



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

---

**Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo.**

Josiane Baccarin Traldi

São Carlos

2012

**Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo.**

**São Carlos**

**2012**

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

**Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo.**

Josiane Baccarin Traldi

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

São Carlos

2012

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

T769cc

Traldi, Josiane Baccarin.

Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae) : contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo / Josiane Baccarin Traldi. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

116 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Genética. 2. Peixes. 3. Hypostomini. 4. Evolução cromossômica. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus*  
(Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração  
repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo”**

Dissertação de Mestrado de  
**Josiane Baccarin Traldi**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



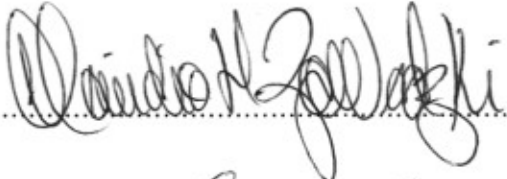
.....

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari




.....

Prof. Dr. Claudio Henrique Zawadzki



.....

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni



.....

Dedico este trabalho aos meus pais

Nilce e Edson pelo amor, apoio

e confiança.

*"Para enxergar claro, basta  
mudar a direção do olhar."*

Antoine de Saint-Exupéry

(O Pequeno Príncipe)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, iluminando meu caminho e me protegendo.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, pela confiança, amizade e oportunidade de realizar este trabalho, e por todos os ensinamentos importantes.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela co-orientação, paciência, amizade, estando disposto a me ajudar em qualquer problema que surgisse.

Aos professores Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo e Dr. Roberto Ferreira Artoni pelas sugestões, companheirismo e pela oportunidade de convívio.

Aos amigos e colegas de trabalho do laboratório: Eli, Marcelo, Gallo, Piau, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração. Agradeço em especial a Ju, pela amizade, paciência e disposição em sempre me ouvir e me ajudar; ao Beto, pela amizade e todos os momentos essenciais de ajuda e ensinamento; e ao Dani, meu co-co-orientador e amigo, pessoa fundamental na realização deste trabalho, por sempre acreditar em mim, independentemente de qualquer coisa e sempre me auxiliar, com muita paciência, na resolução todos os meus problemas.

As minhas amigas Ma e Pri, pelo companheirismo e paciência nesses anos, sempre me ouvindo, me ajudando e tornando a minha pós-graduação mais divertida. As minhas amigas de longe, Le, Dani, Ma Brum e Gabi, que apesar da distância sempre estiveram presentes em minha vida.

À minha família, especialmente meus pais, Edson e Nilce, minhas irmãs, Vani e Bia, e meu namorado, Gustavo, que sempre me encorajaram e me ajudaram em todos os momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (proc. N° 12789-0) que muito auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Brasileiro de meio Ambiente (IBAMA) pela autorização e apoio na coleta dos exemplares.



Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JOSIANE BACCARIN TRALDI** – Nascida em 1 de Outubro de 1989, na cidade de Descalvado, SP, Brasil. Iniciou sua graduação na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, campus São Carlos no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, graduando-se em dezembro de 2010. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC em 2008 e 2009 e, posteriormente, bolsista FAPESP em 2009 e 2010. Ingressou no Mestrado em 2011 com a dissertação intitulada: “Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo” junto ao programa de Genética Evolutiva e Biologia Molecular, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, sendo bolsista FAPESP.

Durante esse período, participou de vários projetos de pesquisa coordenados por seu orientador e co-orientador. Apresenta 3 artigos publicados em periódicos da área e 2 aceitos. Participou de 11 eventos científicos da área, nos quais apresentou 21 trabalhos.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS .....   | i   |
| RESUMO .....   | iii |
| ABSTRACT .....   | v   |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1   |
| 1.1. Características gerais da subfamília Hypostominae, com enfoque em <i>Hypostomus</i> ..... | 1   |
| 1.2. Estudos citogenéticos em Hypostominae, com enfoque em <i>Hypostomus</i> .....             | 2   |
| 1.3. Aspectos gerais sobre DNAs repetitivos e seu estudo em peixes neotropicais .....          | 5   |
| 2. JUSTIFICATIVA .....   | 7   |
| 3. OBJETIVOS .....   | 8   |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 9   |
| 4.1. Metodologia Clássica .....  | 9   |
| 4.1.1. Tratamento “ <i>in vivo</i> ” .....   | 9   |
| 4.1.2. Tratamento “ <i>in vitro</i> ” .....  | 10  |
| 4.1.3. Bandamento C .....  | 11  |
| 4.1.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucéolos (RONs) .....                       | 12  |
| 4.2. Metodologia Molecular .....   | 12  |
| 4.2.1. Extração de DNA total com fenol:clorofórmio .....                                       | 12  |
| 4.2.2. Isolamento de DNAs repetitivos .....  | 13  |
| 4.2.2.1. DNAs ribossômicos .....   | 13  |
| 4.2.2.2. Demais DNAs repetitivos .....   | 14  |
| 4.2.3. Sequenciamento .....  | 14  |
| 4.2.4. Análises de sequências nucleotídicas .....  | 15  |
| 4.2.5. Marcação das sondas .....   | 15  |
| 4.2.6. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente .....  | 15  |
| 4.2.7. Dupla Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (Dupla-FISH) .....                       | 16  |
| 4.3. Análises cariotípicas .....   | 17  |
| 5. REFERÊNCIAS (Introdução e Materiais e Métodos) .....  | 17  |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 34  |
| 6.1. CAPÍTULO 1 .....  | 35  |
| Resumo .....   | 36  |
| Abstract .....   | 37  |
| Introdução .....   | 38  |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| <b>Materiais e Métodos</b> .....     | 39  |
| <b>Resultados</b> .....              | 41  |
| <b>Discussão</b> .....               | 42  |
| <b>Referências</b> .....             | 45  |
| <b>6.2. CAPÍTULO 2</b> .....         | 55  |
| <b>Resumo</b> .....                  | 56  |
| <b>Abstract</b> .....                | 57  |
| <b>Introdução</b> .....              | 58  |
| <b>Materiais e Métodos</b> .....     | 59  |
| <b>Resultados</b> .....              | 61  |
| <b>Discussão</b> .....               | 62  |
| <b>Referências</b> .....             | 67  |
| <b>6.3. CAPÍTULO 3</b> .....         | 76  |
| <b>Resumo</b> .....                  | 77  |
| <b>Abstract</b> .....                | 78  |
| <b>Introdução</b> .....              | 79  |
| <b>Materiais e Métodos</b> .....     | 80  |
| <b>Resultados</b> .....              | 81  |
| <b>Discussão</b> .....               | 82  |
| <b>Referências</b> .....             | 85  |
| <b>6.4. CAPÍTULO 4</b> .....         | 94  |
| <b>Resumo</b> .....                  | 95  |
| <b>Abstract</b> .....                | 96  |
| <b>Introdução</b> .....              | 97  |
| <b>Materiais e Métodos</b> .....     | 99  |
| <b>Resultados</b> .....              | 101 |
| <b>Discussão</b> .....               | 102 |
| <b>Referências</b> .....             | 105 |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> ..... | 114 |

## LISTA DE FIGURAS

### MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Exemplares de *Hypostomus ancistroides* (a), *Hypostomus iheringii* (b) e *Hypostomus nigromaculatus* (c).....30
- Figura 2.** Mapa da América do Sul, com destaque para o estado de São Paulo, Brasil. As ampliações mostram em detalhes a região de coleta do Córrego da Lapa, município de Ipeúna.....31
- Figura 3.** Exemplar de *Hypostomus tapijara*.....32
- Figura 4.** Mapa da América do Sul, com destaque para o estado de São Paulo, Brasil. As ampliações mostram em detalhes a região de coleta do rio Ribeira de Iguape, município de Registro.....33

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Cariótipo de *Hypostomus iheringii* corado com Giemsa (a) e tratado pelo bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos. Barra = 5 µm.....51
- Figura 2.** Polimorfismo heterocromático acentuado nos pares cromossômicos 1 e 5 de *Hypostomus iheringii*.....52
- Figura 3.** Cariótipos de *Hypostomus iheringii* submetidos à FISH usando sonda de rDNA 18S (a) e rDNA 5S (b). Barras = 5 µm.....52

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Cariótipos de *Hypostomus ancistroides* (a, b), *Hypostomus nigromaculatus* (c, d) e *Hypostomus tapijara* (e, f) com coloração convencional de Giemsa (a, c, e) e bandamento C (b, d, f). Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos.....72
- Figura 2.** Metáfases de *Hypostomus ancistroides* (a), *Hypostomus nigromaculatus* (b) e *Hypostomus tapijara* (c) submetidas à dupla-FISH com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Os números representam os pares cromossômicos portadores dos sítios ribossomais.....73
- Figura 3.** Cromossomos mitóticos (a, b, c, g, h, i) e fibras cromatínicas distendidas (d, e, f, j, k, l) de *Hypostomus ancistroides* (a, b, c, d, f) e *Hypostomus. tapijara* (g, h, i, j, k, l) submetidos à dupla-FISH com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Os números representam os pares cromossômicos portadores dos sítios ribossomais.....73

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Metáfases de *Hypostomus ancistroides* (a, b), *Hypostomus iheringii* (c, d), *Hypostomus nigromaculatus* (e, f) e *Hypostmus tapijara* (g, h) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas (GATA)<sub>n</sub> (a, c, e, g) e (TTAGGG)<sub>n</sub> (b, d, f, h).....91

## CAPÍTULO 4

**Figura 1.** Sequências parciais dos retroelementos *Rex1* (a), *Rex3* (b) e *Rex6* (c) extraídos de *Hypostomus nigromaculatus*.....108

**Figura 2.** Metáfases de *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus iheringii*, *Hypostomus nigromaculatus* e *Hypostomus tapijara* submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*. As setas indicam o cromossomo do par 5 de *Hypostomus iheringii* portador do conspícuo bloco heterocromático.....109

## RESUMO

*Hypostomus* é o gênero de cascudos mais amplamente distribuído na América do Sul. Apresenta grande diversidade interespecífica quanto ao padrão de coloração e morfologia, e mostra-se não conservado do ponto de vista cromossômico. Diferentes classes de DNAs repetitivos apresentam dinâmicas evolutivas distintas no genoma dos eucariotos. Assim sendo, a análise e distribuição dessas sequências nos cromossomos podem fornecer dados resolutivos sobre a diversificação e evolução cariotípica. Considerando a grande variabilidade cromossômica encontrada em espécies do gênero *Hypostomus*, aliada ao papel dos DNAs repetitivos para a elucidação de questões de natureza evolutiva, este trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da evolução cariotípica do gênero *Hypostomus*, buscando compreender o papel dos DNAs repetitivos neste cenário. Com a análise citogenética clássica de *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus iheringii*, *Hypostomus nigromaculatus* e *Hypostomus tapijara* foi observado que o número diploide, fórmula cariotípica, distribuição heterocromática e localização dos DNAs ribossômicos são amplamente variáveis no grupo. Em *H. iheringii*, foi identificado um polimorfismo heterocromático populacional possivelmente relacionado ao processo de heterocromatinização. A presente descrição cromossômica de *H. iheringii* e *H. tapijara* compreendem os primeiros estudos citogenéticos nestas espécies, indicando a existência de uma grande diversidade neste gênero ainda inexplorada. Em *Hypostomus*, poucos dados encontram-se disponíveis quanto à localização e caracterização de sequências repetitivas. A hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S e 5S evidenciaram resultados distintos para as quatro espécies, ocorrendo marcações simples, múltiplas e sintênicas. Os sítios (TTAGGG)<sub>n</sub> mostraram-se restritos à porção terminal de todos os cromossomos de *H. nigromaculatus*, *H. ancistroides* e *H. tapijara*, corroborando o padrão evolutivo baseado em fissões cêntricas proposto para *Hypostomus*. Contudo, em *H. iheringii* foi evidenciada a ocorrência de sítios ITS (Interstitial Telomeric Site) em um par cromossômico, sugerindo a ocorrência de outros rearranjos cromossômicos na evolução do grupo, além das fissões cêntricas. A sequência (GATA)<sub>n</sub>,

maior componente do DNA satélite Bkm, e os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* evidenciaram padrão de distribuição disperso nas quatro espécies, indicando a possível relação destas sequências com a grande diversidade cariotípica encontrada em *Hypostomus*.



## ABSTRACT

*Hypostomus* is the widest genus of the armored catfishes in South America. This group presents a great diversity in color pattern and morphology, and shows not conservative chromosomal features. Different classes of repetitive DNAs have distinct evolutionary dynamics in the genome of eukaryotes. Therefore, analyses and distribution of these sequences in chromosomes may provide important data about karyotype evolution and diversification. Given the large chromosomal variability of species of the genus *Hypostomus*, coupled with the valuable role of repetitive DNAs to elucidate evolutionary questions, this study aimed at contributing to the knowledge of the karyotype evolution of the genus *Hypostomus*, trying to understand the role of repetitive DNAs in this scenario. Classical cytogenetic analyses of *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus iheringii*, *Hypostomus nigromaculatus* e *Hypostomus tapijara* show that the diploid number, karyotype formula, heterochromatic distribution and location of ribosomal DNAs are widely variable in this group. In *H. iheringii*, it was identified a heterochromatic polymorphism, which is possibly related to the process of heterochromatinization. The present chromosomal characterization of *H. iheringii* and *H. tapijara* comprise the first cytogenetic studies in these species, which indicates the existence of a great unexplored diversity in this genus. In *Hypostomus*, few data concerning the location and characterization of repetitive sequences are available. The fluorescence *in situ* hybridization with rDNAs 18S and 5S probes showed different results for the four species, occurring simple, multiple and syntenic markings. The sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> were restricted to the terminal portion of the arms of all chromosomes in *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus* and *H. tapijara*, which corroborates the evolution pattern based on centric fissions proposed to *Hypostomus*. However, in *H. iheringii*, it was evidenced ITS sites (Interstitial Telomeric Site) on a chromosome pair, suggesting the presence of other chromosomal rearrangements in the evolution of the group, in addition to centric fissions. The sequence (GATA)<sub>n</sub>, the largest component of the Bkm satellite DNA, and the retrotransposons *Rex1*,

*Rex3* and *Rex6* showed a dispersed pattern in all species, indicating the possible relationship of these sequences with the great diversity of *Hypostomus* karyotype.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os vertebrados vivos, os peixes correspondem ao grupo mais diversificado e de ampla distribuição. A diversidade de espécies e habitats nos quais eles vivem oferecem uma gama sem paralelo para as variações da história da vida (Pough, 2003). De acordo com Eschmeyer & Fong (2012), 32.184 espécies de peixes são consideradas válidas.

O estudo dos peixes neotropicais tem se expandido consideravelmente nos últimos anos, contudo, o relacionamento dentro de muitos grupos ainda necessita de um melhor esclarecimento. Neste contexto, a citogenética tem se mostrado uma importante ferramenta para o conhecimento e entendimento de toda a diversidade ictiofaunística encontrada nesta região, tornando-se ainda mais resolutiva com o advento das técnicas moleculares.

### 1.1. Características gerais da subfamília Hypostominae, com enfoque em *Hypostomus*

Atualmente, Hypostominae corresponde a uma subfamília de Loricariidae (Siluriformes). Foi primeiramente reconhecida como pertencente a tal família por Kner (1853). Apesar da proposição de modificações à classificação deste grupo, vários autores consideram tal subfamília como sendo parafilética (Schaefer, 1987; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Armbruster, 2004). Segundo Weber (2003), Hypostominae apresenta inúmeras espécies com taxonomia confusa, considerando como causa provável o erro de alguns autores ao identificar e analisar a alta variabilidade interespecífica na morfologia e no padrão de coloração dos espécimes deste grupo.

Os peixes inseridos nesta subfamília são popularmente conhecidos como cascudos, apresentando corpo coberto por placas ósseas e boca em forma de ventosa posicionada ventralmente. Segundo Britski *et al.* (1999), os membros de Hypostominae caracterizam-se por apresentarem pedúnculo caudal alto, não-deprimido e região interopercular pouco móvel, provida de espinhos curtos, não-eréteis. São bentônicos, associando-se principalmente aos ambientes de água corrente e

substratos rochosos. Habitam essencialmente ambientes dulcícolas, com exceção de *Hypostomus watwata* Hancock, 1828, que vive em regiões estuarinas de rios das Guianas. Segundo Weber (2003), a maioria destes animais apresenta hábitos crepusculares, ficando sob pedras ou troncos de árvores mortas em períodos diurnos.

Considerando a classificação proposta por Armbruster (2004), a subfamília Hypostominae é composta por 60 gêneros. Dentre estes, o gênero *Hypostomus* representa o grupo com maior número de espécies (Weber, 2003). Segundo Zawadzki *et al.* (2010), são descritas para este gênero 125 espécies. *Hypostomus*, o gênero-tipo de Hypostominae, é amplamente distribuído na América do Sul, ocorrendo em uma grande variedade de ecossistemas de água doce: desde pequenos riachos montanhosos até rios com grandes áreas de várzea (Oyakawa *et al.*, 2005). Os animais que integram este gênero caracterizam-se pela presença de focinho revestido de placas pequenas, às vezes com uma pequena área nua na ponta; interopérculo pouco móvel, desprovido de cerdas hipertrofiadas; e nadadeira adiposa usualmente presente (Britski *et al.*, 1999). *Hypostomus* apresenta ampla diversidade interespecífica quanto ao padrão de coloração e morfologia, dificultando a identificação de determinadas espécies, principalmente aquelas com ampla distribuição geográfica. Segundo Britski (1972), *Hypostomus* é o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros.

## **1.2. Estudos citogenéticos em Hypostominae, com enfoque em *Hypostomus***

Os estudos citogenéticos já realizados em Hypostominae indicam que o grupo apresenta uma grande variabilidade em diversos aspectos referentes ao cariótipo, conferindo-lhe uma enorme complexidade. O número diploide nesta subfamília varia de 34 cromossomos para *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Mariotto *et al.*, 2011) a 84 cromossomos para *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008).

Variações interpopulacionais são recorrentes neste grupo. Distintas populações de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (Michele *et al.*, 1977; Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012a), *Hypostomus albopunctatus* (Regan, 1908) (Artoni &

Bertollo, 1996; Bueno *et al.*, 2012a); *Hypostomus nigromaculatus* (Schubart, 1964) (Rubert *et al.*, 2008), *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012a) e *Hypostomus* aff. *unae* (Steindachner, 1878) (Bitencourt *et al.*, 2012) apresentam diferenças em vários caracteres cromossômicos, contudo exibem conservação no número cromossômico. Variações populacionais e polimorfismos são menos frequentes, sendo encontradas em *A. cuiabae* (Mariotto *et al.*, 2009) e *Hypostomus* sp. B (Artoni & Bertollo, 1999). São evidenciados também casos nos quais ocorrem variações no número diploide, bem como diferenças em outros caracteres do cariótipo, entre populações de uma mesma espécie, como verificado em *Hypostomus paulinus* (Ihering, 1905) (Michele *et al.*, 1977; Rubert *et al.*, 2011) e *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1908) (Michele *et al.*, 1977; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012a; Endo *et al.*, 2012).

Em Hypostominae, a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos não é frequente, contudo, é verificada em algumas espécies. O sistema XX/X0 foi identificado em *Ancistrus* sp. 1 (Alves *et al.*, 2006); e o sistema XX/XY foi verificado em *H. ancistroides* e *Hypostomus macrops* (Eigenmann & Eigenmann, 1888) (Michele *et al.*, 1977). *Ancistrus* cf. *dubius* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) (Mariotto *et al.*, 2004; Mariotto & Miyazawa, 2006), *Ancistrus* sp. Purus e *Ancistrus* sp. Macoari (Oliveira *et al.*, 2009). *Hypostomus* sp. (Artoni *et al.*, 1998), *Ancistrus* sp. 8 (Mariotto *et al.*, 2011) e *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003 (Oliveira *et al.*, 2006) apresentam o sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW.

Outro tipo de polimorfismo cromossômico encontrado nesta subfamília refere-se à presença de cromossomos supranumerários. Tal condição foi verificada em *Hypostomus* sp. 3 (Cereali *et al.*, 2008) e *Hypostomus* sp. Xingu-3 (Milhomem *et al.*, 2010).

Embora muitas espécies de Hypostominae tenham sido estudadas citogeneticamente, em poucas foram realizados estudos de mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S. Contudo, os estudos existentes evidenciam uma grande variação nestes caracteres cromossômicos entre as

distintas espécies da subfamília, ocorrendo tanto sítios simples como múltiplos para as duas sequências (Kavalco *et al.*, 2004; 2005; Mariotto *et al.*, 2009; 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Bitencourt *et al.*, 2012).

