011). Enquanto a sequência com similaridade ao elemento transponível (TE) hAT-30HM, poderia corresponder a um evento de inserção.

A presença de elementos repetitivos no NTS pode estar relacionada à localização física do DNAr 5S. A região pericentromérica onde foram observados os sinais da sonda em *H. boulengeri* e *H. ancistroides*, é retratada por diferentes autores como rica em sequências repetitivas nos eucariotos (Blevins *et al.* 2009; He *et al.* 2015). Em adição, a localização intersticial do DNAr 5S, em geral próxima ao centrômero, já foi verificada anteriormente em *H. ancistroides*, *Hypostomus tapijara* e *Hypostomus nigromaculatus* (Traldi *et al.*, 2013).

Além disso, Pansonato-Alves *et al.* (2013) verificaram TEs Rex 1 dispersos sobre a região cromossômica do DNAr 5S em *H. ancistroides* e *H. nigromaculatus*, isto em conjunto com a evidência de hAT-30HM no NTS de *H. Boulengeri*, poderia explicar os casos de sítios múltiplos deste DNA ribossômico; condição já verificada *Hypostomus affinis* (Kavalco *et al.*, 2004).

A ligação do DNAr 5S à RNAs não codificantes (ncRNAs), já foi verificada em uma variedade de organismos. Dentre os vertebrados existem casos interessantes de ligação entre o DNAr 5S e o microRNA mir-562; no morcego *Pteropus vampyrus*, por exemplo, cada um dos RNAr 5S é ligado, com distâncias variáveis, à pelo menos uma das cópias do mir-562 (Vierna *et al.*, 2013).

Apesar de não terem sido realizadas validações experimentais para os ncRNAs encontrados na presente análise, é importante mencionar que estas moléculas atuam como catalisadores e reguladores gênicos (Smit, Knight & Heringa, 2009). Ademais, o *software* Infernal utilizado nesta predição trabalha com modelos de estruturas secundárias (Nawrocki & Eddy, 2013). Desta maneira, se nem todos os ncRNAs verificados forem reais, como provavelmente é o caso de Flavo-1 e STnc410, que pertencem à famílias de ncRNAs produzidos por bactérias (<http://rfam.xfam.org/family/RF01705>; <http://rfam.xfam.org/family/RF02060>); ainda assim, existe a probabilidade de que estas sequências possam formar estruturas secundárias. A região identificada como mir-23, por exemplo, pode assumir em função do pareamento de bases, a conformação em formato de grampo, ou, *hairpin* (Ambros *et al.*, 2003).

Sítios que formam estruturas secundárias podem representar regiões propensas à ocorrência de rearranjos, porque em situações onde o DNA se encontra em fita simples, como na forquilha de replicação ou durante a transcrição, a ação de

nucleases é favorecida (Nambiar & Raghavan, 2011). Estas características são também completamente compatíveis com alguns dos gatilhos para os rearranjos cromossômicos revisados por Mani & Chinnaiyan (2011).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam que elementos existentes no NTS podem realmente estar envolvidos no dinamismo da família multigênica do DNAr 5S, podendo favorecer a dispersão deste sítio e também a ocorrência de rearranjos genéticos, que por sua vez podem alterar a posição e/ou o tamanho destas repetições em um genoma. É interessante destacar que a divulgação destas análises tem como objetivo adicional incentivar a realização de estudos futuros que envolvam a busca pelos mesmos elementos em DNAs ribossômicos de outros organismos. Finalmente, a caracterização desta sequência e os bons resultados alcançados na hibridização *in situ* também possibilitam a utilização dos clones para mapeamento físico em estudos futuros.

Figura 1: Diagrama com a anotação dos elementos encontrados na sequência de DNAr 5S de *Hypostomus boulengeri*. Azul escuro: primers; Verde: gene de RNAr 5S; Azul claro: regiões que podem codificar ncRNAs; Roxo: repetições; Amarelo: TE; Vermelho: região TATA-Like.

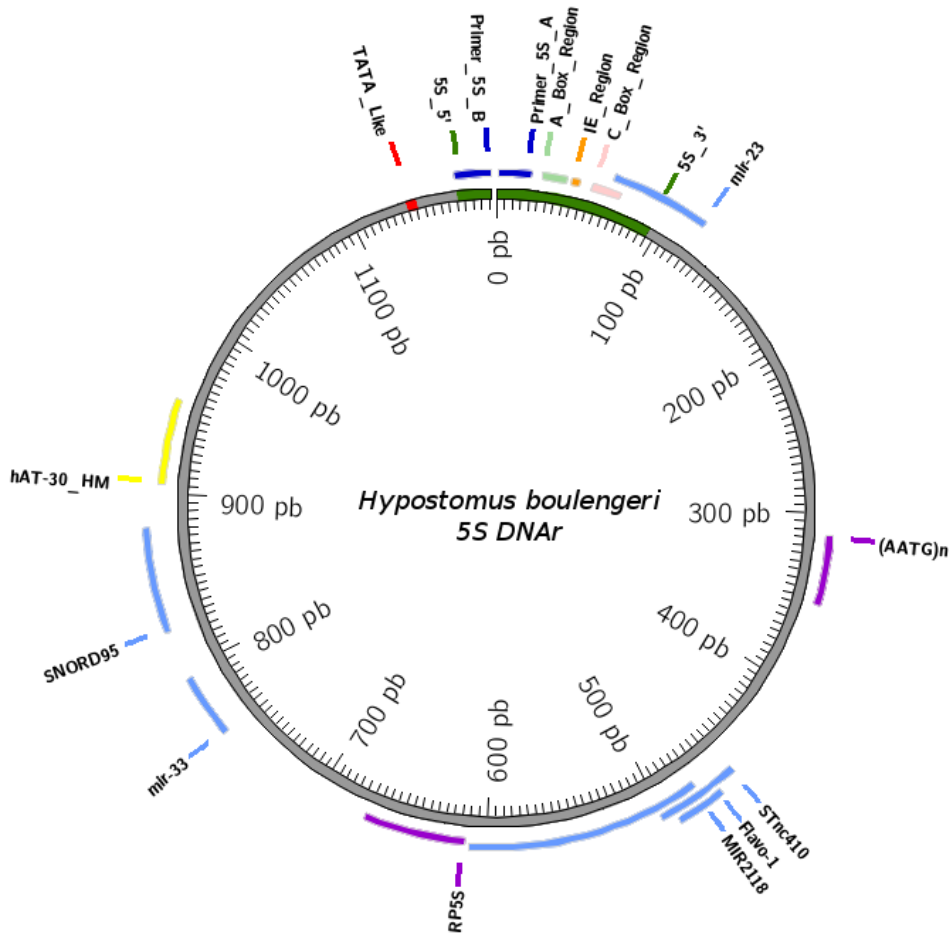


Figura 2: a) Metáfase de *Hypostomus boulengeri* com o sinal de DNAr 5S (verde/biotina) em um par de cromossomos. b) Metáfase de *Hypostomus ancistroides* com sinal de DNAr 5S (verde/biotina) em um par de cromossomos. As setas brancas indicam os sítios de DNAr 5S.