*Hypostomus* encontra-se entre os gêneros com maior número de estudos citogenéticos em Hypostominae. Tem sido caracterizado como não conservativo do ponto de vista cromossômico, apresentando grandes variações no número diploide, macroestrutura cariotípica e padrões de bandamento. Desta maneira, é possível que diferentes rearranjos tenham promovido essa diversificação cariotípica e, conseqüentemente, ocasionado mudanças na história evolutiva deste gênero (Artoni & Bertollo, 1996; Bueno *et al.*, 2012b). O número diplóide no grupo apresenta variação de 54 cromossomos para *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus, 1758) (Muramoto *et al.*, 1968) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008). São encontradas espécies de *Hypostomus* tanto com regiões organizadoras de nucléolo simples como múltiplas, sendo esta última a condição a mais frequente (Alves *et al.*, 2003). Com relação à distribuição de blocos heterocromáticos no grupo, verifica-se a manutenção de uma pequena quantidade de heterocromatina na maioria das espécies, ocorrendo variações entre distintas espécies e até mesmo entre populações de uma mesma espécie (Alves *et al.*, 2003; Rubert *et al.*, 2008; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011). Em *Hypostomus*, são observadas diferenças no número e localização de sítios de rDNA 18S entre as espécies. Sítios simples deste gene ribossomal ocorrem em várias espécies de *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 1996; Artoni *et al.*, 1998; Cereali *et al.*, 2008; Milhomem *et al.*, 2010; Rubert *et al.*, 2011; Bitencourt *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2012a), contudo sítios múltiplos são observados com maior frequência (Artoni & Bertollo, 1996; Kavalco *et al.*, 2004; 2005; Alves *et al.*, 2006; Rubert *et al.*, 2008; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012a; Endo *et al.*, 2012). Já os sítios de rDNA 5S mostram-se múltiplos nas espécies já analisadas (Kavalco *et al.*, 2004; Mendes-Neto *et al.*, 2011).

### 1.3. Aspectos gerais sobre DNAs repetitivos e seu estudo em peixes neotropicais

Os organismos eucariotos apresentam duas grandes classes de DNAs repetitivos: os DNAs repetitivos em *tandem* e os DNAs repetitivos dispersos.

DNAs satélites (satDNA), microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas representam classes de DNAs compostos por sequências repetitivas organizadas em *tandem* que, atualmente, têm se mostrado como fundamentais e promissoras em estudos relacionados à evolução cromossômica (Maxon *et al.*, 1983; Hadjiolov, 1985; Charlesworth *et al.*, 1994).

Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por heterocromatina constitutiva, a qual, na maioria das vezes, é composta por satDNA (John, 1988; Chaves *et al.*, 2004). O estudo de DNAs satélites em peixes neotropicais têm se tornado cada vez mais frequente, uma vez que essas sequências podem gerar informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-específicas e/ou cromossomo-específicas (Ugarkovic & Plohl, 2002), assim como em estudos filogenéticos (Pons *et al.*, 2002; Pons & Gillespie, 2003; Kantek *et al.*, 2009). Atualmente, há descrição de várias famílias de satDNA já prospectadas a partir do genoma de diferentes espécies de peixes: Hop (Haaf *et al.*, 1993) e 5SHindIII (Martins *et al.*, 2006) isoladas de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974); As51 isolado por Mestriner *et al.* (2000) de *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842); pPh2004 isolado por restrição genômica de *Parodon hilarii* Reinhardt, 1866 (Vicente *et al.*, 2003); SATH1 e SATH2 isolados por restrição genômica em *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Jesus *et al.*, 2003); Al-HindIII isolado de *Achirus lineatus* (Linnaeus, 1758) por Azevedo *et al.* (2005); WAp (Vicari *et al.*, 2010) isolado da fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon ibitiensis* Amaral Campos, 1944. Vários tipos de satDNA inicialmente isolados a partir genoma de outros animais também têm sido utilizados na análise cromossômica de peixes neotropicais. O DNA satélite Bkm, o qual apresenta como maior componente a repetição de tetranucleotídeos denominada GATA (Eppelen *et al.*, 1982), frequentemente tem sido associado a presença em cromossomos sexuais heteromórficos.

A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> constitui outra fração repetitiva em *tandem* importante no estudo de evolução cromossômica de peixes neotropicais. Sua análise permite a verificação de rearranjos cromossômicos, principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas, nos quais há a possibilidade de detecção de ITS (*Interstitial Telomeric Sequences*) (Slijepcevic, 1998; Rosa *et al.*, 2012).

Os minisatélites, apesar de não apresentarem uma definição padronizada, têm se mostrado importantes ferramentas em estudos genéticos devido a sua dinâmica evolutiva (Martins, 2007). Estas sequências vêm sendo descritas para muitas espécies de peixes (Goodier & Davidon, 1998), contudo o mapeamento cromossômico de minisatélites foi realizado apenas para algumas espécies (Pérez *et al.*, 1999; Crollius *et al.*, 2000; Mestriner *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2004). Da mesma forma, poucos são os trabalhos com mapeamento físico de microsatélites em peixes neotropicais (Hatanaka *et al.*, 2002; Vanzela *et al.*, 2002), sequências essencialmente localizadas nas porções heterocromáticas do genoma de peixes (Martins, 2007).

Os genes ribossomais compreendem duas distintas famílias gênicas, compostas por repetições organizadas em *tandem*. O maior rDNA (45S), região responsável pela organização do nucléolo, engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são separados por espaçadores internos e externos e rodeados por espaçadores não-transcritos. Já o menor rDNA é composto pela família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S (Long & Dawid, 1980). Em função da aparente conservação molecular dos sítios ribossomais entre grupos de organismos relacionados, tais sequências representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos. Inúmeros trabalhos realizados com sondas de rDNA 18S e 5S têm mapeado a localização cromossômica destes sítios através de hibridização *in situ* fluorescente em peixes neotropicais (Martins & Galetti, 1999; 2000; Souza *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2007; Moreira-Peres *et al.*, 2007; Lui *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2010a; Blanco *et al.*, 2010b, Garcia *et al.*, 2010), contudo em espécies pertencentes a subfamília Hypostominae tais estudos ainda estão em seu



início (Kavalco *et al.*, 2004; 2005; Mariotto *et al.*, 2009; 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Bitencourt *et al.*, 2012). Já, os estudos de mapeamento físico dos genes de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) em peixes mostram-se restritos apenas a algumas espécies (Pendás *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 2011).

Sequências de DNA repetitivo disperso são representadas por transposons e retrotransposons, os quais possuem a capacidade de movimentação entre distintas regiões do genoma. Tais sequências também vêm sendo analisadas em estudos cromossômicos de peixes neotropicais. Parise-Maltempi *et al.* (2007) prospectaram o elemento repetitivo disperso *LeSpeI* a partir do genoma de *Leporinus elongatus* Garavello & Britski, 2003, o qual foi posteriormente mapeado em híbridos de *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988) e *L. elongatus* por Hashimoto *et al.* (2010). Gross *et al.* (2009) analisaram a distribuição de *Rex3* em *Shypysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904, *Symphysodon discus* Lyons, 1960 e *Symphysodon haraldi* Schultz, 1960. Mazzucheli & Martins (2009) estudaram a distribuição de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831). Teixeira *et al.* (2009) isolaram o retrotransposon *RCk* a partir do genoma de *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira, 2006 e analisaram a distribuição dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* e *Tc1*-like em *C. kelberi*. Cioffi *et al.* (2010) analisaram a distribuição de *Rex3* em *Erythrinus erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801). Ferreira *et al.* (2011a) estudaram a distribuição dos retrotransposons *Rex1* e *Rex3* em três espécies da subfamília Hypoptopomatinae e Ferreira *et al.* (2011b) prospectaram o transposon *HLBam* de *Hisonotus leucofrenatus* (Miranda Ribeiro, 1908). Valente *et al.* (2011) analisaram a distribuição de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em *Satanoperca jurupari* Heckel, 1840.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os estudos citogenéticos clássicos têm evidenciado uma grande diversidade cromossômica entre as espécies de *Hypostomus*, com vários casos de variações intra e interespecíficas claramente identificadas em várias espécies de diferentes bacias hidrográficas. Entretanto, o grau de resolução de

toda esta diversidade pode ser ampliado e melhor elucidado com o emprego de marcadores cromossômicos, principalmente os obtidos pela citogenética molecular.

Assim, o mapeamento citogenético de famílias de DNAs repetitivos, que propiciam um maior conhecimento sobre a estrutura e organização do genoma, vem se mostrando uma ferramenta de grande importância em diversos grupos de peixes, principalmente entre aqueles com questões problemáticas de ordem taxônomica, evolutiva e sistemática.

Considerando a grande variabilidade cromossômica encontrada em espécies do gênero *Hypostomus*, aliada ao valioso papel dos DNAs repetitivos para a elucidação de questões de natureza evolutiva, novos estudos utilizando o mapeamento cromossômico desta fração do genoma são relevantes para um melhor conhecimento dos processos de diversificação cromossômica desse grupo.

### **3. OBJETIVOS**

Com o intuito de avaliar a dinâmica evolutiva dos DNAs repetitivos nos genomas de *Hypostomus*, buscando relacionar estes dados à intensa diferenciação cariotípica deste gênero de peixes neotropicais, foi proposto:

- Caracterizar espécies de peixes do gênero *Hypostomus* no tocante à macroestrutura cariotípica apresentada pela citogenética clássica;
- Analisar a distribuição e localização cromossômica de classes de DNAs repetitivos através de hibridização *in situ* fluorescente nestas espécies;
- Analisar comparativamente a diversificação cromossômica detectada entre as espécies de *Hypostomus* estudadas, com base nos caracteres citogenéticos clássicos e moleculares, inferindo sobre o papel da fração repetitiva do genoma na geração da diversidade desse grupo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas, por metodologias de citogenética clássica e molecular, quatro espécies do gênero *Hypostomus*: *H. ancistroides* (10 machos e 11 fêmeas) (Fig. 1a), *H. iheringii* (11 machos e 10 fêmeas) (Fig. 1b) e *H. nigromaculatus* (13 machos e 13 fêmeas) (Fig. 1c) provenientes do córrego da Lapa, afluente do rio Passa Cinco, Ipeúna – SP, Brasil (S: 22°23'10,1"; O: 47°47'0,01") (Fig. 2), e *H. tapijara* (14 machos e 26 fêmeas) (Fig. 3) proveniente do rio Ribeira de Iguape, Registro – SP, Brasil (S: 24°29'25,35"; O: 49°49'4910") (Fig. 4).

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas e arrastões. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas, para o Laboratório de Biodiversidade Molecular e Cromossômica de Peixes, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, onde foram mantidos em aquários devidamente aerados até serem processados para a obtenção dos cromossomos metafásicos.

Foram armazenados tecidos dos exemplares coletados para extração do DNA genômico para posterior isolamento dos DNAs repetitivos.

### 4.1. Metodologia Clássica

#### 4.1.1. Tratamento “*in vivo*”

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, por meio da técnica descrita por Bertollo *et al.* (1978):

Foi injetada no animal, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso. Posteriormente, os peixes foram mantidos em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos. Decorrido esse tempo, os animais foram sacrificados e foram retiradas porções do rim. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), sendo transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10mL desta mesma solução. O material foi bem

fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, sendo completado este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, esta suspensão foi incubada a 36 - 37°C, durante 20 minutos. O material foi re-suspendido cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrífuga. Algumas gotas de fixador recém-preparado (metanol : ácido acético - 3 : 1) foram acrescentadas ao material, que foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 - 800rpm, descartando-se o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Foram adicionados, vagarosamente, 5 - 7mL de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1mL de fixador, misturando bem o material. Este foi então guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo “Ependorff”, ou trabalhado conforme a descrição abaixo:

Pingar 3 - 4 gotas da suspensão obtida, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, mantida em água destilada na geladeira, ou sobre uma lâmina seca aquecida por volta de 25 - 30°C, em chapa aquecedora. Escorrer o excesso de material, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel de filtro. Secar diretamente ao ar e corar com o corante Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 - 8 minutos. Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar.

#### **4.1.2. Tratamento “*in vitro*”**

Alternativamente, os cromossomos foram obtidos segundo o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1993), no qual fragmentos do rim foram colocados em 10mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrífuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, foi adicionada 1 - 2 gotas de solução de Colchicina 0,016%, misturando-a bem com o material. O material foi então

transferido para estufa a 36°C, por 30 minutos, e centrifugado durante 10 minutos, a 500 - 800rpm. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 10mL de solução hipotônica (KCl 0,075M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Esse material foi transferido novamente para estufa a 36°C, por mais 30 minutos. Posteriormente, foram adicionadas cerca de 6 gotas de fixador (metanol : ácido acético - 3 : 1), misturando-as com o material repetidas vezes, deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 - 800rpm. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 10mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes. Nova centrifugação foi realizada, por 10 minutos, e a fixação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material foi diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular não muito concentrada e nem muito diluída. Por fim, o material foi pingado sobre lâminas bem limpas e aquecidas ao redor de 25 - 30°C. Após a secagem ao ar, procedeu-se a coloração do material com solução Giemsa 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 - 8 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar.

#### **4.1.3. Bandamento C**

Foi adotado o procedimento básico descrito por Sumner (1972). As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 60°C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2N, água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60°C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8), durante 7 minutos. Alternativamente, o material foi corado com solução de Iodeto de Propídeo (50µg/mL) e analisado em microscopia de fluorescência (Lui *et al.*, 2009).

#### **4.1.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Núcleos (RONs)**

Foi adotado o procedimento descrito por Howell & Black (1980). Sobre a lâmina com cromossomos 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 (50%). A lâmina foi coberta com lamínula e incubada em estufa a 60°C por um período de aproximadamente 3 minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da mesma. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi lavada em água destilada e corada rapidamente durante 20 - 30 segundos com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato (pH 6,8).

## **4.2. Metodologia Molecular**

### **4.2.1. Extração de DNA total com fenol:clorofórmio**

Foi adotado o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001), com algumas adaptações. Inicialmente pequenos pedaços de tecido foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 700µL de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris-HCl 0,01M; Proteinase K – 100µg/mL e SDS 0,1%). As amostras foram então incubadas a 55°C por 2 horas. Foi adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e o material foi agitado suavemente por 20 minutos. Centrifugou-se o material a 13.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. Foram acrescentados NaCl 1M e 2 volumes de etanol 100% gelado. O material foi agitado suavemente, posteriormente centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 200µL de álcool 70% gelado e centrifugou-se o material a 10.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Secou-se o DNA em estufa a 37°C e este foi resuspendido em TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM). Acrescentou-se 1µl de RNase (concentração final = 100µg/mL).

Após a extração do DNA total foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras.

#### **4.2.2. Isolamento de DNAs repetitivos**

##### **4.2.2.1. DNAs ribossômicos**

Os DNAs ribossômicos 18S e 5S foram amplificados a partir de clones descritos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004) e Martins & Galetti Jr. (1999), respectivamente. Realizou-se o procedimento de Mini-preparação plasmidial a partir de colônias de *Escherichia coli* transformadas pela inserção dos genes de interesse acoplados ao plasmídio M13, armazenadas a -80°C.

Inicialmente, as colônias armazenadas a -80°C foram plaqueadas e incubadas a 37°C. Posteriormente uma colônia com o inserto desejado foi pinçada e incubada a 37°C sob agitação por 12 horas. Foram centrifugados 2mL de cultura a 13.000rpm por 1 minuto, descartando o sobrenadante. Em seguida, este processo foi realizado para o restante da cultura. Foram adicionados 400µL da solução I (40µL de RNase 20mg/mL + 200µL de TRIS-HCl 1M + 40µL de EDTA 0,5M + 1720µL de H<sub>2</sub>O), e o material foi agitado. Foram adicionados 400µL da solução II (400µL de NaOH 1M + 200µL de SDS 10% + 1400µL de H<sub>2</sub>O) e misturou-se o material por inversão do tubo. Adicionou-se 400µL da solução III (1,2mL de acetato de potássio 5M + 230µL de ácido acético + 570µL de H<sub>2</sub>O) e misturou-se o material. Centrifugou-se o material a 13.000rpm por 5 minutos, transferindo o sobrenadante para um tubo limpo. Adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol 100% e misturou-se. O material foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 300µL de etanol 70%. Centrifugou-se o material por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Secou-se o material em estufa a 37°C e acrescentou-se 20µL de água ou TE para ressuspender.

Posteriormente, foram realizadas reações de PCR com os primers M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3') e M13r (5'-GGAAACAGCTATGACCATG -3'), usando o material resultante da Mini-preparação plasmidial como molde.

#### 4.2.2.2. Demais DNAs repetitivos

Outras classes de DNAs repetitivos foram obtidas através de reações de PCR com primers específicos. O DNA telomérico (TTAGGG)<sub>n</sub> foi amplificado utilizando os primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub> (Ijdo *et al.*, 1991); a sequência GATA foi obtida com os primers (GATA)<sub>7</sub> e (TATC)<sub>7</sub> (Ijdo *et al.*, 1991); os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram isolados com os primers *Rex1f* (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC -3') e *Rex1r* (5'-TCCCTCAGC AGAAAGAGTCTGCTC -3'), *Rex3f* (5'-CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG -3') e *Rex3r* (5'-TGGCAGACNNGGGGTGGTGGT -3'), *Rex6f* (5'-TAAAGCATACATGGAGCGCCAC -3') e *Rex6r* (5'-GGTCCTCTACCAGAGGCCTGGG -3'), respectivamente (Volff *et al.*, 1999; 2000; 2001).

#### 4.2.3. Sequenciamento

Os produtos de PCR dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Purification da Amersham-Pharmacia Biotech. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000. As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.



#### 4.2.4. Análises de sequências nucleotídicas

A edição das sequências de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foi realizada com o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (Hall, 1999). Foi utilizado o BLAST (Altschul *et al.*, 1990) na identificação de similaridade destas sequências.

#### 4.2.5. Marcação das sondas

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation* ou por PCR, utilizando os compostos biotina 16-dUTP e digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). O produto da reação de *nick translation* foi precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20°C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 13.000rpm, sendo descartado o sobrenadante, e então o DNA marcado foi colocado em estufa a 37°C para secar completamente.

#### 4.2.6. Hibridização *in situ* Fluorescente

As hibridações foram desenvolvidas conforme Pinkel *et al.* (1986). 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 consistiu de 12µL de sonda, 30µL de formamida (concentração final de 50%), 12µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 37°C, por 6 minutos cada e posteriormente incubadas em 1xPBD (200mL 20xSSC, 6mL Triton 100, 10g not fat dry milk, 800mL de água destilada). A detecção do sinal foi realizada com 3,5µL de avidina-FITC (diluição de 1:100 - Sigma) e 27 µL de tampão C (0,1M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5 e 0,15M de NaCl) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, por lâmina. Após três

lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos cada, foram realizados 3 ciclos de amplificação do sinal utilizando uma solução de anti-avidina-biotina conjugada (2µL de anti-avidina e 38µL de 1xPBD) por lâmina, durante 20 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos, cada lâmina foi tratada com 3,5µL de FITC (1:100) + tampão C, por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens finais, os cromossomos foram corados com DAPI (0,2µg/mL) diluído em uma solução “antifading” (Fluka).

#### **4.2.7. Dupla Hibridização *in situ* Fluorescente (Dupla-FISH)**

A dupla hibridização *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), com algumas adaptações. Foram aplicados sobre as lâminas cerca de 50µL da solução de hibridização permanecendo 16 horas a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em Tween 20 por 5 minutos, incubadas em 90µL de tampão NFDm a 5% por 15 minutos em câmara úmida e novamente lavadas com Tween 20 por 5 minutos cada. Para a detecção das sondas foram colocados sobre as lâminas 100µL do mix contendo 94µL de NFDm, 1µL de avidina-FITC conjugada e 5µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 20 por 5 minutos cada. Em seguida, procedeu-se a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, por 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra-corados com DAPI (0,2µg/mL) diluído em uma solução “antifading” (Fluka).

### 4.3. Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas obtidas pela citogenética clássica foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens dos cromossomos e as observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão.

As preparações de citogenética molecular (hibridização *in situ* fluorescente) foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados.

As imagens selecionadas foram capturadas através do próprio software (DP2-BSW) da câmera acoplada (Olympus DP72) a um microscópio Olympus BX50.

Os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos) conforme a relação de braços descrita por Levan *et al.* (1964), onde o limite da relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

RB= 1,00 - 1,70, metacêntrico (m);

RB= 1,71 - 3,00, submetacêntrico (sm);

RB= 3,01 - 7,00, subtelocêntrico (st);

RB= >7,00, acrocêntrico (a).

## 5. REFERÊNCIAS (Introdução e Materiais e Métodos)

- Almeida-Toledo, L.F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonillo, C.; Porto-Foresti, F.; Daniel-Silva, M.F.Z. (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA *clusters* in five species of *Astyanax* (Pises, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 97(3-4):229-233.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215(3):403-410.

- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**. 56:57-63.
- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Foresti, F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. 128:1-9.
- 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.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**. 49(1):81-90.
- Artoni, R.F.; Venere, P.C.; Bertollo, L.A.C. (1998). A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**. 63:421-425.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**. 106:209-214.
- Azevedo, M.F.C.; Oliveira, C.; Martins, C.; Wasko, A.P.; Foresti, F. (2005). Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). **Genetica**. 125(2):205-210.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. 2:103-120.
- Bitencourt, J.A.; Affonso, P.R.A.M.; Giuliano-Caetano, L.; Carneiro, P.L.S.; Dias, A.L. (2012). Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 11(2):933-943.
- Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Bertollo, L.A.C.; Diniz, D.; Moreira-Filho, O. (2010a). Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the

genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 20:1-8.

doi: 10.1007/s11160-009-9116-3

Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Bertollo, L.A.C.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2010b). Karyotype diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. **Neotropical Ichthyology**. 8:361-368.

Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura, notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura**. São Paulo, FSPUSP e Instituto de Pesca. p.79-108.

Bristki, H.A.; Silimon, K.Z.S; Lopes, B.S. (1999). **Peixes do Pantanal: Manual de identificação**. Brasília, Embrapa.

Bueno, V.; Venere, P.C.; Zawadzki, C.H.; Margarido, V.P. (2012a). Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. doi: 10.1007/s11160-012-9280-8

Bueno, V.; Zawadzki, C.H.; Margarido, V.P. (2012b). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:241-250. doi: 10.1007/s11160-011-9215-9

Cereali, S.S.; Pomini, E.; Rosa, R.; Zawadzki, C.H.; Froenlich, O.; Giluiano-Caetano, L. (2008). Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 7(3):583-591.

Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. 371:215-220.

- Chaves, R.; Santos, S.; Guedes-Pinto, H. (2004). Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**. 121:315-325.
- Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A.C. (2010). Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evolutionary Biology**. 10:271.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**. 16(22):10881-10890.
- Crollius, H.R.; Jaillon, O.; DaSilva, C.; Ozouf-Costaz, C.; Fizames, C.; Fischer, C.; Bouneau, L.; Billault, A.; Quetier, F.; Saurin, W.; Bernot, A.; Weissenbach, J. (2000). Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**. 10:939-949.
- 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**. 34:181-189. doi: 10.4025/actascibiolsci.v34i2.9318
- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 79:3798-3802.
- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2012). **Species of Fishes by family/subfamily**. Versão online datada de 10/05/2012. <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>.
- Ferraris Jr., C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**. 1418:1-628.

- Ferreira, D.C.; Oliveira, C; Foresti, F. (2011a). Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 132(1-2):64-70.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C; Foresti, F. (2011b). A new dispersed element in the genome of the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopotinae). **Mobile Genetic Elements**. 1-2:103-106
- Ferreira, I.A., Bertollo, L.A.C.; Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenetic and Genome Research**. 118:78-83.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Garcia, C.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**. 9:364-385.
- Goodier, J.L.; Davidson, W.S. (1998). Characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. **Journal of Molecular Evolution**. 46:245-255.
- Gross, M.C.; Scheneider, G.H.; Valente, G.T.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. **Cytogenetic and Genome Research**. 127:43-53.
- Haaf, T.; Schmid, M.; Steinlein, C.; Galetti Jr.; P.M.; Willard, H.F. (1993). Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Chromosome Research**. 1:77-86.

- Hadjiolov, A.A. (1985). **The Nucleolus and Ribosome Biogenesis**. New York, Springer-Verlag.
- Hashimoto, D.T.; Mendonça, F.F.; Senhorini, J.A.; Bortolozzi, J.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2010). Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**. 298:346-349.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species. **Cytogenetic and Genome Research**. 134:64-71.
- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F.; Galetti Jr., P.M. (2002). A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetic and Genome Research**. 98:308-310.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S 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 1-step method. **Experientia**. 36:1014-1015.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 19:4780.
- Jesus, C.M.; Galetti Jr., P.M.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**. 118:25-32.
- John, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. **Heterochromatin**. Cambridge, Cambridge University Press.
- Kantek, D.L.Z.; Vicari, M.R.; Peres, W.A.M.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2009). Chromosomal location and distribution of As1 satellite DNA in five



- species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae 1 sedis*). **Journal of Fish Biology**. 75(2):408-21. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02333.x
- 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.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**. 94:180-186.
- Kner, R. (1853). Über die Hypostomiden, order zweit Hauptgruppe der Panzerfische. **Sber. Akad. Wiss. Wien Mathem – Naturwiss. Cl.** 10:279-289.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.
- Long, E.O.; Dawid, I.D. (1980). Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**. 49:727-764.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**. 40:552-559.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. 27:536-542.
- Mariotto, S.; Artoni, R.F.; Miyazawa, C.S. (2004). Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**. 57:327-331.
- Mariotto, S.; Miyazawa, C.S. (2006). *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual

- chromosomes os type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**. 59:299-304.
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Miyazawa, C.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2009). Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**. 7(4):595-600.
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.; Artoni, R.A.; Moreira-Filho, O. (2011). Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**. 5:289-300.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.
- Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti Jr., P.M. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**. 127:133-141.
- Martins, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B. G. **Fish Cytogenetics**. New Hampshire, Kapoor Science Publisher. p.421-453.
- Maxon, R.; Cohn, R.; Kedes, L. (1983). Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**. 17:239-277.
- Mazzucheli, J.; Martins, M. (2009). Genomic organization of repetitive DNAs in cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**. 136:461-469.
- Mendes-Neto, E.O.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (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*. **Comparative Cytogenetics**. 5:133-142.

- Mestriner, C.A.; Galetti Jr., P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**. 85:1-9.
- Michelle, J.L.; Takahashi, C.S.; Ferrari, I. (1977). Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**. 42:536-549.
- Milhomem, S.S.R.; Castro, R.R.; Nagamachi, C.Y.; Souza, A.C.P.; Feldberg, E.; Pieczarka, J.C. (2010). Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comparative Cytogenetics**. 4(1):45-54.
- Montoya-Burgos, J.I.; Muller, S.; Weber, C.; Pawlowski, J. (1998). Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rDNA sequences. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS.
- Moreira-Peres, W.A.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2007). Karyotypic characterization of two species of the genus *Serrapinnus* (Characiformes, Characidae), with the description of a structural polymorphism in *S. heterodon*. **Caryologia**. 60(4):319-324.
- Muramoto, I.; Ohno, S.; Atkin, N.B. (1968). On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**. 24:59-66. doi: 10.1007/BF00329607
- 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, 2003. **Neotropical Ichthyology**. 4(1):93-97.
- Oliveira, R.R.; Feldberg, E.; Anjos, M.B.; Zuanon, J. (2009). Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Journal of Fish Biology**. 75:2209-2225.

- Oyakawa, O.T.; Akama, A.; Zanata, A.M. (2005). Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**. 921:1-27.
- Parise-Maltempi, P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**. 116:218-223.
- Pendás, A.M.; Morán, P.; García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**. 10:147-152.
- Pérez, J.; Morán, P.; García-Vázquez, E. (1999). Physical mapping of three minisatellite sequences in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. **Animal Genetics**. 30:371-374.
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Pons, J.; Gillespie, R.G. (2003). Common origin of the satellite DNAs of Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: Evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**. 313:169-177.
- Pons, J.; Petitpierre, E.; Juan, C. (2002). Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Molecular Biology and Evolution**. 19:1329-1340.
- Pough, F.H.; Heiser, J.B.; Janis, C.M. (2003). **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo, Ed. Atheneu.
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence

vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:739-749. doi: 10.1007/s11160-011-9250-

6

Rubert, M.; Zawadzki, C.H.; Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. 6:93-100.

Rubert, M.; Rosa, R.; Jerep, F.C.; Bertollo, L.A.C.; Giulino-Caetano, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**. 5:397-410.

Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York, Laboratory Press.

Schaefer, S.A. (1987). Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a filogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces, Siluroidei). **Contributions in Science, Natural History Museum Los Angeles**. 394:1-31.

Slijepcevic, P. (1998) Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**. 107:136-140.

Souza, I.L.; Galiann, J.; Rua, P.D.L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2001). Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nuclear rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**. 66:85-91.

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

Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. (2009). Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**. 125:224-234.

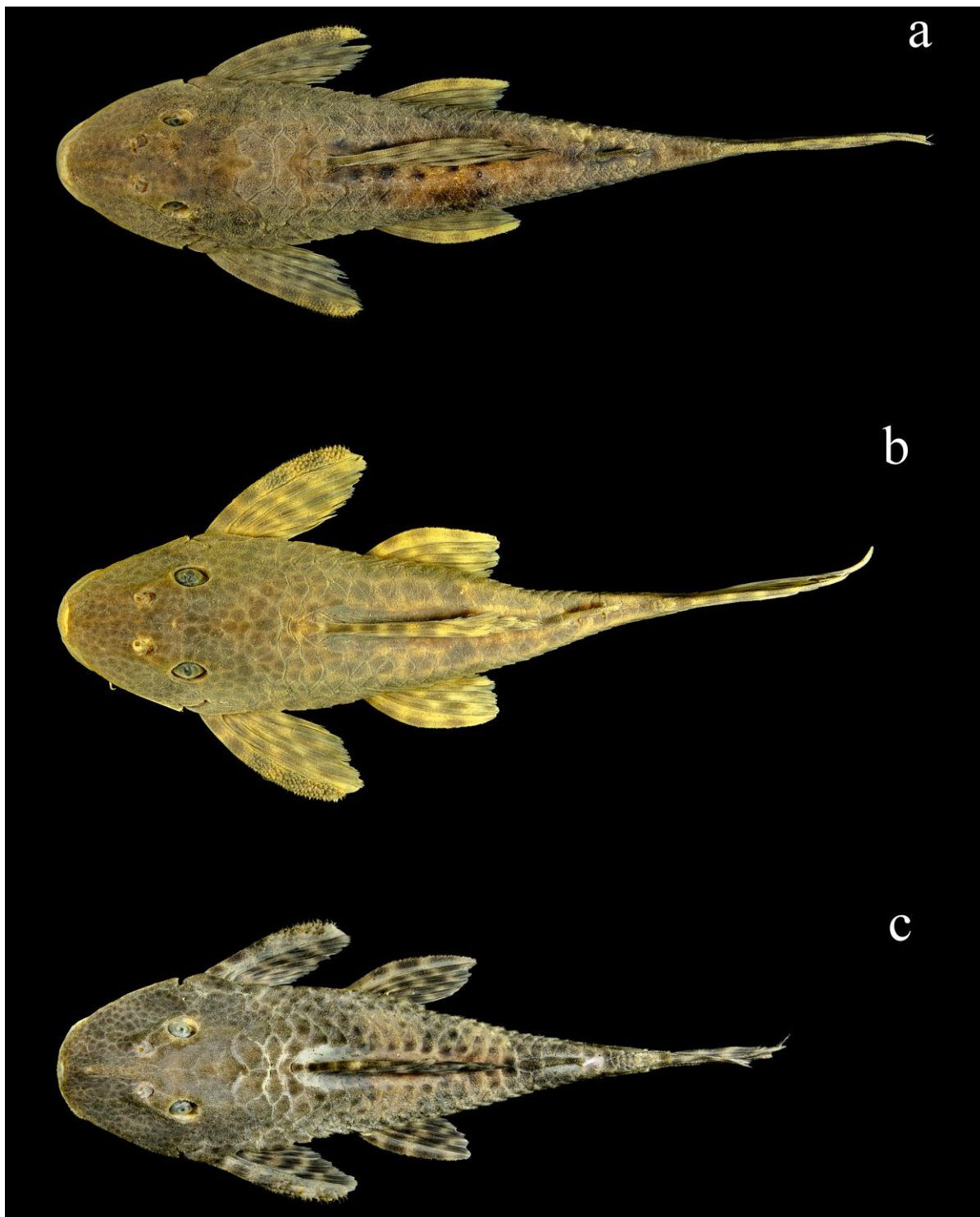
- Ugarkovic, D.; Plohl, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO Journal**. 21:5955-5959.
- Valente, G.T.; Mazzucheli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. (2011). Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* among Cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and Genome Research**.133:34-42.
- Vanzela, A.L.L.; Swarça, A.C.; Dias, A.L.; Stolf, R.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Sbalqueiro, I.J.; Giuliano-Caetano, L. (2002). Differential distribution of (GA)<sub>9</sub>+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia**. 67:9-13.
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116.
- Vicente, V.E.; Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2001). Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 54:365-369.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**. 119:115-120.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Sweeney, K.; Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**. 16:1427-1438.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Scharl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**. 17:1673-1684.

Volff, J.N.; Körting, C.; Froschauer, A.; Sweeney, K.; Scharl, M. (2001). Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**. 52:351-360.

Weber, C. (2003). Subfamily Hypostominae. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Ed. Edipucrs.

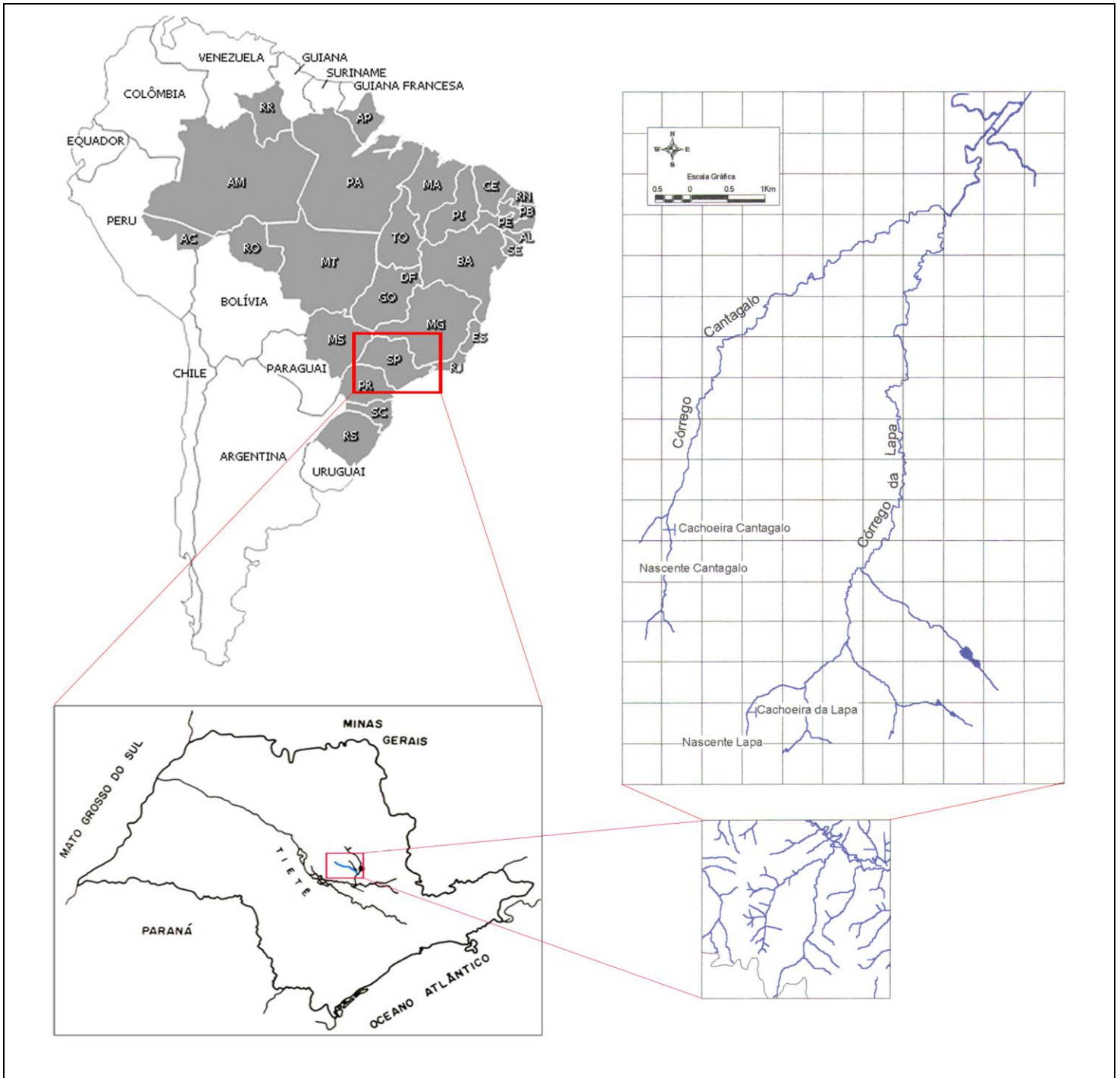
Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. (2010). A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**. 8(4):719-725.

**Figuras (Materiais e Métodos)**



**Figura 1.** Exemplos de *Hypostomus ancistroides* (a), *Hypostomus iheringi* (b) e *Hypostomus nigromaculatus* (c).

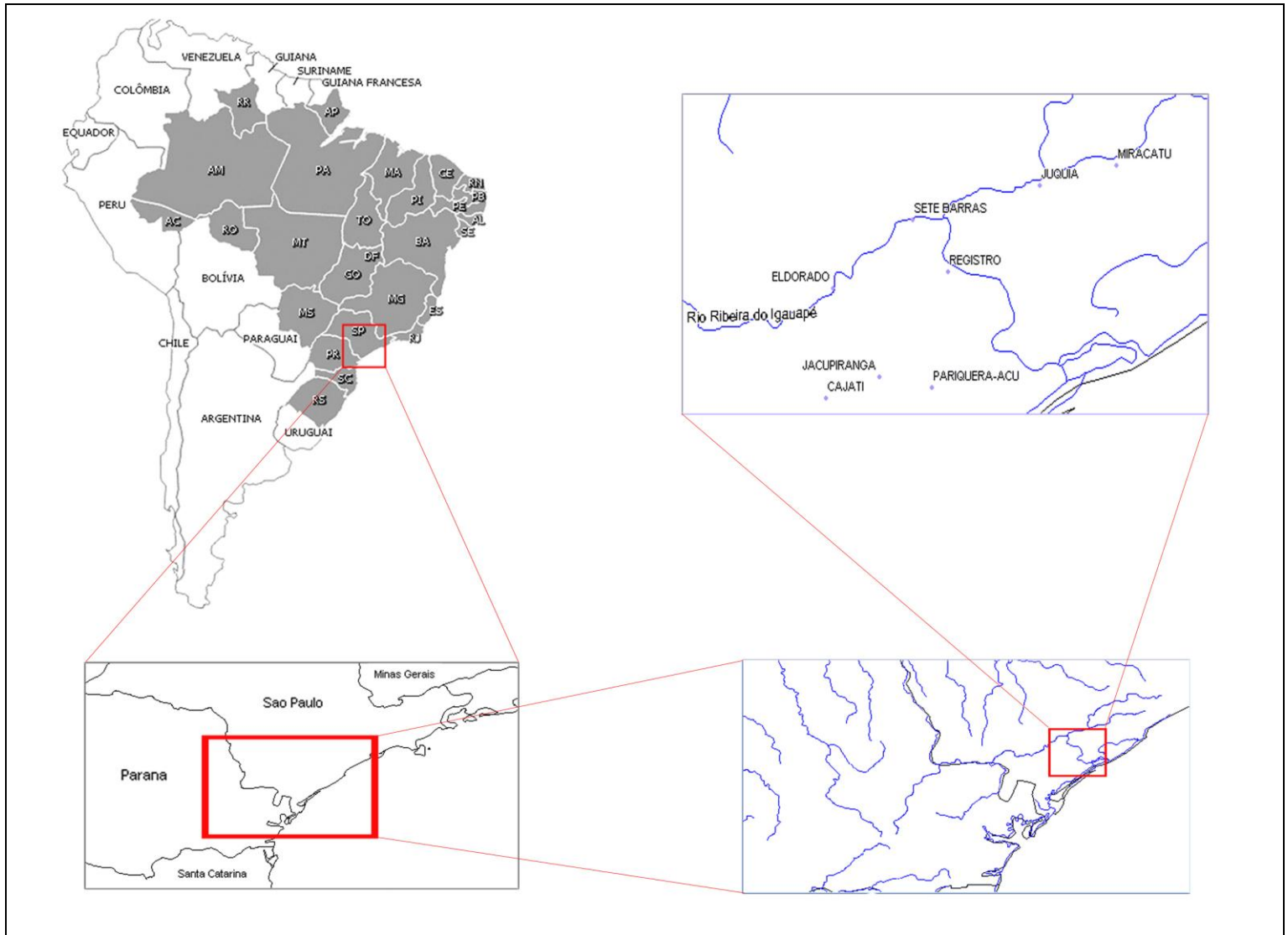




**Figura 2.** Mapa da América do Sul, com destaque para o estado de São Paulo, Brasil. As ampliações mostram em detalhes a região de coleta do Córrego da Lapa, município de Ipeúna.



**Figura 2.** Exemplar de *Hypostomus tapijara*.



**Figura 3.** Mapa da América do Sul, com destaque para o estado de São Paulo, Brasil. As ampliações mostram em detalhes a região de coleta do rio Ribeira de Iguape, município de Registro.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão encontram-se apresentados em quatro capítulos.

O capítulo 1 refere-se ao artigo “First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism” publicado na revista *Comparative Cytogenetics*.

O capítulo 2 refere-se ao artigo “Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites” aceito para publicação na revista *Genetics and Molecular Research*.

Os capítulos 3 e 4 referem-se a artigos em preparação.

## 6.1. CAPÍTULO 1

### **Primeira descrição cariotípica de *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): um caso de polimorfismo heterocromático**

Traldi, J.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. **Comparative Cytogenetics**. 6(2):115-125. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i2.2595

## Resumo

Neste estudo, o qual consiste na primeira análise cariotípica de *Hypostomus iheringii*, nove espécimes coletados no Córrego da Lapa (tributário do rio Passa-Cinco) exibiram número diploide de 80 cromossomos. As técnicas de impregnação por nitrato de prata e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S revelaram a presença de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) múltiplas (pares cromossômicos 13, 20 e 34). A FISH com sonda de rDNA 5S evidenciou que este cístron encontra-se presente apenas no par cromossômico 2. Análise comparativa entre os cariótipos dos animais analisados revelou a presença de um acentuado polimorfismo heterocromático nos pares cromossômicos 1 e 5, ocorrendo espécimes com ambos os cromossomos com blocos heterocromáticos ( $h^+h^+$ ), exemplares portando apenas um cromossomo com bloco heterocromático ( $h^+h^-$ ) e exemplares com ausência total destes blocos ( $h^-h^-$ ). Considerando que este padrão heteromórfico não se encontra correlacionado a variações de tamanho nestes cromossomos, é plausível supor que o processo de heterocromatinização esteja atuando sobre os braços longos dos cromossomos dos pares 1 e 5. Em síntese, todos os marcadores cromossômicos indicam que o cariótipo de *H. iheringii* é altamente diferenciado, e que o processo de heterocromatinização em alguns segmentos cromossômicos pode ter contribuído para a diferenciação cariotípica na espécie.