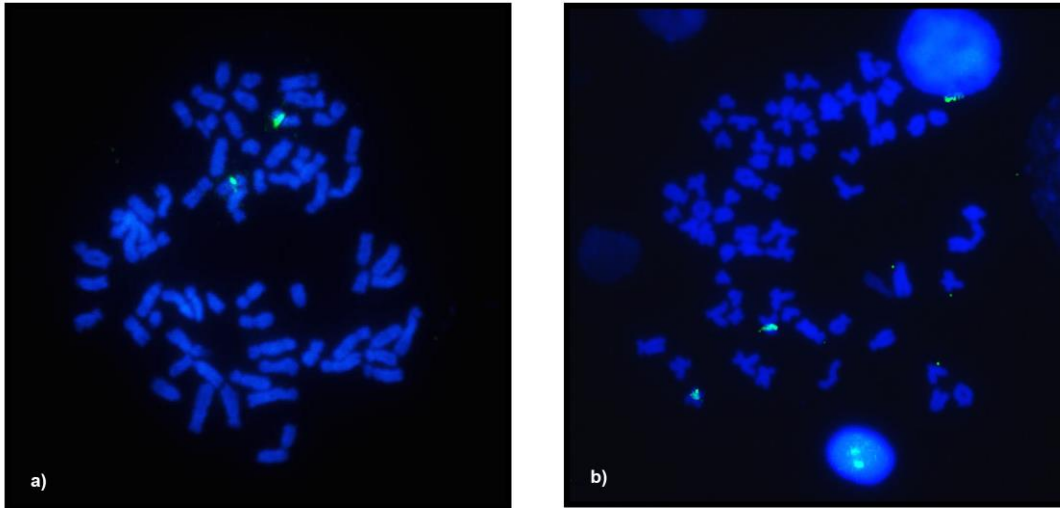


Tabela 1: Posição dos elementos verificados na sequência de DNAr 5S de *H. boulengeri*

Referência	Elementos	Início	Fim	Fita
Infernal_Rfam	5S_RNAr	1	95	+
RepeatMasker	5S	4	97	+
Ugene	A_Box_Region	26	40	+
Ugene	I_E_Region	43	48	+
Ugene	C_Box_Region	55	72	+
Infernal_Rfam	mir-23	65	120	-
RepeatMasker	(AATG)n	313	353	+
Infernal_Rfam	STnc410	455	502	-
Infernal_Rfam	Flavo-1	467	494	-
Infernal_Rfam	MIR2118	477	610	-
Censor	RP5S	612	671	+
Infernal_Rfam	mir-33	761	796	-
Infernal_Rfam	SNORD95	823	881	+
Censor	hAT-30_HM	905	954	+
Ugene	TATA_like	1135	1140	+
Ugene	5S_RNAr	1166	1186	+
Literatura	Primer_5S_A	1	20	+
Literatura	Primer_5S_B	1165	1186	-

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Renata da Rosa pelo auxílio nas extrações de DNA e clonagem, e a Cláudio Henrique Zawadzki pelo auxílio na identificação dos espécimes. Ao CNPq por conceder a bolsa de estudos à mestranda Poliana. Ao SISBIO pela licença de liberação (11399-1) para coleta dos espécimes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403–410.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G. & Tuschl, T. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, **9**, 277-279.
- Blevins, T., Pontes, O., Pikaard, C. S. & Meins Jr., F. 2009. Heterochromatic siRNAs and DDM1 Independently silence aberrant 5S rDNA transcripts in *Arabidopsis*. *Plos One*, vol. 4, June, Issue 6.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi C. S. & Moreira-filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). *Brazilian Journal of Genetics*, 1: 103-120.
- Bueno, V., Venere, P. C., Konerat, J. T., Zawadzki, C. H., Vicari, M. R. & Margarido, V. P. 2014. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary tendencies in the genus. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 1-8.
- Burge, S. W., Daub, J., Eberhardt, R., Tate, J., Barquist, L., Nawrocki, E. P., Eddy, S. R., Gardner, P. P. & Bateman, A. 2013. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Research*, v. 41.
- Campo, D., Machado-Schiaffino, G., Horreo, J. L. & Garcia-Vazquez, E. 2009. Molecular Organization and evolution of 5S rDNA in the genus *Merluccius* and their Phylogenetic Implications. *J. Mol. Evol.*, **68**:208-216.
- Ewing B., Hillier, L., Wendl, M. & Green, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, **8**:175-185.
- Gordon D., Abajian C. & Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, **8**:195-202.
- Gordon D., Desmarais C. & Green P. 2001. Automated finishing with Autofinish. *Genome Res* **11**:614-625.
- Gordon, D. 2004. "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in *Current Protocols in Bioinformatics*. A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley & Co., 11.2.1-11.2.43.

He, Q., Cai, Z., Hu, T., Liu, H., Bao, C., Mao, W. & Jin, W. 2015. Repetitive sequence analysis and karyotyping reveals centromere-associated DNA sequences in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Plant Biology*, **15**: 105.

Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. 2004. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:107-110.

Kohani, O., Gentles, A. J., Hankus, L. & Jurka, J. 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in RepBase: RepBaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics*, **7**:474.

Krzywinski M., Schein J., Birol I., Connors J., Gascoyne R., Horsman D., Jones, S. J. & Marra, M. A. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.*, **19**: 1639–45. doi:10.1101/gr.092759.109.

Long, E. O. & David, I. B. 1980. Repeated genes in Eukaryotes. *Annual Reviews in Biochemistry*, **49**, 727–764.

Mani, R-S & Chinnaiyan, A. M. 2011. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nature Reviews: Genetics*, v. 11, 819 - 829.

Martins, C. & Galetti Jr, P. M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two diferente genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, **44**: 903-910.

Martins, C. & Wasko, A. P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In *Focus on Genome Research*, pp. 335–363. New York: Nova Science Publishers.

Nambiar, M. & Raghavan, S. C. 2011. How does DNA breaks during translocations? *Nucleic acids research advances*, 1-13.

Nawrocki, E. P. & Eddy, S. R. 2013. Infernal 1.1:100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, v. 29, n. 22, 2933-2935.

Nazar, R. N. 2004. Ribosomal RNA Processing ans Ribosome Biogenesis in Eukaryotes. *IUB MB Life*, **56**(8): 457-465.

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov. & UGENE Team. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics Applications Note*, v. 28, n. 8.

Pansonato-Alves, J. C., Serrano, É. A., Utsunomia, R., Scacchetti, P. C., Oliveira, C. & Foresti, F. 2013. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of

Hypostomus (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Fish Biol. Fisheries*, **23**:477-489.