**Palavras-chave:** heterocromatinização, Hypostomini, peixes, variação cromossômica.

## **Abstract**

In this study, which is the first karyotype analysis of *Hypostomus iheringii*, nine specimens collected in Córrego da Lapa (tributary of the Passa-Cinco River) showed a diploid number of 80 chromosomes. Silver nitrate staining and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with an 18S rDNA probe revealed the presence of multiple nucleolus organizer regions (NORs) (chromosome pairs 13, 20, and 34). FISH with a 5S rDNA probe showed that this cistron was only present in chromosome pair 2. When the karyotypes of individual animals were compared, unique heterochromatic polymorphisms were detected on chromosome pairs 1 and 5. Specifically, specimens had heterochromatic blocks (h+h+) on both chromosomes, one chromosome with heterochromatic blocks (h+h-) or chromosomes that lacked heterochromatic blocks (h-h-). Considering that heteromorphic pattern is not correlated with variation in size, the process of heterochromatinization might act on the long arms of these chromosomes. In summary, all chromosomal markers indicate that the karyotype of *H. iheringii* is highly differentiated and that the heterochromatinization of chromosomal segments may have contributed to its karyotypic differentiation.

**Keywords:** chromosome variation, fish, heterochromatinization, Hypostomini.

## Introdução

Loricariidae é um grupo especioso de peixes neotropicais, composto por seis subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Delturinae (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006; Cramer *et al.*, 2011). Armbruster (2004) considerou a antiga subfamília Ancistrinae como sinônima de Hypostominae, a qual passou a ser constituída por cinco tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini.

*Hypostomus* é o gênero-tipo de Hypostominae e apresenta grande diversidade morfológica (Weber, 2003) e citogenética (Bueno *et al.*, 2012). Segundo Weber (2003), o gênero é composto por um elevado número de espécies, as quais exibem extensa variação morfológica e no padrão de coloração ao nível intraespecífico, dificultando a identificação sistemática. São descritas para este grupo mais de 120 espécies (Zawadzki *et al.*, 2010), das quais 23 são relatadas para a bacia do Alto Paraná (Weber, 2003; Jerep *et al.*, 2007; Zawadzki *et al.*, 2008). Ziemniczak *et al.* (2012) inferiram que a diferenciação cariotípica de Hipostomini acompanha a ampla diversificação de formas desta Tribo e pode ter sido importante para o isolamento genético/reprodutivo das espécies.

Os estudos citogenéticos em *Hypostomus* indicam grande variabilidade em diversos aspectos cariotípicos, o que confere ao grupo uma enorme complexidade. As variações cromossômicas interpopulacionais são recorrentes, especialmente em relação à fórmula cariotípica (Michele *et al.*, 1977; Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2012), distribuição de heterocromatina (Artoni & Bertollo, 1999; Rubert *et al.*, 2008) e regiões organizadoras de nucléolo (Artoni & Bertollo, 2001; Rubert *et al.*, 2008). Por sua vez, polimorfismos populacionais são raros e se referem a variações na fórmula cariotípica (Artoni & Bertollo, 1999).

Heteromorfismos cromossômicos podem ser importantes fontes para diversificação de espécies e/ou para manutenção da variabilidade genética em populações naturais. Em peixes, intensas variações cromossômicas são encontradas mais comumente em famílias como Loricariidae (Bueno *et al.*, 2012) e Characidae (Kantek *et al.*, 2009; Vicari *et al.*, 2010). Em outras famílias, a



exemplo de Heptapteridae (Garcia *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011), Pimelodidae (Moraes-Neto *et al.*, 2011; Matoso *et al.*, 2011) e Auchenipteridae (Lui *et al.*, 2010) a estrutura cromossômica apresenta menor grau de variação.

A amplificação e mobilidade dos blocos heterocromáticos nos cromossomos é um fato bem documentado em alguns organismos (Hamilton *et al.*, 1990; Modi, 1993) e estes eventos exercem um papel importante na evolução cariotípica e especiação (Wichman *et al.*, 1991; Kantek *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011).

Neste estudo, foi realizada a primeira análise cariotípica de *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908), enfatizando a distribuição dos blocos heterocromáticos, inter-relacionando e discutindo a possível atuação da heterocromatina na diversificação dos genomas de Loricariidae.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e preparações cromossômicas mitóticas**

Foram analisados citogeneticamente nove exemplares de *H. iheringii* (5 machos e 4 fêmeas), coletados no Córrego da Lapa, afluente do Rio Passa-Cinco, Ipeúna, São Paulo, Brasil. Os espécimes analisados foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, sob o registro MZUSP 106769. Os animais foram anestesiados com óleo de cravo, com base no método descrito por Griffiths (2000), e posteriormente sacrificados. O procedimento foi realizado de acordo com o Comitê de Ética de Experimentação animal (Processo CEUA 07/2011) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Suspensões celulares contendo cromossomos mitóticos metafásicos foram obtidas a partir de células da porção anterior do rim destes espécimes, de acordo com os procedimentos descritos por Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993).

## **Coloração e Bandamentos Cromossômicos**

Os cromossomos foram corados com solução de Giemsa 5%. O bandamento C seguiu o protocolo descrito por Sumner (1972), com modificação na etapa de coloração (Lui *et al.*, 2009). A detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) foi determinada segundo Howell & Black (1980). Toda a análise convencional dos cromossomos foi realizada de forma sequencial (coloração convencional com Giemsa, bandamento C e Ag-NORs) para identificação precisa dos pares cromossômicos.

## **Hibridização cromossômica, sondas e análises cariotípicas**

O mapeamento dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foi obtido pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), com sondas obtidas de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999), respectivamente. As sondas de rDNA 5S e 18S foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e biotina-14-dATP, respectivamente, por *nick translation*, de acordo com as especificações do fabricante (Roche Applied Science). Todos os processos de hibridização foram realizados sob alta condição de estringência - 77% (200ng de cada sonda, 50% de formamina, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 - 7,2, a 37 °C, “overnight”). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas por 20 minutos em solução de 15% formamida/0,2xSSC a 42°C, 0,1xSSC a 60°C por 15 minutos e 4xSSC/0,05% Tween por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo esta última compreendida por duas lavagens de 5 minutos. A detecção do sinal foi realizada utilizando streptavidina-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) para a sonda de rDNA 18S; e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) para a sonda de rDNA 5S. Os cromossomos foram contra-corados com uma solução de antifading/DAPI (40µL de antifading + 1µL de DAPI - 0,2mg/mL), e analisados em microscopia de epifluorescência (Olympus BX50).

Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) considerados com dois braços e os acrocêntricos (a) com um braço, e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho. O software DP2-BSW do próprio sistema de captura (DP72) foi utilizado para captura das imagens.

## Resultados

Todos os exemplares de *H. iheringii* analisados apresentaram número diploide de 80 cromossomos ( $8m+16sm+28st+28a$ ,  $NF=132$ ), sem a presença de cromossomos sexuais heteromórficos (Fig. 1a). O bandamento C evidenciou pequena quantidade de heterocromatina alocada preferencialmente nas porções terminais dos cromossomos (Fig. 1b). Nos pares 1 (m) e 5 (sm), dois grandes blocos heterocromáticos em posição terminal do braço longo apresentaram variações inter-individuais com: ambos os cromossomos do par marcados ( $h^+h^+$ ), exemplares portando apenas um cromossomo do par marcado ( $h^+h^-$ ) e exemplares com ausência total destes blocos heterocromáticos ( $h^-h^-$ ) (Fig. 2). A impregnação por nitrato de prata revelou a presença de NORs múltiplas localizadas na porção terminal do braço curto de dois pares subtelocêntricos (pares 13 e 20) e na posição terminal do braço longo de um par acrocêntrico (par 34) (Fig. 1, em destaque). Foi verificado um heteromorfismo de tamanho entre os sítios Ag-NORs dos cromossomos do par 13. A hibridização *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S confirmou o resultado encontrado pela coloração com o nitrato de prata para o par 13, porém somente um cromossomo dos pares 20 e 34 foram marcados (Fig. 3a). Com relação aos sítios de rDNA 5S, a FISH revelou um cístron dessa família de DNA ribossomal na porção intersticial do braço curto do par cromossômico 2 (Fig. 3b).

## Discussão

Estudos citogenéticos em Loricariidae revelam uma notável diversidade de números cromossômicos, fórmulas cariotípicas e marcadores neste grupo. Apesar desta extensa variação, análises cariotípicas de espécies da família têm permitido a inferência de tendências evolutivas bem definidas e putativas relações dentro do grupo (Artoni & Bertollo, 2001; Alves *et al.*, 2006, Ziemniczak *et al.*, 2012). Em *Hypostomus*, o número diploide varia de 54 cromossomos observado em *Hypostomus plecostomus* Linnaeus, 1758 (Muramoto *et al.*, 1968) a 84 cromossomos verificado em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008). Conjuntos cromossômicos numericamente semelhantes ao de *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008) foram evidenciados em *Hypostomus* sp. 3 do córrego Salobrinha, Mato Grosso do Sul, Brasil (Cereali *et al.*, 2008) (82 cromossomos), *Hypostomus* sp. E do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil (Artoni & Bertollo, 1996) (80 cromossomos) e *Hypostomus topavae* (Godoy, 1969) do rio Piquiri, Paraná, Brasil (Bueno *et al.*, 2012) (80 cromossomos). Considerando estes dados, nota-se que *H. iheringii* ( $2n = 80$ ) (Fig. 1a) corresponde a uma espécie entre aquelas com os maiores números cromossômicos do gênero. Em Loricariidae, o número diplóide varia de  $2n = 34$  cromossomos em *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Mariotto *et al.*, 2011) a  $2n = 96$  cromossomos em *Upsilodus* sp. (Kavalco *et al.*, 2004). Segundo Artoni & Bertollo (2001), espécies de *Hypostomus* com grandes números cromossômicos, possivelmente, são mais derivadas em relação às com números cromossômicos menores, já que  $2n = 54$  cromossomos representa uma condição plesiomófica para Loricariidae, a qual é compartilhada com o grupo externo Trichomycteridae (Ziemniczak *et al.*, 2012). Desta forma, é possível concluir que *H. iheringii* deve representar uma espécie derivada no gênero, já que apresenta número cromossômico elevado.

Foi postulado que o aumento do número de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos é diretamente proporcional ao  $2n$ , enquanto que o número de metacêntricos/submetacêntricos é inversamente proporcional ao  $2n$ , de maneira que as fissões cêntricas teriam desempenhado papel fundamental na evolução cariotípica do grupo (Artoni & Bertollo, 2001). Recentemente, Bueno *et al.*

(2012) corroboraram esta hipótese somente para espécies com números cromossômicos iguais ou superiores a 80 cromossomos, sendo que para espécies com números cromossômicos menores não foi possível correlacionar o número diploide com a proporção de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos. Diante deste aspecto, outros rearranjos cromossômicos, tais como inversões, deleções, duplicações e heterocromatinização devem estar atuando na diferenciação cromossômica da tribo Hipostomini.

Em peixes, polimorfismos de blocos heterocromáticos com manutenção de estados heteromórficos são relativamente comuns e correlacionados com a diferenciação populacional e especiação (Hartley & Horne, 1984; Mantovani *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2007; Kantek *et al.*, 2009; Bellafronte *et al.*, 2011). Em Loricariidae, variações populacionais em número e tamanho de sítios heterocromáticos foram descritas em *Hisonotus leucofrenatus* Ribeiro, 1908 (Andreatta *et al.*, 2010), *Kronichthys lacerta* Nichols, 1919 e *Isbrueckerichthys duseni* Miranda Ribeiro, 1907 (Ziemniczak *et al.*, 2012). No gênero *Hypostomus*, poucos são os relatos para esta forma de variação, sendo tal observada no presente trabalho para *H. iheringii* (Fig. 2) e para *Hypostomus* sp. B por Artoni & Bertollo (1999), na qual se verificou a presença de um braço cromossômico extra totalmente heterocromático em dois exemplares.

Em *H. iheringii*, o polimorfismo das regiões heterocromáticas dos pares cromossômicos 1 e 5 não são correlacionadas as variações de tamanho destes cromossomos eucromáticos (Fig. 2). Neste sentido, é plausível supor que o processo de heterocromatinização (King, 1980) esteja atuando no braço longo dos cromossomos 1 e 5. Contudo, a ocorrência adicional de amplificação heterocromática em tais cromossomos não pode ser descartada.

Com relação ao mapeamento físico da família multigênica 45S, a inexistência de marcação em um cromossomo dos pares 20 e 34 (Fig. 3) possivelmente ocorreu devido à crossing-over desigual entre os homólogos destes pares, permitindo o surgimento de diferenças de tamanho entre os sítios (Markovic *et al.*, 1978). Desta maneira, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente não foi capaz de

detectar tais sítios em decorrência de sua limitada sensibilidade em relação a sítios muito pequenos (Schwarzacher & Heslop-Harrison, 2000). Segundo Kavalco *et al.* (2005), a população de *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877) proveniente da bacia do rio Paraíba do Sul apresenta sítios múltiplos de rDNA 18S, não ocorrendo marcação em todos os cromossomos Ag-NOR positivos. Desta maneira, verifica-se a possível recorrência de sítios de rDNA 18S muito pequenos em *Hypostomus*. Contudo, no caso de *H. affinis*, o crossing-over desigual mostrou-se mais conspícuo, levando ao surgimento de heteromorfismo de tamanho mais evidente entre os cromossomos homólogos. Diferenças de tamanho entre sítios nos quais se situam a região organizadora de nucléolo neste gênero mostram-se mais frequentes. Observa-se a descrição de vários casos nos quais a variação no tamanho dos sítios é perceptível com nitrato de prata, como foi verificado para o par 13 (Fig. 1, em destaque) (Artoni & Bertollo, 1996; Kavalco *et al.*, 2004; 2005; Cereali *et al.*, 2008; Rubert *et al.*, 2008).

Apesar da literatura sobre mapeamento físico de rDNA 5S em *Hypostomus* não ser abundante, nota-se que tal marcador apresenta variação dentro do grupo, já que o presente trabalho identificou apenas um par cromossômico portador destes sítios, o par 2 (Fig. 3b), enquanto que para *H. affinis* identificou-se 8 cromossomos portadores de tais cístrons (Kavalco *et al.*, 2005) e 9 cromossomos para *Hypostomus regani* Ihering, 1905 (Mendes-Neto *et al.*, 2011). Os dados disponíveis para esse marcador em outros gêneros de Loricariidae indicam que o grupo apresenta-se bastante diversificado, ocorrendo espécies com marcação simples, como por exemplo *Neoplecostomus micropis* (Steindachner, 1877) e *Harttia loricariformis* Steindachner, 1877 (Kavalco *et al.*, 2004) ou múltiplas, evidenciadas em *Harttia carvalhoi* Miranda Ribeiro, 1939 (Centofante *et al.*, 2006) e *Upsilonodus* sp. (Kavalco *et al.*, 2004). Em espécies alocadas em grupos basais de Loricariidae, *K. lacerta*, *I. duseni*, *Parotocinclus maculicauda* Steindachner, 1877 e no grupo externo *Trichomycterus*, a sintonia dos rDNAs maior e menor tem sido detectada e correlacionada ao estado

primitivo (Ziemniczak *et al.*, 2012). Em *H. affinis*, com a ampla diferenciação do número diploide, os rDNAs também tem sido realocados no cariótipo e representam um estado derivado.

Em síntese, *H. iheringii* apresenta tendências evolutivas características do gênero *Hypostomus*, a exemplo do alto número de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos atribuídos a espécies deste gênero com elevados números cromossômicos. Contudo, a distribuição e diversificação heterocromática sugerem novas tendências evolutivas. Todos os marcadores cromossômicos indicam que o cariótipo de *H. iheringii* mostra-se altamente diferenciado, e que o processo de heterocromatinização de segmentos cromossômicos pode ter contribuído para a diversificação cariotípica encontrada na população de *H. iheringii*.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos ao Prof. Dr. Heraldo A. Britski pela identificação dos espécimes, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/MMA) pela autorização de coleta, ao Pedro L. Gallo e Luiz H. da Silva pelo esforço de coleta e ao Prof. Dr. Luiz A. C. Bertollo pelas considerações. Este estudo foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

### **Referências**

Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado A.; Foresti, F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. 128:1-9. doi: 10.1007/s10709-005-0715-1

- Andreato, A.A.; Ferreira, D.C.; Foresti, F.; Oliveira, C. (2010). Molecular cytogenetic study of heterochromatin in *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae). **Hereditas**. 147:10-17. doi: 10.1111/j.1601-5223.2009.2149.x
- 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. doi: 10.1111/j.1096-3642.2004.00109.x
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**. 49:81-90.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**. 106:209-214. doi: 10.1023/A:1003957719178
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**. 134:201-210. doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00201.x
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers and phylogenetic inferences among species of Parodontidae. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559-570. doi: 10.1007/s11160-010-9177-3
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. 2:103-120.
- 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. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:241-250. doi: 10.1007/s11160-011-9215-9



- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2006). Cytogenetic characterization and description of XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 12:320-324. doi: 10.1159/000089887
- Cereali, S.S.; Pomini, E.; Rosa, R.S.; Zawadzki, C.H.; Froenlich, O.; Giluiano-Caetano, L. (2008). Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 7:583-591. doi: 10.4238/vol7-3gmr404
- Cramer, C.A.; Bonatto, S.L.; Reis, R.E. (2011). Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 59:43-52. doi: 10.1016/j.ympev.2011.01.002
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘in vitro’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Garcia, C.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetic and Molecular Research**. 9:365-384.
- Griffiths, S.P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**. 57:1453-1464. doi: 10.1111/j.1095-8649.2000.tb02224.x
- Hamilton, M.J.; Honeycutt, R.L.; Baker, R.J. (1990). Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from *in situ* hybridization. **Chromosoma**. 99:321-329. doi: 10.1007/BF01731719
- Hartley, S.E.; Horne, M.T. (1984). Chromosome polymorphism and constitutive heterochromatin in the Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Chromosoma**. 89:377-380. doi: 10.1007/BF00331255

- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244. doi: 10.1007/s10709-004-2039-y
- 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. doi: 10.1007/BF01953855
- 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**. 5:435-442. doi: 10.1590/S1679-62252007000400002
- Kantek, D.L.Z.; Vicari, M.R.; Peres, W.A.M.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2009). Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**. 75:408-421. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02333.x
- 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. doi: 10.1159/000078567
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**. 94:180-186. doi: 10.1038/sj.hdy.6800595
- King, M. (1980). C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma**. 80:191-217. doi: 10.1007/BF00286300
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**. 40:552-559. doi: 10.1016/j.micron.2009.03.004
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2010). Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) in Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**. 99:648-656. doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01389.x
- Machado, T.C.; Pansonato-Alves, J.C.; Pucci, M.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics**. 12:65. doi: 10.1186/1471-2156-12-65
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**. 109:161-168. doi: 10.1023/A:1017546601065
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2011). Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetic**. 5:289-300. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i4.1757
- Markovic, V.D.; Worton, R.G.; Berg, J.M. (1978). Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. **Human Genetics**. 41:181-187. doi: 10.1007/BF00273100
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367. doi: 10.1023/A:1009216030316