Pieler, T., Hamm, J. & Roeder, R. G. 1987. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell*, **48**(1):91-100.

Pinhal, D., Araki, C. S., Gadig, O. B. & Martins, C. 2009. Molecular organization of 5S rDNA in sharks of the genus *Rhizoprionodon*: insights into the evolutionary dynamics of 5S rDNA in vertebrate genomes. *Genet. Res., Camb.*, **91**, 61-72.

Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.83, p.2934-2938.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics Applications Note*, v. 16, n. 10.

Sambrook, J. & Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, V. R., Foresti, F., Wasko, A. P., Oliveira, C. & Martins, C. 2006. Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, **29**, 2, 251-256.

Smit S., Knight, R.; Heringa, J. 2009. RNA structure prediction from evolutionary patterns of nucleotide composition. *Nucleic acids research*, **37**, 1378-1386.

Tarailo-Graovac, M. & Chen, N. 2009. Using Repeat Masker to Identify Repetitive Elements in Genomic Sequences. *Current Protocols in Bioinformatics*, 4.10.1-4.10.14.

Traldi, V. B., Blanco, D. R., Vicari, M. R., Martinez, J. F., Lui, R. L., Barros, A. V., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. 2013. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research*, **12**(1): 463-471.

Vierna, J., Wehner, S., zu Siederdissen, C. H., Martínez-Lage, A. & Marz, M. 2013. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity*, **111**, 410-421.

Wasko, A. P., Martins, C., Wright, J. M. & Galetti Jr, P. M. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, **44**, 893–902.

Zawadzki, C. H., Tencatt, L.F. C. & Froehlich, O. 2014. A new unicuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin. *Neotropical Ichthyology*, **12**(1): 97-104.

ARTIGO 2:**Citogenética comparativa e mapeamento físico dos DNAs ribossômicos 18S e 5S em três espécies de Hypostomini (Loricariidae, Hypostominae)**

Poliana A. Sidol-Wolf¹, Ana Beatriz G. Fernandes Monteiro¹, Fernando C. Jerep² e Lucia Giuliano-Caetano¹

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. ² Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. giuliano@uel.br (autor correspondente)

Resumo

Loricariidae apresenta um grande número de espécies, que se encontram amplamente distribuídas na região Neotropical, e são conhecidas por exibirem amplas variações. Tamaña diversidade dificulta a descrição de novas espécies e o estabelecimento de relações filogenéticas. Recentemente, uma nova hipótese propôs um agrupamento distinto ao nível de subfamílias e tribos; em Hypostominae a até então monogenérica Hypostomini, passou a ser representada por *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*. Considerando o agrupamento destes dois gêneros, no presente estudo análises citogenéticas foram conduzidas em espécimes de *Hypostomus boulengeri*, *Hypostomus ancistroides*, e *Pterygoplichthys ambrosettii*. *Hypostomus boulengeri* e *H. ancistroides* apresentaram o $2n=68$, Ag-RONs múltiplas confirmadas pela hibridização *in situ* (FISH) com DNAr 18S, e sítios de DNAr 18 e 5S localizados em pares de cromossomos distintos. No entanto uma maior quantidade de regiões heterocromáticas foi observada em *H. boulengeri*. *Pterygoplichthys ambrosettii* apresentou o $2n=52$, Ag-RONs simples com heteromorfismo de tamanho confirmado pela FISH com DNAr 18S, sítios de DNAr 18S e 5S localizados em um mesmo par de cromossomos, e regiões heterocromáticas principalmente na região terminal dos cromossomos. Os marcadores cromossômicos empregados no presente estudo mostram, conforme proposto por diferentes hipóteses filogenéticas, uma proximidade maior entre *H. boulengeri* e *H. ancistroides*. Enquanto que *Pterygoplichthys ambrosettii* apresentou características citogenéticas aparentemente conservadas em *Pterygoplichthys*, tal como o $2n=52$, que corroboram a hipótese de que este gênero é mais próximo a *Ancistrus*.

Palavras-chave: cariótipo, *double FISH*, *Hypostomus*, polimorfismos cromossômicos, *Pterygoplichthys*.

Introdução

Loricariidae agrupa os peixes popularmente conhecidos como cascudos e é considerada uma das famílias mais especiosas dentro da ordem Siluriformes (Birindelli, Zanata & Lima, 2007). Recentemente, uma nova classificação baseada em genes nucleares e mitocondriais, foi proposta para esta família por Lujan *et al.* (2015). Nesta hipótese Rhinelepini adquiriu o *status* de subfamília (Rhinelepinae); Neoplecostominae e Otothyrinae se tornaram tribos de Hypoptopomatinae; e Hypostominae foi restrita a duas tribos (Ancistrini e Hypostomini) e sete clados (*Acanthicus*, *Chaetostoma*, *Lithoxus*, *Hemiancistrus*, *Peckoltia*, *Pseudancistrus* e ‘*Pseudancistrus*’). Hypostomini deixou de ser monogenérica e passou a ser representada por *Hypostomus* Lacépède, 1803 e *Pterygoplichthys* Gill, 1858.

Hypostomus representa um dos grupos de peixes mais ricos e complexos da América do Sul, principalmente devido às informações biogeográficas limitadas e variações morfológicas intraespecíficas que dificultam as descrições taxonômicas (Jerep, Shibatta & Zawadzki, 2007; Zawadzki, Tencatt & Froehlich, 2014). *Pterygoplichthys* apresenta um menor número de espécies válidas (Armbruster & Page, 2006; Ferraris Jr., 2007). Apesar disso esse gênero tem sido identificado como invasor e recebido atenção de vários pesquisadores. Principalmente devido aos impactos ecológicos que tem ocasionado, e a possibilidade da ocorrência de híbridos nas populações estudadas (Nico *et al.*, 2012; Rueda-Jasso *et al.*, 2013). O predomínio dos cascudos em rios brasileiros, somado a introdução fora de sua área natural de ocorrência, faz necessária a caracterização destas espécies, seja do ponto de vista taxonômico, ecológico ou genético.

Estudos citogenéticos têm sido aplicados como ferramenta para o estudo da diversidade em peixes (Artoni *et al.*, 2015). Diferentes técnicas, tais como bandamentos e mapeamento físico de sequências, permitem o estabelecimento de marcadores cromossômicos, a identificação de características populacionais e também, nos níveis intra e

interespecíficos (Kavalco *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006; Bitencourt *et al.*, 2011; Traldi *et al.*, 2013).

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo realizar uma análise citogenética comparativa e o mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S, em espécimes de *Hypostomus boulengeri* (Eigenmann & Kennedy, 1903), *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) e *Pterygoplichthys ambrosettii* (Holmberg, 1893).