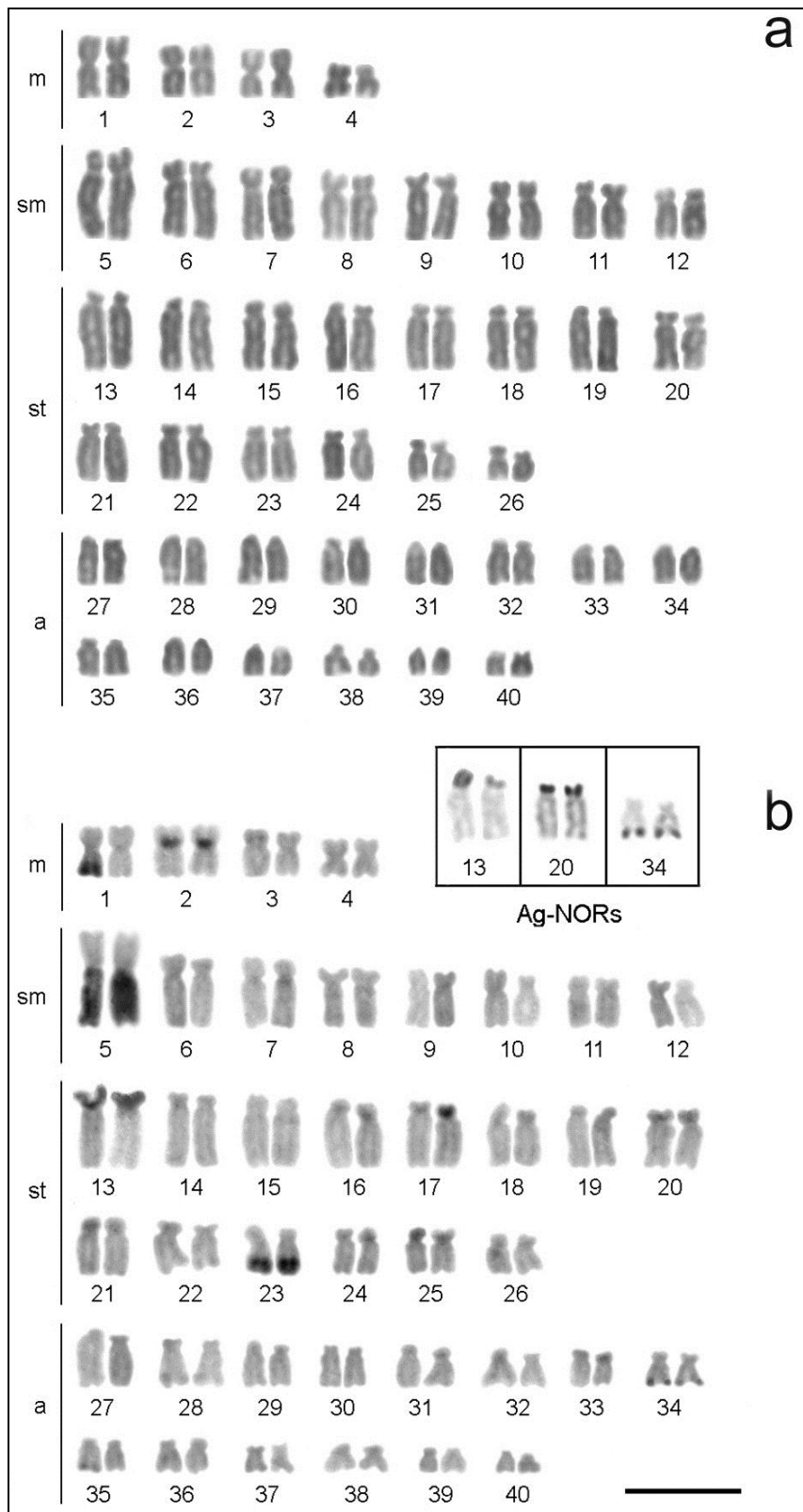
- Matoso, D.A.; Almeida Val, V.M.F.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Almeida, M.C.; Vicari, M.R.;  
Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F. (2011). Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion  
melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the existence of  
sex chromosome system in the species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:497-508.  
doi: 10.1007/s11160-011-9201-2
- Mendes-Neto, E.O.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho O. (2011). Description of karyotype in  
*Hypostomus regani* (Iheringi, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil  
with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**.  
5(2):133-142. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i2.964
- Michelle, J.L.; Takahashi, C.S.; Ferrari, I. (1977). Karyotypic studies of some species of the family  
Loricariidae (Pisces). **Cytologia**. 42:536-549. doi: 10.1508/cytologia.42.539
- Modi, W.S. (1993). Comparative analysis of heterochromatin in *Microtus*: sequence heterogeneity  
and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. **Cytogenetics and Cell  
Genetics**. 62:142-148. doi:10.1159/000133458
- Moraes Neto, A.; Silva, M.; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Collares-Pereira, M.J.;  
Artoni, R.F. (2011). Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae  
(Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**. 9:97-105.
- Muramoto, I.; Ohno, S.; Atkin, N.B. (1968). On the diploid state of the fish order Ostariophysi.  
**Chromosoma**. 24:59-66. doi: 10.1007/BF00329607
- 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 United  
States of America**. 83:2934-2938. doi: 10.1073/pnas.83.9.2934
- Reis, R.E.; Pereira, E.H.L.; Armbruster, J.A.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. doi: 10.1111/j.1096-3642.2006.00229.x

- Rubert, M.; Zawadzki, C.H.; Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. 6:93-100. doi: 10.1590/S1679-62252008000100011
- Schwarzacher, T.; Heslop-Harrison, P. (2000). **Practical In Situ Hybridization**. Oxford, BIOS Scientific Publishers.
- Souza, I.L.; Venere, P.C.; Moreira-Filho, O. (2007). Constitutive heterochromatin and Ag-NOR polymorphisms in the small characid fish *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842). **Cytologia**. 72:63-69. doi: 10.1508/cytologia.72.63
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75:304-306. doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2003). Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenetic and Genome Research**. 101:24-28. doi: 10.1159/000073413
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noieto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x
- Weber, C. (2003). Subfamily Hypostominae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Ed. Edipucrs.
- Wichman, H.A.; Payne, C.T.; Ryder, O.A.; Hamilton, M.J.; Maltbie, M.; Baker, R.J. (1991). Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**. 82:369-377.
- Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. (2008). Two new species of *Hypostomus* Lacépède (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. **Neotropical Ichthyology**. 6(3):403-412.

Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. (2010). A new darksaddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**. 8:719-725. doi: 10.1590/S1679-62252010000400003

Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Rosa, K.O.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/11250003.2012.676677>

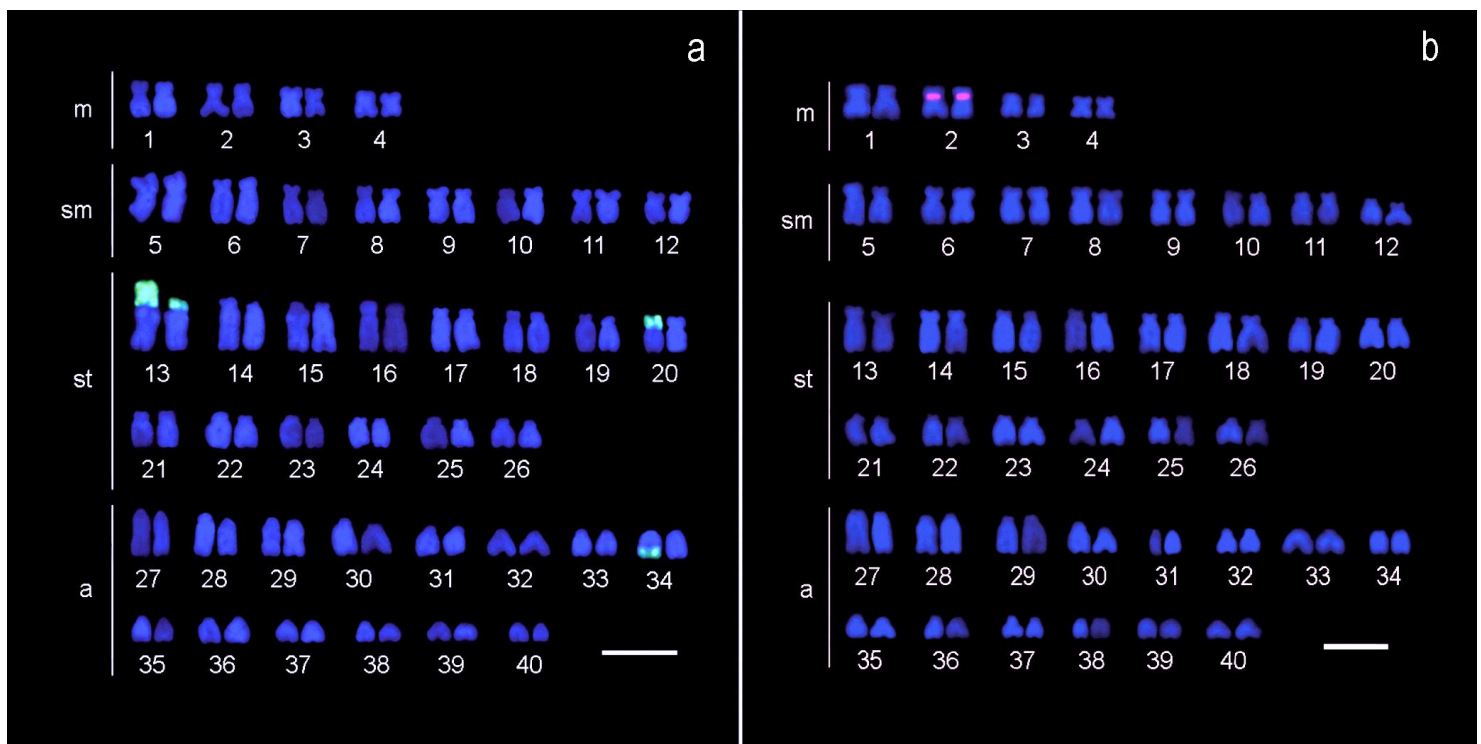
**Figuras (Capítulo 1)**



**Figura 1.** Cariótipo de *Hypostomus iheringii* corado com Giemsa (a) e tratado pelo bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos. Barra = 5  $\mu$ m.

| individuos<br>pares | 1 ♀ | 2 ♀ | 3 ♀ | 4 ♀ | 5 ♂ | 6 ♂ | 7 ♂ | 8 ♂ | 9 ♂ |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 5                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

**Figura 2.** Polimorfismo heterocromático acentuado nos pares cromossômicos 1 e 5 de *H. iheringii*.



**Figura 3.** Cariótipos de *Hypostomus iheringii* submetidos à FISH usando sonda de rDNA 18S (a) e rDNA 5S (b). Barras = 5  $\mu$ m.



## 6.2. CAPÍTULO 2

### **Diversidade cromossômica em *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) com ênfase no mapeamento físico de sítios de rDNAs 18S e 5S**

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

## Resumo

O presente estudo teve como objetivo analisar espécies do gênero *Hypostomus* buscando contribuir para a compreensão da evolução cariotípica do grupo, especialmente em relação à localização física dos genes ribossomais 18S e 5S. Espécimes de *Hypostomus ancistroides* e *Hypostomus nigromaculatus* apresentaram diferenças nas fórmulas cariotípicas, distribuição e localização de regiões heterocromáticas e das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) quando comparadas com outras populações das mesmas espécies. A primeira caracterização citogenética de *Hypostomus tapijara*, espécie aparentemente endêmica do rio Ribeira de Iguape, demonstrou que tais espécimes possuem  $2n = 66$  cromossomos, enquanto que *H. ancistroides* apresentou  $2n = 68$  e *H. nigromaculatus*  $2n = 76$  cromossomos. O mapeamento físico dos genes de rDNA 18S e 5S para as três espécies analisadas demonstrou a ocorrência de sítios simples, múltiplos e sintênicos. A sintenia dos genes ribossomais foi verificada em *H. ancistroides* e *H. tapijara*, sendo verificado um padrão de sobreposição entre estes sítios em todos os cromossomos portadores desta condição. O gênero *Hypostomus* apresenta elevada complexidade cromossômica, a qual é acompanhada por intensa variação morfológica. Desta maneira, torna-se evidente que o grupo compreende um interessante modelo de evolução cromossômica para a ictiofauna neotropical.

**Palavras-chave:** evolução cromossômica, fiber-FISH, Hypostominae, peixes.

## **Abstract**

The present study aimed at analyzing species of genus *Hypostomus*, in order to contribute to the understanding of the karyotype evolution of the group, especially regarding the physical location of 18S and 5S ribosomal genes. Specimens of *Hypostomus ancistroides* and *Hypostomus nigromaculatus* displayed differences in karyotype formulas, distribution and location of heterochromatin and nucleolus organizer regions (NORs) when compared to other populations of the same species. The first cytogenetic characterization of *Hypostomus tapijara*, an apparently endemic species to the Ribeira de Iguape River, showed that these specimens have  $2n = 66$  chromosomes, while *H. ancistroides* showed  $2n = 68$  and *H. nigromaculatus*  $2n = 76$  chromosomes. The physical mapping of 18S and 5S rDNA sites for the three analyzed species showed simple, multiple and syntenic clusters. The synteny of ribosomal sites was noticed in *H. ancistroides* and *H. tapijara* and it was observed an interspersed pattern between these sites in all chromosomes bearing of this condition. The genus *Hypostomus* has a high chromosome complexity that is accompanied by a great morphology variation. It is evident that this group comprises an interesting model in the chromosome evolution of neotropical ichthyofauna.

**Keywords:** chromosome evolution, fiber-FISH, fish, Hypostominae.

## Introdução

Em eucariotos, os genes ribossomais compreendem duas famílias gênicas distintas, compostas por repetições organizadas em *tandem*. O rDNA maior (45S), região responsável pela organização do nucléolo, engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são separados por espaçadores internos e externos e rodeados por espaçadores não-transcritos. Por sua vez, o rDNA menor é composto pela família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S (Long & Dawid, 1980). Em função da aparente conservação molecular dos sítios ribossomais entre grupos de organismos relacionados, tais sequências representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos.

Em peixes, inicialmente, apenas os sítios do rDNA 45S ativos na intérfase precedente eram identificados através da impregnação por nitrato de prata – Ag-NOR (Miller *et al.*, 1976). Entretanto, com o advento da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), todos os sítios dos rDNAs maior e menor passaram a ser localizados. Atualmente, variações da FISH com maior grau de resolução vêm sendo aplicadas em diversos grupos de organismos (Guerra, 2004). Dentre estas técnicas, destaca-se a hibridização em fibra cromatínica distendida (fiber-FISH), que, apesar de ainda não estar difundida em estudos citogenéticos em peixes, corresponde a uma ferramenta com grande potencial para auxiliar em diversos tipos de estudos (Barros *et al.*, 2011), como é verificado para outras classes de organismos (Heiskanen *et al.*, 1995; Fransz *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1998; Adawy *et al.*, 2002; Iafrate *et al.*, 2004; Lavania *et al.*, 2005; Muñoz-Pajares *et al.*, 2011).

Dentre os peixes, a família Loricariidae compreende os animais popularmente conhecidos como cascudos. De acordo com Reis *et al.* (2006), este grupo encontra-se subdividido em seis subfamílias: Loricariinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Neoplecostominae, Lithogeneinae e Delturinae. Em Hypostominae, o número diplóide varia de  $2n = 34$  em *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Mariotto *et al.*, 2011) a  $2n = 84$  em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008). A maioria dos estudos citogenéticos indica uma grande variabilidade em vários caracteres cromossômicos, contudo

análises moleculares de mapeamento físico de genes ribossômicos são encontradas apenas em algumas espécies (Kavalco *et al.*, 2004; 2005; Centofante *et al.*, 2006; Mariotto *et al.*, 2009; 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Bitencourt *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2012; Ziemniczak *et al.*, 2012).

Considerando a importância de genes ribossomais em estudos de evolução cariotípica e a incipiente literatura relacionada ao mapeamento físico destes genes em Hypostominae, o presente trabalho teve por objetivo analisar através de metodologias clássicas (coloração convencional com Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de prata) e moleculares (mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S e 5S em cromossomos metafásicos e em fibras cromatínicas distendidas) as espécies *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911), *Hypostomus nigromaculatus* (Schubart, 1964) e *Hypostomus tapijara* Oyakawa, Akama & Zanata, 2005, com o intuito de contribuir para o entendimento da evolução cariotípica do gênero *Hypostomus*, particularmente no que se refere à localização física dos genes ribossomais 5S e 18S.

## **Materiais e Métodos**

Análises citogenéticas clássicas e moleculares foram realizadas em exemplares de *H. ancistroides* (11 fêmeas e 10 machos) e *H. nigromaculatus* (13 fêmeas e 13 machos) coletados no córrego da Lapa, Ipeúna, São Paulo, Brasil e espécimes de *H. tapijara* (26 fêmeas e 14 machos) coletados no rio Ribeira de Iguape, Registro, São Paulo, Brasil. Os exemplares foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, com os registros MZUSP 110802, MZUSP 110801 e MZUSP 109785, respectivamente.

Foram obtidas suspensões celulares de porções do rim anterior dos animais, de acordo com Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993). Os cromossomos mitóticos metafásicos foram corados com Giemsa 5% e organizados em quatro classes morfológicas: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a) (Levan *et al.*, 1964). O padrão de distribuição

heterocromática foi determinado segundo protocolo descrito por Sumner (1972), com modificações na etapa de coloração (Lui *et al.*, 2009). As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram identificadas através da técnica de impregnação por nitrato de prata, descrita por Howell & Black (1980). A preparação de lâminas com fibras cromatínicas distendidas foram obtidas segundo os protocolos descritos por Fidlerova *et al.* (1994) e Muñoz-Pajares *et al.* (2011), com adaptações (Barros *et al.*, 2011).

O mapeamento físico dos sítios de rDNAs 18S e 5S foi desenvolvido de acordo com Pinkel *et al.* (1986) e utilizou sondas obtidas de *Prochilodus argenteus* Spix and Agassiz, 1829 (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850 (Martins & Galetti Jr., 1999), respectivamente. A sonda de rDNA 18S foi marcada com biotina-16-dUTP e a de 5S rDNA com digoxigenina-11-dUTP, através de *nick translation*, de acordo com as instruções do fabricante (Roche Applied Science). Todos os processos de hibridização foram realizados sob alta condição de estringência - 77% (200ng de cada sonda, 50% de formamina, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 - 7,2, a 37 °C, “overnight”). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas por 20 minutos em solução de 15% formamida/0,2xSSC a 42°C, 0,1xSSC a 60°C por 15 minutos e 4xSSC /0,05% Tween por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo esta última constituída por duas lavagens de 5 minutos. A detecção do sinal foi realizada utilizando avidina-FITC (Sigma) para a sonda de rDNA 18S; e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) para a sonda de rDNA 5S. Os cromossomos foram analisados em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) acoplado a um sistema de captura de imagem (Olympus DP72).

## Resultados

### *Hypostomus ancistroides*

Todos os exemplares de *H. ancistroides* analisados apresentaram  $2n = 68$  cromossomos (14m + 16sm + 22st + 16a), NF = 120 (Fig. 1a). A impregnação por nitrato de prata evidenciou a presença de NORs múltiplas, alocadas na região terminal do braço curto dos pares cromossômicos 8, 13 e 15 (Fig. 1b, em destaque). Através do bandamento C foi observada a presença de pouca heterocromatina, distribuída em regiões terminais e centroméricas de vários cromossomos do complemento (Fig. 1b). No par cromossômico 15 foi evidenciada sobreposição entre sítios heterocromáticos e a região organizadora de nucléolo (Fig. 1b). A hibridização *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S confirmou o resultado obtido através da impregnação por nitrato de prata, contudo, apenas um cromossomo do par 15 mostrou-se marcado (Fig. 2a). Foram encontrados três pares cromossômicos portadores dos sítios de rDNA 5S: o par 2, com marcação intersticial no braço curto, e os pares 8 e 13, os quais apresentam condição sintênica com o sítio de rDNA 18S (Fig. 2a). O mapeamento físico desses genes em fibra cromatínica distendida revelou que os cístrons de rDNA 18S e 5S apresentavam-se intercalados nos cromossomos portadores de sintenia (pares 8 e 13) (Figs. 3c, 3f). Nesta análise, foram encontradas fibras portadoras de apenas um destes sítios (Fig. 3a, 3b, 3d, 3e), as quais correspondem aos cromossomos com apenas um tipo de rDNA, e fibras portando ambos os sítios intercalados (Fig. 3c, 3f).

### *Hypostomus nigromaculatus*

Em *H. nigromaculatus*, o número diploide obtido foi 76 cromossomos (12m + 22sm + 30st + 12a), com NF = 140 (Fig. 1c). A aplicação da técnica de Ag-NOR demonstrou a existência de regiões organizadoras de nucléolo simples, alocadas na porção terminal do braço longo do par acrocêntrico 33 (Fig. 1d, em destaque). A heterocromatina foi localizada em porções terminais e centroméricas de poucos pares cromossômicos, sendo evidenciada sobreposição entre sítios

heterocromáticos e as NORs (Fig. 1d). A FISH com sonda de rDNA 18S confirmou o resultado obtido pela impregnação por nitrato de prata, exibindo marcação apenas no par 33 (Fig. 2b). Foi evidenciada a ocorrência de apenas um cístron de rDNA 5S nesta espécie, o qual se localizava na porção intersticial do braço curto de apenas um par cromossômico metacêntrico, o par 2 (Fig. 2b).

### ***Hypostomus tapijara***

Os exemplares de *H. tapijara* apresentaram número diploide igual a 66 cromossomos (14m + 24sm + 14st + 14a), com NF = 118 (Fig. 1e). A impregnação por nitrato de prata evidenciou a presença de NORs ativas nas porções terminais no braço curto do par cromossômico metacêntrico 4 e no braço longo do par acrocêntrico 29 (Fig. 1f, em destaque). Poucos blocos heterocromáticos foram evidenciados através do bandamento C, sendo mais proeminentes aqueles intercalares as Ag-NORs (Fig. 1f). A hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S e 5S mostrou a existência de sintenia destes sítios na porção terminal do braço curto dos pares cromossômicos 4 e 10 (Fig. 2c). Foram verificadas também marcações de rDNA 18S na porção final do braço longo do par 29, e marcações de rDNA 5S na porção intersticial do braço curto do par 2 e porção intersticial do braço longo do par 31 (Fig. 2c). A fiber-FISH evidenciou resultado semelhante ao obtido para *H. ancistroides*, sendo encontradas fibras portadoras de apenas um dos sítios ribossomais (Fig. 3g, 3h, 3j, 3k) ou de ambos os sítios sobrepostos (Figs. 3i, 3l).

### **Discussão**

*Hypostomus* representa o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros (Britski, 1972), sendo amplamente distribuído na América do Sul e ocorrendo em uma grande variedade de ecossistemas dulcícolas (Oyakawa *et al.*, 2005). Dentre os Hypostominae, *Hypostomus* encontra-se entre os gêneros com maior número de estudos citogenéticos, contudo, uma vasta diversidade neste grupo mantém-se inexplorada (Rubert *et al.*, 2011). Dentre as espécies analisadas no presente



trabalho, a caracterização de *H. tapijara* (espécie aparentemente endêmica da bacia do Ribeira de Iguape) compreende os primeiros dados cromossômicos da espécie e, desta forma, enfatiza o fato de que um grande número de espécies de *Hypostomus* ainda não foi explorado através de análises cromossômicas.

Este gênero é conhecido por apresentar uma ampla variação cromossômica (Artoni & Bertollo, 2001; Mendes Neto *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012), com número diploide variando de  $2n = 54$  observado em *Hypostomus plecostomus* Linnaeus 1758 (Muramoto *et al.*, 1968) a  $2n = 84$  identificado em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008). Artoni & Bertollo (2001) consideraram  $2n = 54$  cromossomos como putativa condição primitiva em Loricariidae, sendo que rearranjos do tipo fissões cêntricas levariam ao aumento do número diploide observado em várias espécies do grupo. De fato, todas as espécies de *Hypostomus* caracterizadas até o presente momento apresentam número diploide igual ou superior a 54 cromossomos (Bueno *et al.*, 2012). As três espécies estudadas no presente trabalho apresentam número diplóide superior a 54 cromossomos (*H. ancistroides* com  $2n = 68$ , *H. nigromaculatus* com  $2n = 76$ , e *H. tapijara* com  $2n=66$ ), o que corrobora esses sucessivos eventos de fissões cêntricas, os quais devem ser responsáveis pela diversificação cromossômica do gênero.

Variações cariotípicas com manutenção do número diploide entre distintas populações da mesma espécie são comuns em *Hypostomus* (Michele *et al.*, 1977; Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Mendes Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011). Entre as três espécies deste trabalho, verifica-se tal situação para *H. ancistroides* e *H. nigromaculatus*, as quais apresentam ampla distribuição na bacia do alto rio Paraná. Todas as populações de *H. ancistroides* e *H. nigromaculatus* anteriormente estudadas apresentaram respectivamente, número diploide igual a 68 cromossomos (Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Rubert *et al.*, 2011) e 76 cromossomos (Rubert *et al.*, 2008). Segundo Bueno *et al.* (2012), além das fissões cêntricas, inversões pericêntricas e

paracêntricas também apresentam um importante papel na diversificação cariotípica de *Hypostomus*, o que poderia explicar tais diferenças populacionais.

Os sítios ribossomais representam importantes marcadores citotaxonômicos e evolutivos no entendimento da diferenciação cromossômica de peixes. De acordo com Alves *et al.* (2006), NORs múltiplas em posição terminal são comuns entre as espécies de *Hypostomus*, entretanto, a condição de NORs simples também ocorre em algumas espécies do gênero. No presente trabalho, *H. tapijara* e *H. ancistroides* apresentaram NORs múltiplas, enquanto *H. nigromaculatus* apresentou NORs simples. Desta maneira, torna-se evidente a variabilidade deste caráter no grupo, enfatizando a diversificação cromossômica recorrente no grupo. No gênero *Hypostomus*, são observadas variações no padrão heterocromático exibido por distintas espécies, como mostrado neste estudo nas três espécies analisadas. Segmentos heterocromáticos intercalados ou adjacentes com os sítios ribossomais são frequentes entre os peixes neotropicais, conforme verificado para as três populações analisadas, fato este que provavelmente possibilita a dispersão dos sítios de NORs pelo genoma (Moreira-Filho *et al.*, 1984; Vicari *et al.*, 2008).

O advento da FISH possibilitou a confirmação da evidente variação nos sítios de rDNA 18S apresentada pelas espécies de *Hypostomus*, bem como a identificação da diversidade de número e localização dos sítios de rDNA 5S (Kavalco *et al.*, 2004; 2005; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Bitencourt *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2012). Em *Hypostomus*, é recorrente a inexistência de marcação pela FISH em todos os cromossomos dos pares portadores dos sítios de rDNA 18S e 5S. Tal condição, verificada para o sítio de rDNA 18S do par 15 de *H. ancistroides* (presente análise), foi previamente identificada em *H. regani* (Mendes-Neto *et al.*, 2011) e *H. iheringii* (Traldi *et al.*, 2012) e, possivelmente, ocorra em função da limitada sensibilidade da técnica a sítios muito pequenos (Schwarzacher & Heslop-Harrison, 2000). Aparentemente, o sítio intersticial de rDNA 5S presente num par cromossômico metacêntrico é constante nas espécies de *Hypostomus*, conforme verificado em *H. regani* (Mendes-Neto *et al.*, 2011), *H. iheringii* (Traldi *et al.*, 2012), *H. ancistroides*, *H.*

*nigromaculatus* e *H. tapijara* (presente trabalho). Desta forma, é possível que tal sítio represente uma condição primitiva dentro do gênero.

Em peixes, a disposição dos sítios ribossomais em cromossomos distintos é a situação mais comumente encontrada (Lui *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011). De acordo com Martins & Galetti Jr. (1999), tal condição poderia apresentar alguma vantagem em relação à disposição sintênica. Conversão gênica e *crossing-over* desigual são mecanismos com passível ocorrência em arranjos sintênicos de sítios de rDNA 18S e 5S e, desta forma, a localização destes genes em distintos cromossomos evitaria possíveis rearranjos desfavoráveis (Dover, 1986). Contudo, vários grupos de peixes portam os genes ribossomais maior e menor em um mesmo cromossomo. São verificados casos com sítios co-localizados, adjacentes e distantes. Os casos de sintenia entre genes ribossomais em pares cromossômicos metacêntricos/submetacêntricos de *H. ancistroides* e *H. tapijara* constituem os primeiros relatos desta condição para o gênero. A análise da fibra cromatínica distendida nestas espécies permitiu a observação de que tais genes encontram-se intercalados nos cromossomos portadores de sintenia. Em eucariotos, a transcrição do rDNA 18S é realizada pela RNA polimerase I, enquanto que o rDNA 5S é transcrito pela RNA polimerase III (Sumner, 2003; Snustad, 2006). Considerando a atividade transcricional dos sítios de rDNA 18S nos sítios sintênicos identificada pela impregnação por nitrato de prata, e o possível impedimento físico existente entre a atuação das distintas maquinarias de transcrição num mesmo segmento cromossômico, é possível que os sítios de rDNA 5S encontrados co-localizados com o rDNA 18S tratam-se de pseudogenes. Entretanto, no par 10 de *H. tapijara*, não foram verificadas marcas através da impregnação por nitrato de prata e, desta forma, não se faz possível especular sobre a condição funcional dos genes ribossomais neste par cromossômico.

Em Loricariidae, a maioria das espécies analisadas exhibe cromossomos distintos como portadores dos sítios ribossomais (Mariotto *et al.*, 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2012; Ziemniczak *et al.*, 2012). Situações sintênicas destes genes observadas em *H. ancistroides* e *H.*

*tapijara* do presente trabalho foram evidenciadas também em espécies das subfamílias Neoplecostominae e Hypoptopomatinae (Ziemniczak *et al.*, 2012), Hypostominae – tribo Ancistrini (Mariotto *et al.*, 2011) e Loricariiane (Kavalco *et al.*, 2004; Centofante *et al.*, 2006). Tal arranjo foi considerado como provável condição primitiva da família ao ser detectado também no grupo externo Trichomycteridae (Ziemniczak *et al.*, 2012). Desta maneira, é possível que a sintenia encontrada em *H. ancistroides* e *H. tapijara* seja um resquício dessa condição primitiva, enquanto que em *H. nigromaculatus* rearranjos cromossômicos devem ter propiciado o surgimento de uma condição derivada. Contudo, vale ressaltar a ocorrência de diferenças entre o arranjo sintênico evidenciado para *H. ancistroides* e *H. tapijara* e para as subfamílias Neoplecostominae e Hypoptopomatinae (Ziemniczak *et al.*, 2012) e família Trichomycteridae (Ziemniczak *et al.*, 2012). No presente trabalho, os sítios ribossomais exibiram padrão de sobreposição, enquanto que para as demais espécies foi encontrado um padrão de adjacência entre tais sítios. Considerando como primitiva a condição de sítios adjacentes, o padrão exibido por *Hypostomus* pode ser decorrente de conversões gênicas e crossing desiguais (Dover, 1986). Entretanto, a possível atuação de inversões paracêntricas nestas porções cromossômicas não pode ser descartada.

Dentre os Loricariidae, *Hypostomus* é considerado um gênero derivado. Estudos cromossômicos têm identificado a existência de grande variação cariotípica no grupo, a qual vai desde a exibição de caracteres derivados, como a recorrência de números diploides elevados e NORs múltiplas, até a manutenção de características primitivas, como a sintenia dos genes ribossomais, características estas aqui representadas em *H. ancistroides* e *H. tapijara*. Desta maneira, torna-se evidente a complexidade cromossômica deste gênero, a qual é acompanhada por uma grande variação morfológica, enfatizando o interessante modelo que este gênero pode representar na evolução cromossômica dos peixes neotropicais.

## Agradecimentos

Os autores são gratos ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki e Osvaldo Takeshi Oyakawa (MZUSP) pela identificação dos espécimes, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/MMA – licença 10538-1) pela autorização de coleta, ao Pedro Luis Gallo e Luiz Henrique da Silva pelo esforço de coleta. Este estudo foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – processo 2010/12789-0), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – processo 0854/2008), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná – processo 22843/2011) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – processo 471898/2010-4).

## Referências

- Adawy, S.S.; El-Itriby, H.A.; Jiang, J. (2002). Physical mapping of knob-related sequences in some maize determined by FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and fiber-FISH. **Arabian Journal of Biotechnology**. 5:237-248.
- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Foresti, F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. 128:1-9.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**. 49:81-90.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**. 134:201-210.

- Barros, A.V.; Sczepanski, T.S.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F. (2011). Fiber-FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**. 322-323:47-50.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. 2:103-120.
- Bitencourt, J.A.; Affonso, P.R.A.M.; Giuliano-Caetano, L.; Carneiro, P.L.S.; Dias, A.L. (2012). Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 11:933-943.
- Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Bertollo, L.A.C.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2010). Karyotypic diversity between alopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. **Neotropical Ichthyology**. 8:361-368.
- Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura, notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura**. São Paulo, FSPUSP e Instituto de Pesca. p.79-108.
- Brunner, R.M.; Goldammer, T.; Fürbass, R.; Vanselow, J.; Schwerin, M. (1998). Genomic organization of the bovine aromatase encoding gene and a homologous pseudogene as revealed by DNA fiber FISH. **Cytogenetic and Cell Genetics**. 82:37-40.
- 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. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:241-250. doi: 10.1007/s11160-011-9215-9.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2006). Cytogenetic characterization and description of XX/X<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 12:320-324.

- Cereali, S.S.; Pomini, E.; Rosa, R.S.; Zawadzki, C.H.; Froenlich, O.; Giluiano-Caetano, L. (2008). Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 7:583-591.
- Dover, G.A. (1986). Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**. 2:159-165.
- Fidlerova, H.; Senger, G.; Kost, M.; Sanseau, P.; Sheer, D. (1994). Two simple procedures for releasing chromatin from routinely fixed cells for fluorescence *in situ* hybridisation. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 65:203-205.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘*in vitro*’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49: 810-813.
- Fransz, P.F.; Alonso-Blanco, C.; Liharska, T.B.; Peeters, A.J.M.; Zabel, P.; Jong, J. H. (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. **The Plant Journal**. 9:421-430.
- Guerra, M. (2004). **FISH – conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244.
- Heiskanen, M.; Hellsten, E.; Kallioniemi, O.; Tomi, P. (1995). Visual Mapping by Fiber-FISH. **Genomics**. 30:31-36.
- 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.
- Iafrate, A.J.; Feuk, L.; Rivera, M.N.; Listewnik, M.L.; Donahoe, P.K.; Qi, Y.; Scherer, S.W.; Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. **Nature Genetics**. 36:949-951.

- 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.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**. 94:180-186.
- Lavania, U.C.; Basu, S.; Srivastava, S.; Mukai, Y.; Lavania, S. (2005). *In situ* chromosomal localization of rDNA sites in “Safed Musli” Chlorophytum Ker-Gawl and their physical measurement by fiber FISH. **Journal of Heredity**. 96:155-160.
- Levan, A., Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.
- Long, E.O.; Dawid, I.D. (1980). Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**. 49:727-764.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**. 40:552-559.
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Miyazawa, C.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2009). Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**. 7:595-600.
- Mariotto, S.; Centofante, L. Vicari, M.R.; Artoni, R.A.; Moreira-Filho, O. (2011). Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**. 5:289-300.
- Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Traldi, J.B.; Silva, L.F.; Venere, P.C.; Souza, I.L.; Moreira-Filho, O. (2011). Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. **Caryologia**. 64:121-128.



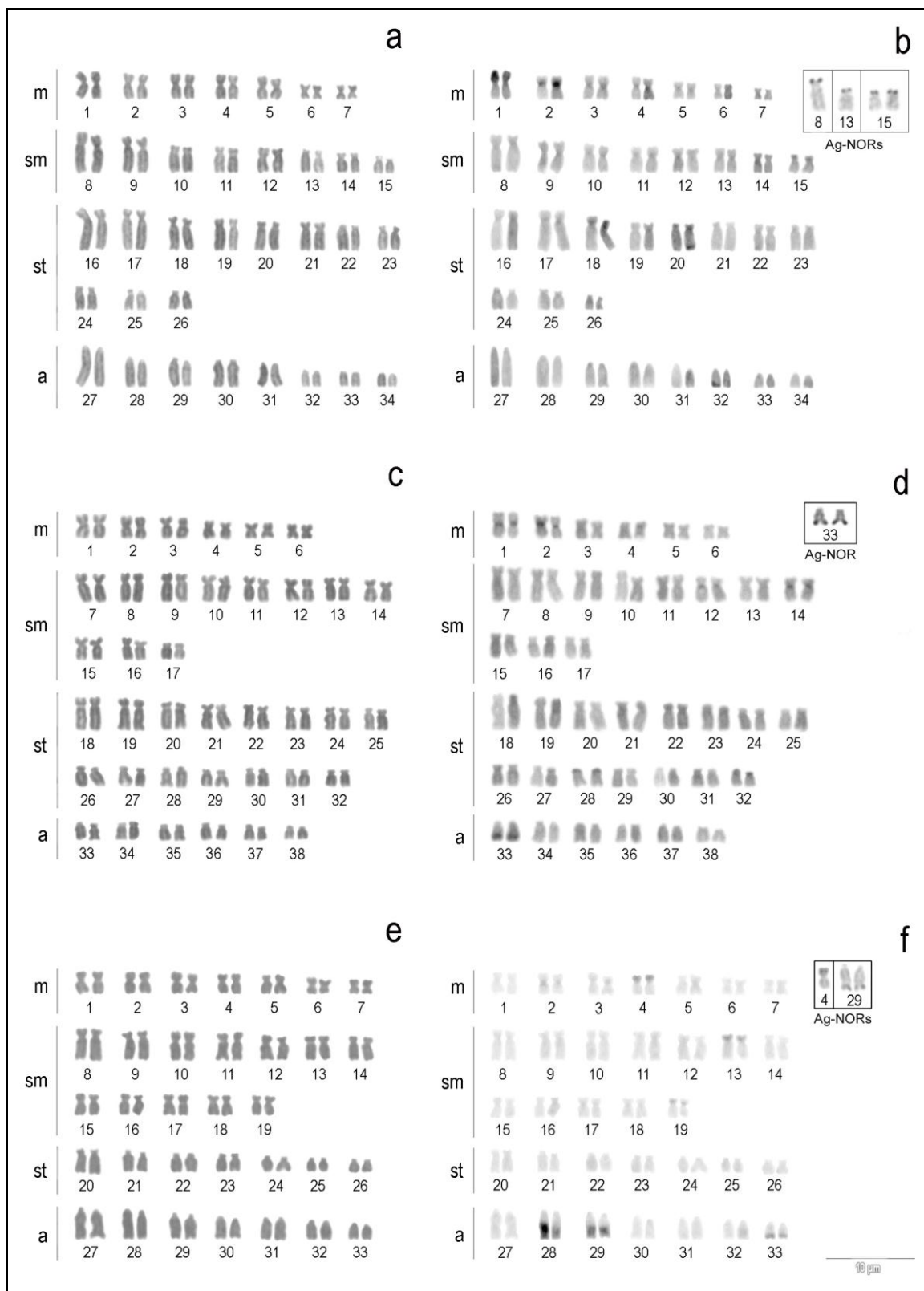
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.
- Mendes-Neto, E.O.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2011). Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**. 5:133-142.
- Michele, J.L.; Takahashi, C.S.; Ferrari, I. (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**. 42:539-546.
- Miller, D.A.; Dev, V.G.; Tantravashi, R.; Miller, O.J. (1976). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**. 101:235-243.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**. 26:564-568.
- Muñoz-Pajares, A.J.; Martínez-Rodríguez, L.; Teruel, M.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M.; Perfectti, F. (2011). A Single, Recent Origin of the Accessory B chromosome of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genetics**. 187:853-863.
- Muramoto, I.; Ohno, S.; Atkin, N.B. (1968). On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**. 24:59-66.
- Oyakawa, O.T.; Akama, A.; Zanata, A.M. (2005). Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**. 921:1-27.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States**. 83:2934-2938.

- 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**. 147:227-299.
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:739-749. doi: 10.1007/s11160-011-9250-6.
- Rubert, M.; Zawadzki, C.H.; Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. 6:93-100.
- Rubert, M.; Rosa, R.; Jerep, F.C.; Bertollo, L.A.C.; Giulino-Caetano, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**. 5:397-410.
- Schwarzacher, T.; Heslop-Harrison, P. (2000). **Practical In Situ Hybridization**. Oxford, BIOS Scientific Publishers.
- Snustad, P.; Simmons, M. J. (2006). **Principles of genetics**. New York: Wiley.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75:304-306.
- Sumner, A.T. (2003). **Chromosomes: organization and function**. London, Blackwell Publishing.
- Traldi, J. 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. **Comparative Cytogenetics**. 6(2):115-125.

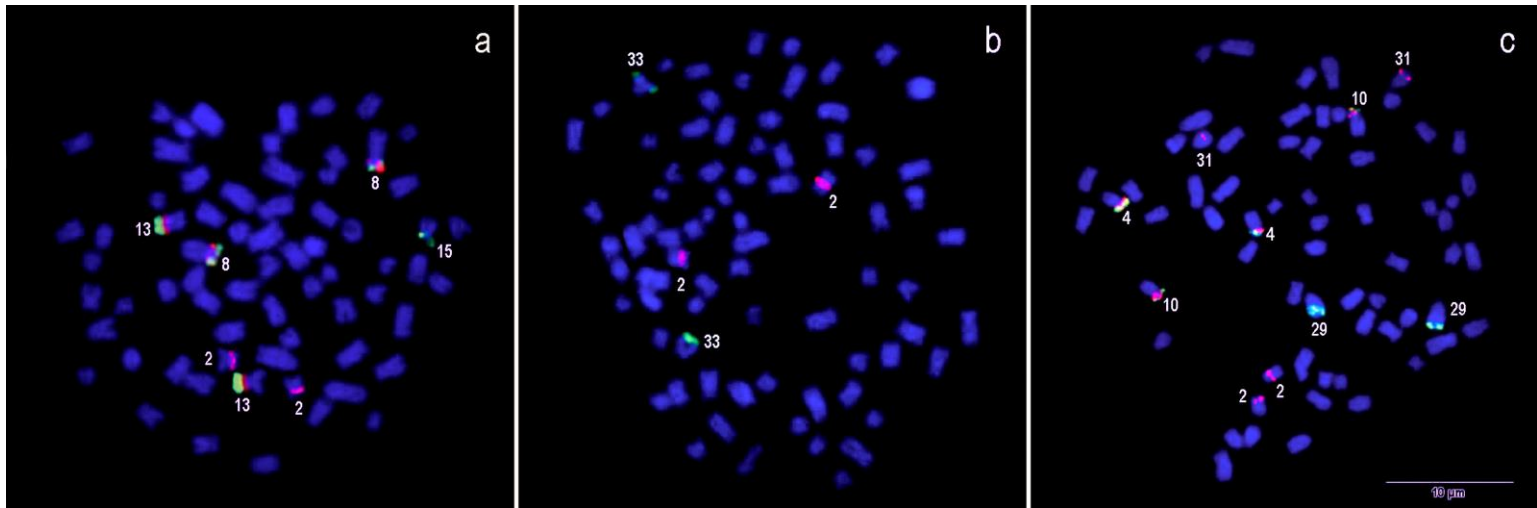
Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeiroensis*. **Cytogenetic and Genome Research**. 122:67-72.

Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Rosa, K.O.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**. doi: 10.1080/11250003.2012.676677.