Material e Métodos

Sete espécimes de *Hypostomus boulengeri* (3♂ e 4♀) e onze de *Pterygoplichthys ambrosettii* (3♀, 1♂ e 7 imaturos), foram coletados no rio Miranda, e em lagoas próximas que se formam durante o período de cheias; no município de Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul (19°34'36.88"S 57° 1'5.87"W; 19°36'42.25"S 57°02'5.13W e 19°32'27.52"S 57°02'22.57"W). Cinco espécimes de *Hypostomus ancistroides* (3♀, 1♂ e 1 imaturos) foram coletados em um afluente do rio Cambé, município de Londrina, Estado do Paraná (23°22'00.73"S 51°06'30.50"W). Todos os exemplares analisados encontram-se tombados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), e no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA/NUP), da Universidade Estadual de Maringá. *Vouchers*: *H. boulengeri* - MZUEL 14257, MZUEL 14258, MZUEL 14260, MZUEL 14261 e NUP 17751; *H. ancistroides* - NUP 17770; *P. ambrosettii* - MZUEL 14259 e MZUEL 14262. Como parte integrante da proposta “Análise Citogenética de algumas espécies da ordem Siluriformes: ênfase em Loricariidae e Doradidae”, o presente estudo conta ainda com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual de Londrina, sob o número de processo 507.2014.96.

A obtenção de cromossomos mitóticos a partir do rim e de cromossomos meióticos a partir do testículo foi feita de acordo com Bertollo, Takahashi & Moreira-Filho (1978). A

classificação cromossômica teve por base a relação entre os braços (RB) maior/menor proposta por Levan, Fredga & Sandberg (1964). A detecção de regiões organizadoras de nucléolo com nitrato de prata (Ag-RONs) e o bandamento-C foram realizados de acordo com os métodos de Howell & Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel, Straume & Gray (1986), utilizando as sondas de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e DNAr 5S de *H. Boulengeri* (Sidol-Wolf et al., em preparação). As lâminas foram incubadas em RNase (0.4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação, realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. O mix de hibridação para *double* FISH consistiu em 12 µL de sonda (7,5 µL de 18S e 2 µL de 5S), 30 µL de formamida (concentração final de 50%), 12 µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6 µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridização foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridização as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 45°C por 5 minutos cada; uma vez em 1xPBS por 10 minutos a 45°C; e posteriormente incubadas em 1xPBD (200 µL 20xSSC, 6 ml Triton 100, 10g leite desnatado em pó, 800ml de água destilada). Para detecção do sinal foi utilizada uma solução contendo 0,5 µL de anti-Digoxigenina + 5 µL de FITC (1:100) + 44 µL de BSA 5% , por lâmina, durante 60 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 5 minutos cada, os cromossomos foram corados com DAPI (50microg/ml). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência com câmera Leica DFC 300FX. Para captura das imagens foi utilizado o *software* Leica Application Suite V 3.1.0.

Resultados

Hypostomus boulengeri apresentou o $2n=68$, com a $FC=6m+10sm+26st+26a$. No braço curto do par 14 subtlocêntrico (st) foi observada uma constrição secundária com heteromorfismo de tamanho (Figura 1a). Em meiose são observados 34 bivalentes em metáfase I (Figura 2f).

O bandamento-C revelou marcações na maioria dos cromossomos, localizadas no braço curto, região pericentromérica, porção terminal e, além disso, um bloco terminal conspícuo em um cromossomo acrocêntrico (Figura 3a).

A impregnação por nitrato de prata revelou Ag-RONs múltiplas, localizadas na região terminal do braço curto dos pares 14, no qual foi observado heteromorfismo de tamanho na constrição secundária; 16, e em um dos cromossomos do par 22 (Box Figura 1a). A FISH com a sonda de DNAr 18S confirmou os resultados de Ag-RONs, mostrando cinco sítios, sendo o mais proeminente coincidente a uma constrição secundária (Figura 3d). O DNAr 5S foi observado na região pericentromérica de apenas um par de cromossomos (Figura 3d). Não houve co-localização entre os sítios de DNAr 18S e 5S.

Hypostomus ancistroides apresentou o $2n=68$, com a $FC=10m+14sm+18st+26a$ (Figura 1b). O bandamento-C revelou uma quantidade de heterocromatina menor do que a observada em *H. boulengeri*, distribuída principalmente na região terminal e centromérica de alguns cromossomos (Figura 3b).

A impregnação por nitrato de prata revelou Ag-RONs múltiplas, no braço curto do par 18 e no braço curto de um dos cromossomos do par 21 (Box Figura 1b). Na FISH com o DNAr 18S os três sítios de Ag-RONs foram confirmados (Figura 3e). Sítios de DNAr 5S foram observados na região pericentromérica de apenas um par de pequenos cromossomos metacêntricos (Figura 3e).

Pterygoplichthys ambrosettii apresentou o $2n=52$, com $FC=6m+34sm+10st+2a$. Na região subterminal do braço longo do par 8 foi observada uma constrição secundária (Figura 1c).

O bandamento-C revelou marcações principalmente na região terminal dos cromossomos. Em adição, foram observadas bandas na região pericentromérica do par 8 e também, adjacentes à sua constrição secundária (Figura 3c).

A impregnação por nitrato de prata revelou Ag-RONs simples com heteromorfismo de tamanho, coincidentes a constrição secundária do par 8 (Box Figura 1c). A FISH com DNAr 18S confirmou a localização e o heteromorfismo de tamanho observado nos sítios de Ag-RON (Figura 3f). O mesmo par portador do sítio de DNAr 18S também apresentou, na região pericentromérica, os sítios simples de DNAr 5S (Figura 3f).

Discussão

Estudos citogenéticos em peixes do Pantanal são considerados incipientes (Becker *et al.*, 2014). De fato, não existem dados cromossômicos publicados para *Hypostomus boulengeri*, registrado na bacia do rio Paraguai. No presente estudo, o $2n=68$ encontrado nesta espécie foi confirmado pela análise meiótica, indicando uma segregação cromossômica regular.

De acordo com Carvalho *et al.* (2015) *H. boulengeri* é proximamente relacionado à *H. ancistroides*, que vem sendo citogeneticamente estudada desde a década de 70 (Michele, Takahashi & Ferrari 1977 apud Alves *et al.*, 2006). Todas as populações de *H. ancistroides* analisadas até o momento apresentam a conservação do número diploide ($2n=68$), o qual também foi encontrado nos espécimes do afluente do rio Cambé (Tabela 1); porém, com fórmulas cariotípicas (FCs) divergentes (Rubert *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013, presente estudo). Tais diferenças podem indicar a ocorrência de inversões pericêntricas,

uma vez que estes rearranjos modificam os tipos de cromossomos e conseqüentemente as FCs, sem influenciar no $2n$ (Takagui *et al.*, 2014). Em adição ao $2n$ os espécimes de *H. boulengeri* e *H. ancistroides* têm em comum: o padrão de Ag-RONs múltiplas, embora em diferente número; a confirmação dos sítios de Ag-RON pela FISH com a sonda de DNAr 18S, a presença de sítios simples de DNAr 5S, e conforme a maioria dos peixes, a localização dos DNAr 18S e 5S em cromossomos distintos (Traldi *et al.*, 2013).