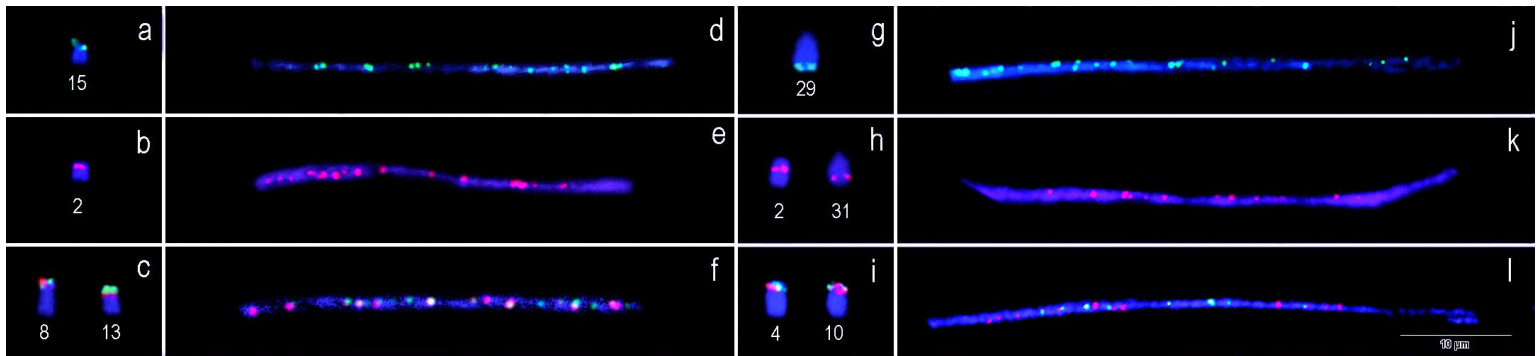
**Figuras (Capítulo 2)**



**Figura 1.** Cariótipos de *Hypostomus ancistroides* (a, b), *Hypostomus nigromaculatus* (c, d) e *Hypostomus tapijara* (e, f) com coloração convencional com Giemsa (a, c, e) e bandamento C (b, d, f). Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos.



**Figura 2.** Metáfases de *Hypostomus ancistroides* (a), *Hypostomus nigromaculatus* (b) e *Hypostomus tapijara* (c) submetidas à dupla-FISH com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Os números representam os pares cromossômicos portadores dos sítios ribossomais.



**Figura 3.** Cromossomos mitóticos (a, b, c, g, h, i) e fibras cromatínicas distendidas (d, e, f, j, k, l) de *Hypostomus ancistroides* (a, b, c, d, f) e *Hypostomus tapijara* (g, h, i, j, k, l) submetidos à dupla-FISH com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Os números representam os pares cromossômicos portadores dos sítios ribossomais.

### 6.3. CAPÍTULO 3

## Mapeamento físico de sequências (GATA)<sub>n</sub> e (TTAGGG)<sub>n</sub> em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae)

Artigo em preparação

## Resumo

*Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae, Hypotomini) constitui um dos gêneros mais especiosos e de ampla distribuição entre os peixes da região Neotropical. Este grupo mostra alta variação intra e interespecificamente do ponto de vista cromossômico. Os Hypostomini apresentam tendência de aumento do  $2n$  a partir de 54 cromossomos, considerados basal para Loricariidae. DNAs satélites e sequências teloméricas representam classes de DNAs repetitivos organizados em *tandem* que têm se tornado cada vez mais importantes nos estudos citogenéticos, já que se mostram resolutivos para problemas taxonômicos e evolutivos entre espécies relacionadas, e podem fornecer informações sobre o status evolutivo das espécies. Neste estudo, foram mapeadas cromossomicamente as sequências  $(GATA)_n$  e  $(TTAGGG)_n$  em quatro espécies de *Hypostomus* (*H. ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara*) com objetivo de contribuir para um melhor entendimento da diversificação cromossômica de Loricariidae. A sequência  $(GATA)_n$  foi localizada de maneira dispersa nos cromossomos, formando pequenos blocos em regiões intersticiais e terminais nas quatro espécies avaliadas. A sonda telomérica geral dos vertebrados  $(TTAGGG)_n$  foi localizada em todos os sítios terminais dos cromossomos. Foi verificada a presença de um sítio telomérico intersticial (ITS) na região proximal de um cromossomo submetacêntrico na espécie *Hypostomus iheringii*. Desta forma, são discutidos o papel das sequências  $(GATA)_n$  e  $(TTAGGG)_n$  na diversificação cromossômica de *Hypostomus* e a possível instabilidade cromossômica gerada pelas fissões cêntricas e presença de ITS na história evolutiva do grupo.

**Palavras-chave:** diversificação cromossômica, elementos repetitivos, Hypostominae.

## Abstract

*Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae, Hypotomini) is one of the most specious and widely distributed genera among fishes of Neotropical region. This group is intra and interspecific highly diverse from the chromosomal viewpoint. The Hypostomini shows a trend of increasing of diploid number from 54 chromosomes which is considered basal to Loricariidae. Satellite DNAs and telomeric sequence are classes of repetitive DNA arranged in *tandem* that have become increasingly important to the resolution of taxonomic and evolutionary problems among related species and may provide information about evolutionary status of the species. In this study, it was chromosomally mapped the (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in four species of the genus *Hypostomus* (*H. ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* and *H. tapijara*) in order to contribute to a better understanding of the chromosomal diversification of the Loricariidae. The (GATA)<sub>n</sub> sequence exhibited a dispersed pattern over several chromosomes, with small blocks in interstitial and terminal portions in the four species analyzed. The telomeric probe was located in all terminal sites of the chromosomes and in an interstitial site (ITS) in the proximal region of a submetacentric pair in the species *Hypostomus iheringii*. This way, it was discussed the role of repetitive DNAs, as (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences, in the chromosomal diversification of *Hypostomus*, and the presence of ITS in the evolutionary history of the group.

**Keywords:** chromosomic diversification, Hypostominae, repetitive elements.



## Introdução

A ordem Siluriformes corresponde ao grupo com maior número de espécies e mais ampla distribuição entre os clados pertencentes aos Ostariophysii, possuindo 3.093 espécies, 478 gêneros e 36 famílias (Ferraris Jr., 2007). É constituída por animais com hábitos sedentários, e geralmente, migração limitada (Britski, 1991).

Loricariidae é a segunda família de peixes mais numerosa, com 834 espécies reconhecidas, alocadas em cerca de 100 gêneros (Eschmeyer & Fricke, 2012). Popularmente conhecidas como cascudos, as espécies pertencentes a este grupo apresentam corpo recoberto por placas ósseas e boca ventral em forma de ventosa. Representam animais endêmicos da região Neotropical, distribuídos da Costa Rica até o sul da Argentina (Weber, 2003).

*Hypostomus* constitui um dos gêneros mais especiosos e de larga distribuição entre os peixes da América do Sul (Isbrucker, 1980). É o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros (Britski, 1972). Citogeneticamente, as espécies deste grupo apresentam ampla diversificação, com variação do número diploide (2n) de 54 cromossomos, evidenciado em *Hypostomus plecostomus* (Muramoto *et al.*, 1968) a 84 cromossomos, verificado em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008). Neste grupo, a fórmula cariotípica, a distribuição heterocromática e a localização dos genes ribossomais são importantes marcadores cromossômicos evolutivos intra e interespecíficos (Artoni & Bertollo, 1996; 1999; Rubert *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2012).

O genoma dos eucariotos é constituído por uma grande parte de DNAs repetitivos, os quais podem estar organizados em *tandem* ou dispersos (Charlesworth *et al.*, 1994). DNAs satélites e sequências teloméricas representam classes de DNAs repetitivos organizados em *tandem* que têm se tornado cada vez mais importantes nos estudos citogenéticos. De acordo Wichman *et al.* (1991), DNAs satélites divergem rapidamente durante a evolução e, desta forma, tornam-se importantes para a resolução de problemas taxonômicos e evolutivos entre espécies relacionadas (Arnason *et al.*, 1992).

Meyne *et al.* (1990), analisando a distribuição de sequências teloméricas em mais de 100 espécies de vertebrados, sugeriram que sítios teloméricos terminais e intersticiais podem fornecer informações sobre o status evolutivos das espécies. Estudos de sequências teloméricas em peixes têm sido realizados com diversos objetivos (Chew *et al.*, 2002; Jacobina *et al.*, 2011). Em Loricariinae a utilização da sequência (TTAGGG)<sub>n</sub> tem contribuído na detecção de fusões cromossômicas e entendimento da ampla variação numérica e estrutural do grupo (Rosa *et al.*, 2012).

Considerando a grande diversificação cromossômica do gênero *Hypostomus* nos rios brasileiros e a eficiência da análise de sequências repetitivas em estudos cromossômicos, este trabalho teve por objetivo avaliar a dinâmica das sequências (GATA)<sub>n</sub> e (TTAGGG)<sub>n</sub> nos genomas de quatro espécies de *Hypostomus* e contribuir para um melhor entendimento da ampla diversificação cromossômica no grupo.

## **Materiais e Métodos**

Foram analisados espécimes de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (11 fêmeas e 10 machos); *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908) (10 fêmeas e 11 machos) e *Hypostomus nigromaculatus* (Schubart, 1964) (13 fêmeas e 13 machos) provenientes do córrego da Lapa, Ipeúna, São Paulo, Brasil, e exemplares de *Hypostomus tapijara* Oyakawa, Akama & Zanata, 2005 (26 fêmeas e 14 machos) provenientes do rio Ribeira de Iguape, Registro, São Paulo, Brasil. Os exemplares foram identificados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) sob os registros MZUSP 110802, MZUSP 106769, MZUSP 110801 e MZUSP 109785, respectivamente.

As preparações cromossômicas mitóticas foram realizadas de acordo com Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993). Foram utilizadas sondas (GATA)<sub>n</sub> e (TTAGGG)<sub>n</sub>, as quais foram obtidas através de reações de PCR realizadas com biotina-11-dUTP (Roche Applied Science) na ausência de moldes de DNA. Para a amplificação destas sequências repetitivas foram utilizados os

primers (GATA)<sub>7</sub>/(TATC)<sub>7</sub> e (TTAGGG)<sub>5</sub>/(CCCTAA)<sub>5</sub> (Ijdo *et al.*, 1991). O mix das reações de PCR foi composto por 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 40µM de dCTP, dATP e dGTP; 28µM de dTTP; 12µM de biotina-11-dUTP (Roche Applied Science); 100µM de cada primer e 2U de Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições do ciclo de PCR foram 94°C/5 minutos, 9 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/30 segundos, 72°C/1 minuto; 29 ciclos de 94°C/1 minuto, 60°C/30 segundos, 72°C/90 segundos; com extensão final de 72°C/5 minutos.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), sob alta condição de estringência - 77% (200-500ng de DNA sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 - 7,2, a 37°C overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas duas vezes em 15% formamida/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada e posteriormente foram efetuadas 2 lavagens de 5 minutos cada em 4xSSC/0,05% Tween 20 em temperatura ambiente. As metáfases foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) e as imagens capturadas pelo próprio sistema da câmera (Olympus DP72).

## Resultados

A FISH com sonda (GATA)<sub>n</sub> revelou a presença deste elemento repetitivo disperso pelos cromossomos, formando pequenos acúmulos em porções intersticiais e terminais nas quatro espécies analisadas (Fig. 1a, c, e, g). No entanto, *H. iheringii* exibiu um maior acúmulo desta sequência sobre os cromossomos do complemento (Fig. 1c).

Os sítios teloméricos (TTAGGG)<sub>n</sub> mostraram-se localizados na porção terminal de ambos os braços de todos os pares cromossômicos nas quatro espécies analisadas (Fig. 1b, d, f, h). Somente em *H. iheringii* foram identificados sítios teloméricos intersticiais (ITS), os quais se encontram localizados na região proximal de um par cromossômico submetacêntrico (Fig. 1d).

## Discussão

A sequência (GATA)<sub>n</sub>, descrita como o maior componente do DNA satélite Bkm (Banded Krait Minor), encontra-se amplamente distribuída entre os eucariotos (Singh & Jones, 1982). De acordo com Srivastava *et al.* (2008), repetições GACA/GATA não são encontradas em procariotos, contudo gradualmente acumularam-se durante a evolução dos eucariotos.

Em peixes, são verificados estudos com sequência (GATA)<sub>n</sub> em um número restrito de espécies. *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Cross *et al.*, 2006), *Amphichthys cryptocentrus* (Valenciennes, 1837), *Batrachoides manglae* Cervigón, 1964, *Porichthys plectrodon* Jordan & Gilbert, 1882, *Thalassophryne maculosa* Günther, 1861 (Úbeda-Manzanaro *et al.*, 2010) e apresentam padrão disperso desta sequência por vários cromossomos. Já *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801) possui um bloco mais proeminente no braço longo de um par cromossômico submetacêntrico (Merlo *et al.*, 2007). Nas quatro espécies do gênero *Hypostomus* analisadas no presente trabalho verificou-se um padrão disperso dos sítios (GATA)<sub>n</sub>, sem ocorrência de acúmulos preferenciais em determinados cromossomos. Desta forma, observa-se a recorrência deste padrão disperso da sequência (GATA)<sub>n</sub> nos genomas de peixes. Faz-se importante ressaltar a existência de variação deste padrão disperso em algumas espécies. *P. plectrodon* (Úbeda-Manzanaro *et al.*, 2010) e *H. iheringii* (presente trabalho) apresentam uma maior concentração desta sequência com acúmulos mais diferenciados, enquanto as demais espécies exibem uma menor concentração (Cross *et al.*, 2006; Úbeda-Manzanaro *et al.*, 2010; presente trabalho). Diante dessa ampla localização cromossômica, é possível supor o envolvimento deste DNA satélite na evolução cromossômica dos peixes de maneira geral, bem como na diferenciação cromossômica de *Hypostomus*.

Vários estudos demonstram a existência de associação entre a sequência (GATA)<sub>n</sub> e cromossomos sexuais, bem como a importância desta sequência na evolução destes sistemas (Epplen *et al.*, 1982; Singh *et al.*, 1984; Jones & Singh, 1985). As espécies analisadas no presente estudo não

possuem sistemas de cromossomos sexuais, contudo, apresentaram sítios (GATA)<sub>n</sub> dispersos por vários cromossomos dos cariótipos. É relatada para várias espécies a ocorrência desta sequência em autossomos, com uma maior concentração destes sítios em cromossomos sexuais (Singh *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1984; Arnemann *et al.*, 1986). Entretanto, em *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879, apesar da existência de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW bem definido, sítios (GATA)<sub>n</sub> foram evidenciados apenas nos autossomos (Traut, 1987). Desta maneira, a existência de uma relação direta entre cromossomos sexuais e a sequência (GATA)<sub>n</sub> não é evidente em todos os grupos animais, assim como não foi verificada em nenhuma das quatro espécies de *Hypostomus* analisadas.

Os telômeros (TTAGGG)<sub>n</sub> são definidos como a classe de DNA que constitui a porção terminal de cromossomos lineares, necessários ao processo de replicação e estabilidade cromossômica (Blackburn *et al.*, 1984). Este tipo de sequência constitui importante ferramenta na detecção de rearranjos envolvidos na evolução cromossômica (Meyne *et al.*, 1990). Em peixes, são verificados estudos de mapeamento físico de sítios de (TTAGGG)<sub>n</sub> em várias espécies pertencentes a diferentes famílias. *Oreochromis niloticus* Trewavas, 1983 (Chew *et al.*, 2002); *Salvelinus namaycush* (Walbaum, 1792), *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814), *Salvelinus alpinus* (Richardson, 1836), *Oncorhynchus* spp. (Reed & Phillips, 1995); *Erythrinus erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801) (Cioffi *et al.*, 2010); *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) (Jacobina *et al.*, 2011) e *Rineloricaria lima* (Kner, 1853) (Rosa *et al.*, 2012) representam alguns exemplos.

Neste grupo de animais, semelhantemente a outros vertebrados, regiões de (TTAGGG)<sub>n</sub> também são verificadas em porções cromossômicas intersticiais (Chew *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2012). Segundo Nergadze *et al.* (2004), a relação entre a organização dos telômeros e sua função é clara, contudo a presença de sequências teloméricas em porções cromossômicas intersticiais ainda é pouco entendida.

No presente trabalho, a verificação de marcações teloméricas restritas à porção terminal dos cromossomos em *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara* representa um indicativo de

inexistência de inversões ou translocações cromossômicas na diferenciação cariotípica destas espécies, situação esta coerente com a hipótese evolutiva de Artoni & Bertollo (2001) para o gênero *Hypostomus*. De acordo com tais autores, o processo de evolução cromossômica teria ocorrido principalmente devido a fissões cêntricas e, desta forma, seria esperada a inexistência de segmentos teloméricos intersticiais, especialmente naquelas com números diploides mais baixos próximos a situação basal ( $2n = 54$ ). Contudo, a possibilidade de perda destas sequências após a ocorrência dos rearranjos não pode ser descartada (Nanda *et al.*, 1995; Slijepcevic, 1998; Almeida-Toledo *et al.*, 2000). A presença de ITS num par cromossômico do cariótipo de *H. iheringii* ( $2n = 80$ ) (Traldi *et al.*, 2012) sugere a ocorrência de rearranjos dos tipos fusão, translocação ou inversão na diversificação cromossômica desta espécie. Segundo Bueno *et al.* (2012), rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas apresentaram papel importante na evolução cariotípica do gênero *Hypostomus*.

Por outro lado, mecanismos de fusão cêntrica não podem ser descartados mesmo entre espécies com o  $2n$  elevado. A fissão cêntrica gera sítios cromossômicos instáveis devido à falta de telômeros funcionais nos sítios de quebra e, muitos são os mecanismos para selar estas regiões cromossômicas (Meyne *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 1991; Slijepcevic, 1998; Perry *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2012). Em Loricariinae, Rosa *et al.* (2012) propuseram, baseados na presença de sítios ITS, a ocorrência de fusão cêntrica para selar os sítios instáveis gerados nos cromossomos através de fissão cêntrica durante a história evolutiva do grupo. Nesta hipótese, os sítios cromossômicos instáveis gerados pela fissão cêntrica (Meyne *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 1991; Slijepcevic, 1997; 1998; Perry *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2012) e a instabilidade cromossômica gerada pelos ITS (Bouffler *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1998; Desmaze *et al.*, 1999; Kilburn *et al.*, 2001; Peitl *et al.*, 2002) podem propiciar novos rearranjos cromossômicos. Assim, podem auxiliar no entendimento da ampla variação cromossômica de Loricariidae.

Na família Loricariidae,  $2n = 54$  cromossomos é considerado um caráter basal (Artoni & Bertollo, 2001; Ziemniczak *et al.*, 2012). O número diploide na subfamília Hypostominae apresenta

variação de 34 cromossomos em *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Ancistrini) (Mariotto *et al.*, 2011) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (Hypostomini) (Cereali *et al.*, 2008). No gênero *Hypostomus*, por sua vez, poucas espécies mantêm o número diplóide de 54 cromossomos, demonstrando características cromossômicas altamente diferenciadas daquelas propostas para os grupos basais (Ziemniczak *et al.*, 2012), como verificado para as 4 espécies analisadas no presente trabalho: *H. ancistroides*  $2n = 68$  cromossomos (14m + 16sm + 22st + 16a), NF = 120; *H. iheringii*  $2n = 80$  cromossomos (8m + 16sm + 28st + 28a) NF = 132; *H. nigromaculatus*  $2n = 76$  cromossomos (12m + 22sm + 30st + 12a), NF = 140 e *H. tapijara*  $2n = 66$  cromossomos (14m + 24sm + 14st + 14a), NF = 118 (Traldi *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, *in press*). Desta forma, duas tendências de diversificação cromossômica são apresentadas em Hypostominae: (i) diminuição do número diploide a partir do  $2n = 54$  ancestral principalmente por fusões cêntricas, característica comum aos Ancistrini e; (ii) aumento do  $2n$  devido a fissões cêntricas e outros rearranjos cromossômicos, característica evidenciada no gênero *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 2001; Mariotto *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012; Ziemniczak *et al.*, 2012).

Desta maneira, faz-se evidente o complexo cenário de rearranjos cromossômicos da história evolutiva do gênero *Hypostomus*. Neste contexto, os DNAs repetitivos, como (GATA)<sub>n</sub> e (TTAGGG)<sub>n</sub>, se apresentam como importantes marcadores para o estudo da diversificação cromossômica de peixes neste grupo.

## Referências

Almeida-Toledo, L.F.; Daniel, M.F.Z.; Lopes, C.E.; Toledo-Filho, S.A. (2000). Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system in Gymnotiformes. **Chromosome Research**. 8:355-340.

- Arnason, U., Gretarsdottir, S.; Widegren, B. (1992). Mysticete (baleen whale) relationships based upon the sequence of the common cetacean DNA satellite. **Molecular Biology and Evolution**. 9:1018-1028.
- Arnemann, J.; Jakubiczka, S.; Schmidtke, J.; Schafer, R.; Epplen, J. T. (1986). Clustered GATA repeats (Bkm sequences) on the human Y chromosome. **Human Genetics**. 73:301-303.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution In the genus *Hypostomus*. **Caryologia**. 49(1):81-90.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**. 106:209-214. doi: 10.1023/A:1003957719178
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**. 134:201-210. doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00201.x
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. 2:103-120.
- Blackburn, E.H.; Szostak, J.W. (1984). The molecular structure of centromeres and telomeres. **Annual Review of Biochemistry**. 53:163-194.
- Bouffler, S.; Silver, A.; Papworth, D.; Coates, J.; Cox, R. (1993). Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome 2 fragile sites. **Genes Chromosomes Cancer**. 6:98-106. doi: 10.1002/gcc.2870060206
- Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura, notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura**. São Paulo, FSPUSP e Instituto de Pesca. p.79-108.
- Britski, H.A. (1991). Peixes de água doce. In: Carvalho, J.C.M. **Atlas de fauna brasileira**. São Paulo, Melhoramentos. p.84-93.