Sítios múltiplos de DNAr 18S tem sido encontrado em todos os espécimes de *H. ancistroides* (Rubert *et al.*, 2011; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Traldi *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2014). Enquanto que, para o DNAr 5S verificam-se duas condições, sítios distribuídos em três cromossomos, com dois co-localizados ao DNAr 18S (Traldi *et al.*, 2013); e sítios simples não co-localizados ao DNAr18S (Bueno *et al.*, 2014).

Polimorfismos associados a RON e aos DNAr 18S e 5S são comumente reportados em *Hypostomus* (Rubert, Zawadzki & Giuliano-Caetano, 2008; Martinez *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2014). Pansonato-Alves *et al.* (2013) sugerem que mecanismos de dispersão independentes, tal como rearranjos cromossômicos e transposições, possam ter ocorrido entre as diferentes linhagens de *Hypostomus*, originando a notória variabilidade numérica e posicional.

No bandamento-C, foram observadas menos regiões heterocromáticas em *H. ancistroides*, quando comparadas ao número de marcações em *H. boulengeri*. Resultado que reforça a heterogeneidade na distribuição de regiões heterocromáticas entre as diferentes espécies de *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 1999; Traldi *et al.*, 2012).

Tabela 1: Números diploides e fórmulas cariotípicas disponíveis para as espécies analisadas no presente estudo.

ESPÉCIES	LOCAL DE COLETA	2n	FC	RF
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Não consta	68	10m+28sm+30st/a	1
<i>H. ancistroides</i>	Rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo (SP), Brasil	68	16m+18sm+34st/a	2
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá (SP)	68	18m+10sm+12st+28a	3
<i>H. ancistroides</i>	Rios Taquari, Água do Pato, Água das Pedras e Ribeirão Três Bocas, Estado do Paraná (PR), Brasil	68	10m+26sm+32st/a	4
<i>H. ancistroides</i>	Rio Piquiri, município de Nova Laranjeiras, (PR), Brasil	68	14m+14sm+40 st/a	5
<i>H. ancistroides</i>	Rio Piquiri, município de Nova Laranjeiras, (PR), Brasil	68	14m+14sm+8st+32a	6
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Dourados, município de Mandaguari, (PR), Brasil	68	14m+12sm+18st+24a	7
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Maringá, município de Maringá, (PR), Brasil	68	16m+12sm+18st+22a	7
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Ximbaúva, município de Ourizona, (PR), Brasil	68	8m+10sm+18st+32a	7
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Hortelã (bacia do Paranapanema), município de Botucatu, (SP), Brasil	68	10m+20sm+10st+28a	8
<i>H. ancistroides</i>	Rio Piquiri, (PR), Brasil	68	14m+14sm+8st+32a	9
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Lapa, município de Ipeúna (SP), Brasil	68	14m+16sm+22st+16a	10
<i>H. ancistroides</i>	Afluente do rio Cambé, município de Londrina (PR), Brasil	68	10m+14sm+18st+26a	11
<i>Liposarcus anisitsi</i>	Rio Miranda, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil	52	8m+14sm+30st/a	3
<i>L. anisitsi</i>	Rio Tietê, município de Botucatu (SP), Brasil	52	28m+12sm+12st/a	3
<i>L. anisitsi</i>	Rio Preto, município de Mirassolândia (SP), Brasil	52	16m+24sm+12st/a	12
<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	Córrego Água Boa (MS), Brasil	52	14m+26sm+8st+4a	13
<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i>	Rio Miranda, (MS), Brasil	52	6m+34sm+10st+2a	11
<i>L. anisitsi</i>	Rio Piracicaba, município de Piracicaba (SP), Brasil	52	16m+28sm+6st+2a	14
<i>Hypostomus boulengeri</i>	Rio Miranda, (MS), Brasil	68	6m+10sm+26st+26a	11

Legenda: Número diploide (2n); Fórmula cariotípica (FC); Referência (RF).

Fonte: (1) Michele, Takahashi e Ferrari (1977 apud ALVES *et al.*, 2006); (2) Artoni e Bertollo (1996); (3) Alves *et al.* (2006); (4) Rubert *et al.* (2011); (5) Bueno, Zawadzki e Margarido (2012); (6) Bueno *et al.* (2014); (7) Endo *et al.* (2012); (8) Pansonato-Alves *et al.* (2013); (9) Bueno *et al.* (2013); (10) Traldi *et al.* (2013a); **(11) presente estudo Sidol-Wolf *et al.* (2016)**; (12) Artoni *et al.* (1999); (13) Fernandes *et al.* (2015); (14) Camilo (2004).

Em relação ao $2n$, *Pterygoplichthys* parece ser um gênero mais conservado que *Hypostomus*, no qual a quantidade de cromossomos pode chegar até a 84 (Cereali *et al.*, 2008). O $2n= 52$ encontrado em *P. ambrosettii* (Artoni *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2015, presente estudo) (Tabela 1), se repete em *Pterygoplichthys joselimaianus* (Oliveira, Souza & Venere, 2006), *Pterygoplichthys multiradiatus* e *Pterygoplichthys gibbiceps* (Alves *et al.*, 2006). Além desta característica, os sítios simples de Ag-RONs (Artoni *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2015) coincidentes ao DNAr 18S (Camilo, 2004), e a presença dos DNAr 18S e 5S em um mesmo cromossomo (Bueno, 2012), já foram anteriormente verificados em *Pterygoplichthys ambrosettii*.

No entanto, a fórmula cariotípica encontrada no presente estudo ($6m+34sm+10st+2a$) difere dos dados até então disponíveis para esta espécie, inclusive da retratada para exemplares também coletados no rio Miranda, município de Corumbá (Alves *et al.*, 2006), onde a fórmula cariotípica foi de $8m+14sm+30st/a$ (Tabela 1). A redução no número de cromossomos st/a pode indicar, assim como em *H. ancistroides*, a participação de inversões pericêntricas na evolução do cariótipo (Fernandes *et al.*, 2015).

As regiões heterocromáticas em *P. ambrosettii* distribuem-se principalmente na região centromérica e terminal dos cromossomos (Artoni *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2015). O heteromorfismo de tamanho observado nos sítios de DNAr 18S poderia ser explicado pela presença de uma banda heterocromática adjacente, pois estas regiões podem passar por processos de amplificação e/ou transposição durante a interfase (Schweizer & Loidl, 1987).

Os resultados do presente estudo reforçam o papel das inversões pericêntricas na evolução cariotípica de Loricariidae, e acrescentam novas informações relacionadas à distribuição de sequências repetitivas em Hypostomini. As características cromossômicas observadas dão suporte a uma evolução cariotípica mais conservada, ao menos em aspectos macroestruturais, nos espécimes de *P. ambrosettii*. Quando os marcadores cromossômicos

empregados no presente estudo são comparados aos dados disponíveis na literatura para *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, é evidenciado que estes apresentam padrões cromossômicos distintos. De acordo com Traldi *et al.* (2013), em *Hypostomus* o menor $2n$ registrado corresponde a *Hypostomus cochliodon*, analisada por Cereali *et al.* (2004), que apresentou 62 cromossomos. Além disso, existem variações quanto à distribuição e número de sítios de DNAs ribossômicos. Em *Pterygoplichthys* o $2n=52$ se repete em todas as espécies citogeneticamente analisadas até o momento, e embora os mapeamentos físicos com DNAs ribossômicos possam ser considerados incipientes para este gênero, o padrão de sítios simples de DNAr 18S e 5S se repetem. Desta forma, parece não haver uma relação tão próxima, pelo menos do ponto de vista citogenético, entre *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, o que concorda com Alves *et al.* (2006), que indicaram maior compartilhamento de características cromossômicas entre *Pterygoplichthys* e *Ancistrus*, dentre elas o $2n=52$ e Ag-RONs simples intersticiais; corroborando a relação de grupos irmãos entre Pterygoplichthini e Ancistrini, proposta por Armbruster (2004).

Agradecimentos

Os autores são gratos ao SISBIO pela concessão da licença (11399-1) para coleta dos espécimes. Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de mestrado fornecidas a Poliana Wolf e Ana Beatriz Monteiro, respectivamente. E também a aluna de iniciação científica Natália Feitosa Santos, por auxiliar nas contagens cromossômicas e montagem de cariótipos.

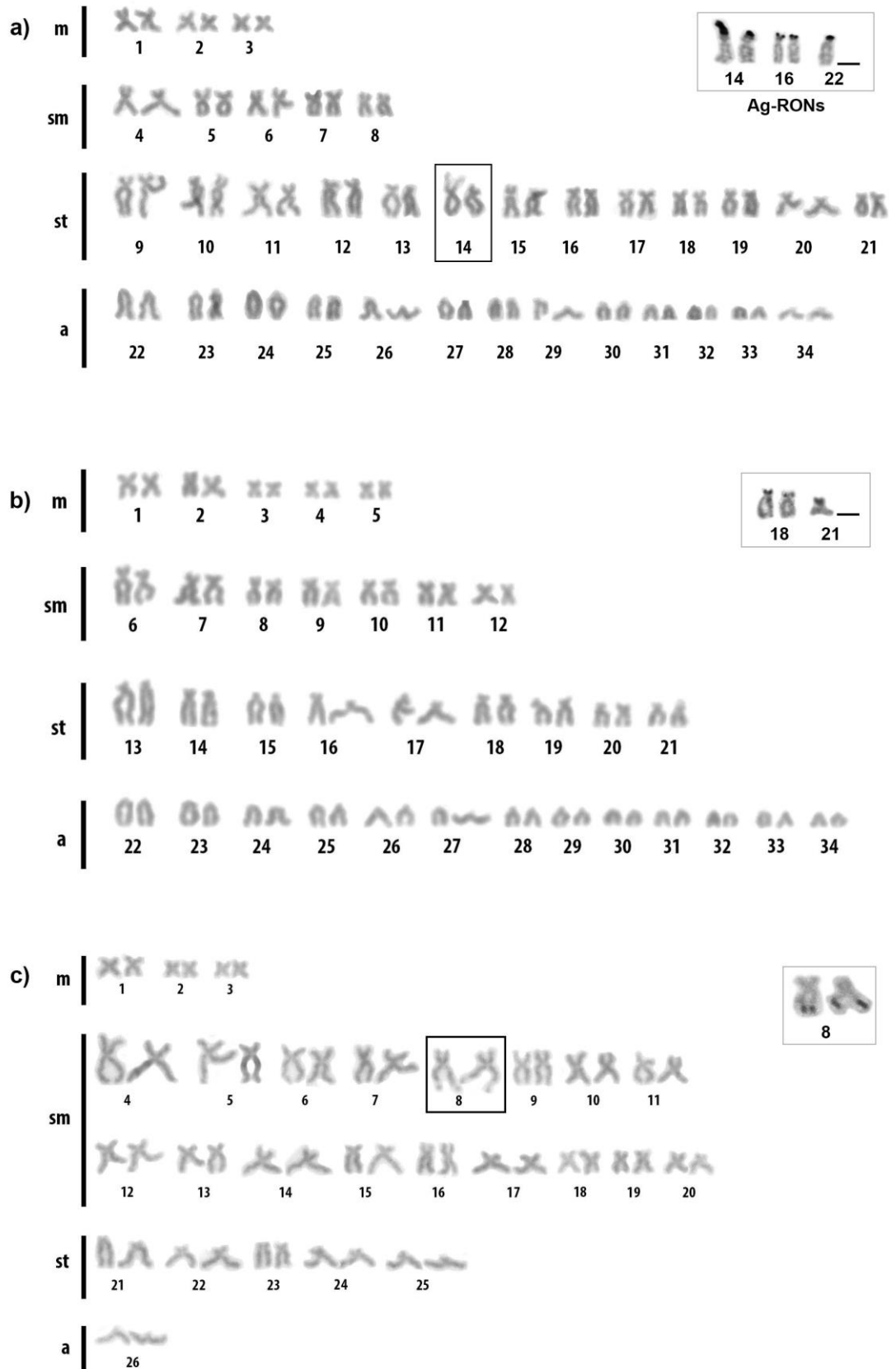


Fig. 1: Cariótipos das espécies analisadas. a) *Hypostomus boulengeri*. b) *Hypostomus ancistroides*. c) *Pterygoplichthys ambrosettii*. Nos boxes encontram-se os cromossomos portadores dos sítios de Ag-RONs.

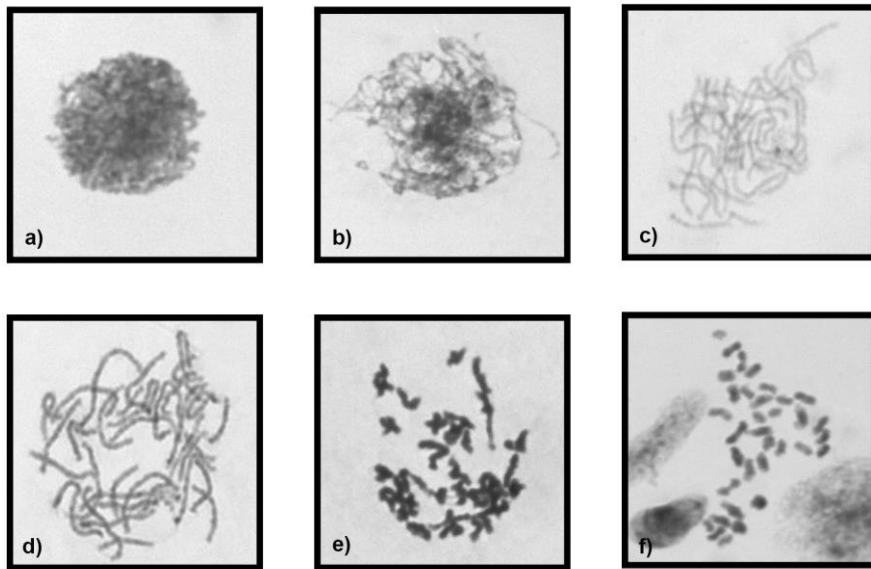


Fig. 2: Fases meióticas em *H. bouleengeri*. a) Leptóteno. b) Zigóteno. c) Paquíteno inicial. d) Paquíteno tardio. e) Diplóteno/Diacinese. f) Metáfase I. Em metáfase I observam-se 34 bivalentes.

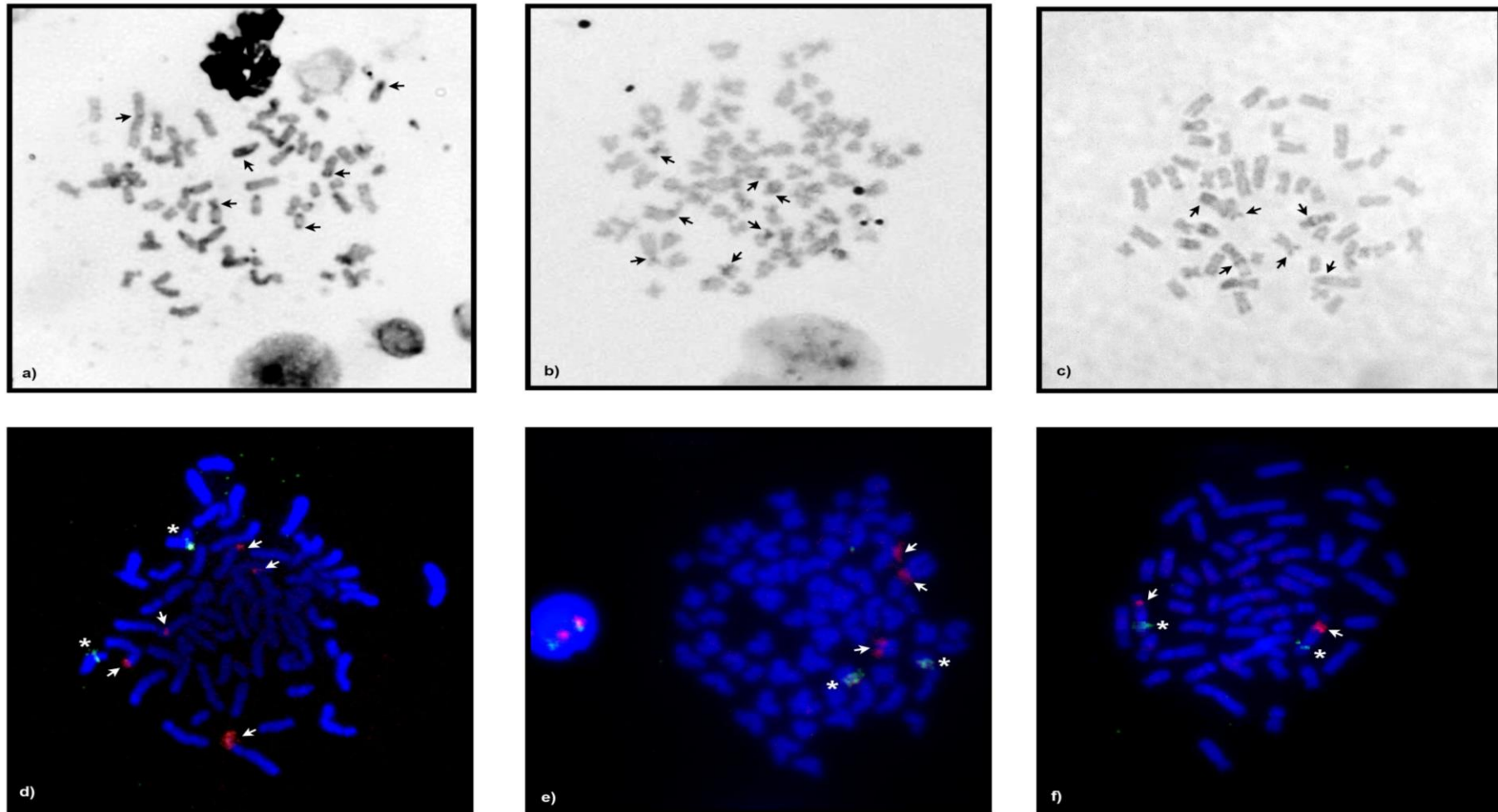


Fig.3: Metáfases dos exemplares analisados. a) Metáfase de *Hypostomus boulengeri* após bandamento-C. b) Metáfase de *Hypostomus ancistroides* após bandamento-C. c) Metáfase de *Pterygoplichthys ambrosettii* após bandamento-C. d) Metáfase de *H. boulengeri* após *double FISH*. e) Metáfase de *H. ancistroides* após *double FISH*. f) Metáfase de *P. ambrosettii* após *double FISH*. Setas pretas indicam as regiões heterocromáticas. Setas brancas indicam os sítios de DNAr 18S (digoxigenina). Asteriscos indicam os sítios de DNAr 5S (biotina).

REFERÊNCIAS

- Alves, A. L., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. & Foresti, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genética*, 128:1-9.
- Armbruster, J. W. & Page, L. M. 2006. Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 4(4): 401-409.
- Artoni, R. F., Bertollo, L. A. C. 1999. Nature and distribution of heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica*, 106: 209-214.
- Artoni, R. F., Molina, W. F., Bertollo, L. A. C. & Galetti Jr. 1999. Heterochromatin analysis in *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 21, 1, 39-44.
- Artoni, R. F., Castro, J. P., Jacobina, U. P., Lima-Filho, P. A., da Costa, G. W. W. F. & Molina, W. F. 2015. Inferring Diversity and Evolution in Fish by Means of Integrative Molecular Cytogenetics. *The Scientific World Journal*, v. 2015, 1-10.
- Becker, Q. M. C., de Castro, R. J., da Silva, A. M. & Vizzotto, P. C. 2014. Cytogenetic Characterization of Two Species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) From Tributaries of The Vermelho River, Upper Paraguay River Basin. *Biodiversidade*, v. 13, n1.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinida). *Brazilian Journal of Genetics*, 1: 103-120.
- Birindelli, J. O., Zanata, A. M. & Lima, F. C. T. 2007. *Hypostomus chrysostiktos*, a new species of armored catfish (Siluriformes: Loricariidae) from rio Paraguaçu, Bahia State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 5(3):271-278.
- Bitencourt, J. A., Affonso, P. R. A. M., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. 2011. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. *Neotropical Ichthyology*, 9(2):317-324.
- Bueno, V. 2012. Caracterização Citogenética Básica e Molecular em *Hypostomus* spp. Lacépède, 1803 do Rio Piquiri (PR). Dissertação de Mestrado não publicada, Universidade do Centro Oeste do Paraná, Paraná, 135p.
- Bueno, V., Venere, P. C., Zawadzki, C. H. & Margarido, V. P. 2013. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Fish Biol. Fisheries*, 23: 103-112.
- Bueno, V., Venere, P. C., Konerat, J. T., Zawadzki, C. H., Vicari, M. R. & Margarido, V. P. 2014. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary tendencies in the genus. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 1-8.

- Camilo, F. M. 2004. Estudo citogenéticos em algumas espécies de peixes da Família Loricariidae pertencentes à Bacia do Rio Piracicaba. Dissertação de Mestrado não publicada, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 76p.
- Carvalho, P. H., Lima, S. M. Q., Zawadzki, C. H., Oliveira, C. & Pinna, M. 2015. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. Mitochondrial DNA, DOI:10.3109/19401736.2015.1079822.
- Cereali S. S., Pomini E, Froehlich O & Giuliano-Caetano L. 2004. Possíveis Evidências de Sistema Sexual XX/XY em *Hypostomus coeliodon* (Loricariidae, Siluriformes) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul. Anais do X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Natal, 137.
- Cereali, S. S., Pomini, E., Rosa, R., Zawadzki, C. H., Froelich, O. & Giuliano-Caetano, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. Gen. Mol. Res., 7(3):583-591.
- Endo, K. S., Martinez, E. R. M., Zawadzki, C. H., Paiva, L. R. S. & Júlio Jr., H. F. 2012. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 34, n. 2, p. 181-189.
- Fernandes, C. A., Alves, D. S., Guterres, Z. R. & Martins-Santos, I. C. 2015. Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Parana River drainage) in Brazil. CompCytogen, 9(1):67-78.
- Ferraris Jr., C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. 2007. Zootaxa, 1418:1-628.
- Hatanaka, T. & Galetti Jr, P. M. 2004. Mapping of the 18S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica, 122: 239-244.
- Howell, W. M. & Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a I-step method. Experientia, 36: 1014-1015.
- Jerep, F. C., Shibatta, O. A. & Zawadzki, C. H. 2007. A new species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Southern Brazil. Neotropical Ichthyology, 5(4):435-442.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. 2004. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). Hereditas, 141:237-242.
- Lee, M. R. & Elder, F. F. B. 1980. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. Cytogenet. Cell. Genet., v. 26, p. 36-40.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. 1964. A Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v. 52, p. 201-220.

- Lujan, N. K., Armbruster, J. W., Lovejoy, N. R. & López-Fernández. 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82 (2015) 269–288.
- Martinez, E. R. M., Zawadzki, C. H., Foresti, F. & Oliveira, C. 2011. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetics and Molecular Biology*, 34, 4, 562-568.
- Nico, L. G., Butt, P. L., Johnston, G. R., Jelks, H. L., Kail, M. & Walsh, S. J. 2012. Discovery of South American suckermouth armored catfishes (Loricariidae, *Pterygoplichthys* spp.) in the Santa Fe River drainage, Suwannee River basin, USA. *Bioinvasions Records*, v.1, 3:179-200.
- Oliveira, R. R., Souza, I. L. & Venere, P. C. 2006. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda. *Neotropical Ichthyology*, 4(1):93-97.
- Pansonato-Alves, J. C., Serrano, É. A., Utsunomia, R., Scacchetti, P. C., Oliveira, C. & Foresti, F. 2013. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Fish Biol. Fisheries*, 23:477-489.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.83, p.2934-2938.
- Rubert, M., Zawadzki, C. H. & Giuliano-Caetano, L. 2008. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(1): 93-100.
- Rubert, M., Rosa, R., Jerep, F. C., Bertollo, L. A. & Giuliano-Caetano, L. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *CompCytogen*. 5(5):397-410.
- Rueda-Jasso, R. A., Campos-Mendoza, A., Arreguín-Sánchez, F., Díaz-Pardo, E. & Martínez-Palacios, C. A. 2013. The biological and reproductive parameters of the invasive armored catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* from Adolfo López Mateos El Infiernillo Reservoir, Michoacán-Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 318-326.
- Sampaio, T. R., Pires, L. B., Rosa, R. & Dias, A. L. 2014. Activity patterns of nucleolar organizer region during spermatogenesis of different curimatid species (Characiformes:Curimatidae). *Genome* 57: 119 – 124.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.

Schweizer, D. & Loidl, J. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today*, 9: 61-74.

Takagui, F. H., Venturelli, N. B., Dias, A. L., Swarça, A. C., Vicari, M. R., Fenocchio, A. S. & Giuliano-Caetano, L. 2014. The Importance of Pericentric Inversions in the Karyotypic Diversification of the Species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. Zebrafish, DOI: 10.1089/zeb.2014.0985.

Traldi, V. B., Vicari, M. R., Blanco, D. R., Martinez, J. F., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. 2012. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *CompCytogen* 6(2): 115 – 125.

Traldi, V. B., Blanco, D. R., Vicari, M. R., Martinez, J. F., Lui, R. L., Barros, A. V., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. 2013. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research*, 12(1): 463 - 471.

Zawadzki, C. H., Tencatt, L.F. C. & Froehlich, O. 2014. A new unicuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin. *Neotropical Ichthyology*, 12(1): 97-104.

CONCLUSÕES GERAIS

As análises clássicas e moleculares realizadas no presente estudo trazem novas contribuições a citogenética de Hypostomini, e permitem em síntese, concluir que:

- A sequência de DNAr 5S de *H. boulengeri* possui elementos que reforçam a conservação da região codificante, e a variabilidade da região espaçadora;

- Os elementos presentes na região espaçadora do DNAr 5S de *H. boulengeri* podem esclarecer processos envolvidos na evolução desta família multigênica, tais como a ocorrência de transposições, e rearranjos genômicos;

- As variações cromossômicas são mais observadas em *Hypostomus*, enquanto que as diferentes espécies de *Pterygoplichthys* estudadas até o presente momento exibem um padrão aparentemente mais conservativo em aspectos macroestruturais;

- Porém, as fórmulas cariotípicas diferenciadas encontradas em *P. ambrosettii*, e o heteromorfismo de tamanho observado nos sinais de DNAr 18S e sítios de Ag-RON, são indícios de polimorfismos, e podem indicar a existência de diferenças cromossômicas microestruturais entre as populações;

- Apesar da atual classificação de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* em Hypostomini, os resultados do presente estudo, em conjunto aos disponíveis na literatura, parecem estar mais próximos à relação filogenética proposta por Armbruster (2004), na qual Pterygoplichthini é grupo irmão de Ancistrini, e Hypostomini é representada por *Hypostomus*.