- 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. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:241-250. doi: 10.1007/s11160-011-9215-9.
- Cereali, S.S.; Pomini, E.; Rosa, R.; Zawadzki, C.H.; Froenlich, O.; Giluiano-Caetano, L. (2008). Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 7(3):583-591.
- Charlesworth, B.; Snlegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. 371:215-220.
- Chew, J.S.K.; Oliveira, C.; Wright, J.M.; Dobson, M.J. (2002). Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**. 111:45-52. doi: 10.1007/s00412-002-0187-3.
- Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L A. (2010) .Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evolutionary Biology**. 10(1).
- Cross, I.; Merlo, A.; Manchado, M.; Infante, C.; Cañavate, J.P.; Rebordinos, L. (2006). Cytogenetic characterization of the *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleurenctiformes. Soleidae): Ag-NOR, (GATA)<sub>n</sub>, (TTAGGG)<sub>n</sub> and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. **Genetica**. 128:253-259.
- Day, J.P.; Limoli, C.L.; Morgan, W.F. (1998). Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. **Carcinogenesis**. 19:259-265.
- Desmaze, C.; Alberti, C.; Martins, L.; Pottier, G.; Sprung, C.N.; Murnane, J.P.; Sabatier, L. (1999). The influence of interstitial telomeric sequences on chromosome instability in human cells. **Cytogenetic and Cell Genetics**. 86:288-295. doi: 10.1159/000015321.

- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 79:3798-3802.
- Eschmeyer, W.; Fricke, R. (2012). **Catalog of fishes electronic version**. Versão online datada de 31/01/2012.<<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>.
- Ferraris Jr., C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**. 1418:1-628.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘*in vitro*’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 19:4780.
- Isbrucker, I.J.H. (1980). Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Verslagem en Technische Gegevens**. 22:1-181.
- Jacobina, U.P.; Cioffi, M.B.; Souza, L.G.R.; Calado, L.L.; Tavares, M.; Manzella Jr., J.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. (2011). Chromosome Mapping of Repetitive Sequences in *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae): Implications for Karyotypic Evolution and Perspectives for Biotechnological Uses. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2011:1-8. doi:10.1155/2011/218231.
- Jones, K.W.; Singh, L. (1985). Snakes and the evolution of sex chromosomes. **Trends in Genetics**. 1:55-61.
- Kilburn, A.E.; Shea, M.J.; Sargent, R.G.; Wilson, J.H. (2001). Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. **Molecular and Cell Biology**. 21:126-135. doi: 10.1128/MCB.21.1.126-135.2001.

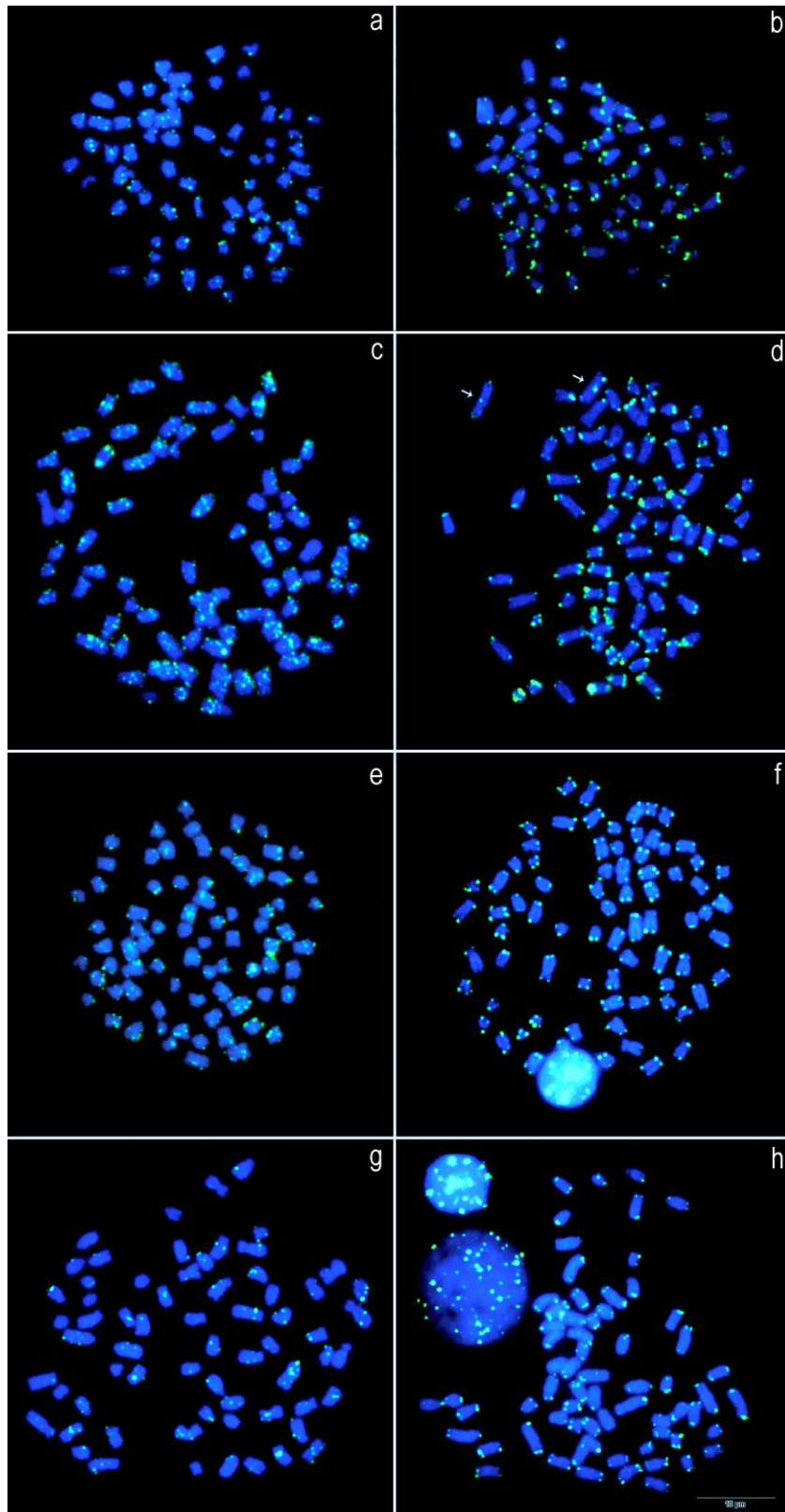
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2011). Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**. 5:289-300.
- Merlo, M.A.; Cross, I.; Palazón, J.L.; Sarasquete, C.; Rebordinos, L. (2007). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> by one-color and double color FISH in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Teleostei: Batrachoididae). **Genetica**. 131:195-200.
- Meyne, J.; Baker, R.J.; Hobart, H.H.; Hsu, T.C.; Ryder, O.A.; Ward, O.G.; Wiley, J.E.; Wurster-Hill, D.H.; Yates, T.L.; Moyzis, R.K. (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**. 99:3-10.
- Muramoto, I.; Ohno, S.; Atkin, N.B. (1968). On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**. 24:59-66.
- Nanda, I.; Schneider-Rasp, S.; Winking, H.; Schmid, M. (1995). Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia:Muridae) during Robertsonian rearrangements. **Chromosome Research**. 3:399-409.
- Nanda, I.; Fugate, M.; Steinlein, M.; Schmid M. (2008). Distribution of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. **Cytogenetic and Genome Research**. 122:396-400.
- Nergadze, S.G.; Rocchi, M.; Azzalin C.M.; Mondello, C.; Giulotto, E. (2004). Insertion of Telomeric Repeats at Intrachromosomal Break Sites During Primate Evolution. **Genome Research**. 14:1704-1710.
- Peitl, P.; Mello, S.S.; Camparoto, M.L.; Passos, G.A.S.; Hande, M.P.; Cardoso, R.S.; Sakamoto-Hojo, E.T. (2002). Chromosomal rearrangements involving telomeric DNA sequences in Balb/3t3 cells transfected with the Ha-ras oncogene. **Mutagenesis**. 17:67-72. doi: 10.1093/mutage/17.1.67.

- Perry, J.O.; Slater, H.R.; Choo, K.H.A. (2004). Centric fission - simple and complex mechanisms. **Chromosome Research**. 12:627-640. doi: 10.1023/B:CHRO.0000036594.38997.59
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Reed, K.M.; Phillips, R.B. (1995). Molecular cytogenetic analysis of the double-CMA chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 70(1-2):104-107.
- Richards, E.J.; Goodman, H.M.; Ausubel, F.M. (1991). The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. **Nucleic Acids Research**. 19:3351-3357. doi: 10.1093/nar/19.12.3351
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:739-749. doi: 10.1007/s11160-011-9250-6
- Rubert, M.; Zawadzki, C.H.; Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. 6:93-100.
- Singh, L.; Purdom, I. F.; Jones, K.W. (1981). Conserved sex-chromosome-associated nucleotide sequences in eukaryotes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. 45:805-814.
- Singh, L.; Jones, K.W. (1982). Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and an aberrant Y-chromosome. **Cell**. 28:205-216.
- Singh, L.; Phillips, C.; Jones, K.W. (1984) The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. **Cell**. 36:111-120.

- Slijepcevic, P.; Xiao, Y.; Natarajan, A.T.; Bryant, P.E. (1997). Instability of CHO chromosomes containing interstitial telomeric sequences originating from Chinese hamster chromosome 10. **Cytogenetic and Cell Genetic**. 76:58-60. doi: 10.1159/000134516
- Slijepcevic, P. (1998). Telomers and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**. 107:136-140.
- Srivastava, J.; Premi, S.; Kumar, S.; Ali, S. (2008). Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoa transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. **BMC Genomics**. 9(132):1-17.
- Traldi, J.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. **Comparative Cytogenetics**. 6(2):115-125. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i2.2595
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Barros, A.V.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (*in press*). Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**.
- Traut, W. (1987). Hypervariable Bkm DNA Loci in a Moth, *Ephestia kuehniella*: Does Transposition Cause Restriction Fragment Length Polymorphism? **Genetics**. 115:493-498.
- Úbeda-Manzanaro, M.; Merlo, M.A.; Palazón, J.L.; Cross, I.; Sarasquete, C.; Rebordinos, L. (2010). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**. 138:787-794.
- Weber, C. (2003). Subfamily Hypostominae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs.

- Wichman, H.A.; Payne, C.T.; Ryder, O.A.; Hamilton, M.J.; Maltbie, M.; Baker, R.J. (1991). Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**. 82:369-377.
- Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Rosa, K.O.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): a chromosomal analysis and review data with emphasis in basal groups. **Italian Journal of Zoology**. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/11250003.2012.676677>

Figuras (Capítulo 3)



**Figura 1.** Metáfases de *Hypostomus ancistroides* (a, b), *Hypostomus iheringii* (c, d), *Hypostomus nigromaculatus* (e, f) e *Hypostomus tapijara* (g, h) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas (GATA)<sub>n</sub> (a, c, e, g) e (TTAGGG)<sub>n</sub> (b, d, f, h).

## 6.4. CAPÍTULO 4

### **Mapeamento cromossômico de retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em espécies do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae)**

Artigo em preparação



## Resumo

Os elementos repetitivos têm sido amplamente aplicados como marcadores físicos cromossômicos. Dentre as diversas sequências utilizadas, destacam-se os elementos transponíveis (TEs). Os TEs caracterizam-se pela capacidade de movimentação no genoma. Em peixes neotropicais, tais estudos são encontrados para algumas espécies, contudo em Loricariidae são poucas as análises de mapeamento físico dos elementos transponíveis e associação com possíveis funções nos genomas. Loricariidae é composta por 834 espécies válidas, as quais se encontram distribuídas em seis subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Delturinae. Dentre estas subfamílias, Hypostominae encontra-se entre aquelas com maior número de espécies e diversidade cromossômica. Considerando a importância dos elementos repetitivos para a evolução cromossômica e a sua eficácia como marcadores cromossômicos, este trabalho realizou o mapeamento físico por FISH dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em quatro espécies do gênero *Hypostomus* (*H. ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara*), com objetivo de obter um melhor entendimento sobre a organização e dinâmica dos genomas das espécies pertencentes a este gênero. Para as quatro espécies analisadas foi observado um padrão disperso destes retroelementos, com acúmulo em regiões eucromáticas e heterocromáticas. A distribuição dispersa de tais elementos no genoma das espécies aqui estudadas pode estar relacionada à grande diversidade cariotípica encontrada em *Hypostomus*. Ainda, com o intenso acúmulo de elementos *Rex* em sítios eucromáticos é possível inferir a domesticação molecular pelos genomas hospedeiros de *Hypostomus*, com estas sequências servindo de co-opção para novas funções regulatórias. Assim, estudos da função dos TEs nos genomas de Loricariidae podem auxiliar no entendimento da extrema variação cariotípica deste grupo.

**Palavras-chave:** cascudos, citogenética, elementos transponíveis, Hypostominae.

## **Abstract**

The repetitive elements have been widely applied as physical chromosome markers. Among the various sequences used, it is highlighted the transposable elements (TEs). The TEs are characterized by the ability of moving in the genome. In neotropical fish, such studies are found in some species, however, in Loricariidae, there are few analyses of physical mapping of transposable elements and association with potential roles in the genomes. Loricariidae consists of 834 valid species, which are divided into six subfamilies: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, and Neoplecostominae Delturinae. Among these subfamilies, Hypostominae is one of those with the greatest number of species and diversity chromosome. Given the importance of repetitive elements for chromosomal evolution and its effectiveness as chromosomal markers, this study performed the physical mapping by FISH of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in four species of the genus *Hypostomus* (*H. ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara*), in order to obtain a better understanding on the organization and dynamics of genomes of species belonging to this genus. For the four analyzed species it was observed a dispersed pattern of these retroelements, with accumulation in euchromatic and heterochromatic regions. The dispersed distribution of these elements in the genome of the species studied here may be related to the great diversity found in *Hypostomus*. Further, with the intense accumulation of *Rex* elements in euchromatic sites, it is possible to infer the molecular domestication by host genomes of *Hypostomus*, with these sequences serving as co-option for new regulatory functions. Thus, studies of the role of TEs in the genomes of Loricariidae may help in the understanding of the great karyotype variation of this group.

**Keywords:** armored catfish, cytogenetic, Hypostominae, transposable elements.

## Introdução

Genes de cópia única ou de poucas cópias correspondem a uma pequena parte do genoma dos vertebrados (2-10%), quando comparados às regiões repetitivas (Horvath *et al.*, 2001). Eucariotos possuem dois tipos de DNA altamente repetitivos: sequências dispersas, como os elementos transponíveis (TEs); e sequências repetidas em *tandem* como àquelas que compõem o DNA satélite e famílias gênicas (Phillips & Reed, 1996; Martins, 2007). Os elementos repetitivos dispersos representam uma significativa parcela do genoma dos eucariotos, sendo sua principal característica a mobilidade dentro do genoma (Hartl *et al.*, 1992). Assim, sua capacidade de auto-inserção em diferentes locais do genoma pode modificar a função de genes a eles associados (Capy *et al.*, 1998). Estes TEs apresentam um “ciclo de vida”, o qual é considerado como os sucessivos passos do seu “nascimento” até sua “morte” em um dado genoma, incluindo a invasão, amplificação, inativação e eliminação de um genoma que pode ocorrer ao longo do tempo evolutivo (Miller *et al.*, 1997). Esse caráter dinâmico faz com que os TEs tenham uma grande influência na composição e evolução do genoma de animais e plantas. Deste modo, estes elementos têm sido amplamente aplicados como marcadores físicos cromossômicos em estudos comparativos para localização de rearranjos cromossômicos, identificação e caracterização de cromossomos sexuais, e análises de evolução cromossômica (Ferreira *et al.*, 2011a).

Os TEs são agrupados em duas grandes classes baseadas em sua organização estrutural e mecanismo de transposição. A Classe I aloca os elementos que se locomovem no genoma utilizando-se de uma transcriptase reversa, via um intermediário de RNA. Encontram-se nesta Classe os retrotransposons (que são caracterizados por possuírem longas repetições terminais - LTRs), os retroposons ou retrotransposons non-LTR (que não apresentam as LTRs), além dos SINEs (short interspersed nuclear elements) e LINEs (long interspersed nuclear elements). A Classe II engloba os elementos que se transportam diretamente de DNA a DNA, utilizando-se de enzimas codificadas por eles mesmos (Kidweell & Lisch, 2001).

Apesar da existência de vários estudos sobre a constituição e distribuição dos retroelementos em diversos grupos de animais, em peixes, até o presente momento, pouco se sabe sobre a distribuição e organização funcional destes elementos nos genomas. O primeiro estudo citogenético com um elemento LINE-like em peixes foi realizado em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), no qual os autores evidenciaram esse elemento distribuído em pequenos clusters dispersos por todos os cromossomos, porém com uma maior concentração na posição terminal dos cromossomos. Resultados similares foram encontrados por Oliveira *et al.* (2003) ao investigarem duas sequências SINE, nesta mesma espécie. Por outro lado, Valente *et al.* (2011) ao realizar o mapeamento cromossômico dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em oito espécies de ciclídeos encontraram estes elementos alocados, preferencialmente, na região pericentromérica de todos os cromossomos das espécies analisadas. Outros estudos citogenéticos com os retrotransposons *Rex1* e *Rex3* mostraram seu preferencial posicionamento em regiões heterocromáticas como, por exemplo, em *Tetraodon nigroviridis* Marion de Procé, 1822 (Da Silva *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2004) e em 13 espécies de peixes Antárticos da subordem Notothenioidei (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). Com relação à distribuição desses retroelementos em Loricariidae, Ferreira *et al.* (2011b) ao realizar o mapeamento físico por FISH de *Rex1* e *Rex3* em *Parotocinclus maculicauda* (Steindachner, 1877), *Pseudotocinclus tietensis* (Ihering, 1907) e *Hisonotus leucofrenatus* (Miranda Ribeiro, 1908) encontraram estes dispersos em pequenos clusters espalhados por todos os cromossomos, tanto em regiões heterocromáticas quanto eucromáticas.

A família Loricariidae é composta por 834 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2012), as quais se encontram distribuídas em seis subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Delturinae (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006, Cramer *et al.*, 2011). Dentre estas subfamílias, Hypostominae encontra-se entre aquelas com maior número de espécies e diversidade cromossômica.

*Hypostomus* pertence à subfamília Hypostominae. De acordo com Zawadzki *et al.* (2010) são descritas para este gênero mais de 120 espécies, das quais apenas um pequeno número apresenta estudos citogenéticos (Bitencourt *et al.*, 2012). Este grupo é altamente diversificado do ponto de vista cromossômico, com número diploide variando de 54 cromossomos para *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus, 1758) (Muramoto *et al.*, 1968) a 84 cromossomos para *Hypostomus* sp. 2 (Cereali *et al.*, 2008). Casos de variações interpopulacionais (Michele *et al.*, 1977; Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Rubert *et al.*, 2008; Rubert *et al.*, 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Bitencourt *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2012) mostram-se recorrentes no gênero, contudo heteromorfismos intrapopulacionais (Artoni & Bertollo, 1999), sistemas de cromossomos sexuais (Michele *et al.*, 1977; Artoni *et al.*, 1998) e presença de cromossomos supranumerários (Cereali *et al.*, 2008; Milhomem *et al.*, 2010) são verificados em um pequeno número de espécies.

Deste modo, considerando a grande variação de número diploide e rearranjos cromossômicos observados no gênero *Hypostomus*, este trabalho realizou o mapeamento físico por FISH dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em quatro espécies deste gênero com objetivo de relacionar a distribuição destes elementos de repetição com a intensa variação citogenômica de *Hypostomus*.

## **Materiais e Métodos**

Foram analisadas quatro espécies do gênero *Hypostomus*: *H. ancistroides* (Ihering, 1911), *H. iheringii* (Regan, 1908), *H. nigromaculatus* (Schubart, 1964) provenientes da bacia do rio Passa-Cinco, e *H. tapijara* Oyakawa, Akama & Zanata, 2005 proveniente da bacia do rio Ribeira de Iguape. Os animais foram identificados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) sob os registros MZUSP 110802, MZUSP 106769, MZUSP 110801 e MZUSP 109785, respectivamente. Os cromossomos metafásicos foram obtidos de porções do rim anterior, seguindo os protocolos descritos por Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993).

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se um pequeno fragmento de fígado, armazenado em álcool absoluto, de um exemplar de *H. nigromaculatus*, segundo o método de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001). Os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram amplificados por PCR utilizando-se os seguintes *primers*: *Rex1f* (5'- TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC -3') e *Rex1r* (5'- TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC -3'), *Rex3f* (5'- CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG -3') e *Rex3r* (5'- TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT -3'), *Rex6f* (5'- TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C -3') e *Rex6r* (5'- GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGG G 3') descritos por Volff *et al.* (1999; 2000; 2001).

As reações foram realizadas para um volume final de 25µl, contendo 100-200ng de DNA genômico, 0,2µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5mM de cloreto de magnésio, Buffer 10x (s/ cloreto) e água destilada. As condições do ciclo de PCR foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 2 minutos, com posterior ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% e quantificados em espectrofotômetro (BioPhotometer – Eppendorf). Reações de PCR com as mesmas condições acima descritas foram realizadas com biotina-11-dUTP (Roche Applied Science) para utilização destes produtos como sondas para FISH.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA e Gel Purification da Amersham-Pharmacia Biotech. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000.

A edição das sequências *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* de *H. nigromaculatus* foi realizada com o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (Hall, 1999). Foi utilizado o BLAST (Altschul *et al.*, 1990) na identificação de similaridade destas sequências.

Todos os processos de hibridizações seguiram o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), sobre alta condição de estringência - 77% (200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 – 7,2, a 37°C overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas duas vezes em 15% formamida/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada e posteriormente foram efetuadas 2 lavagens de 5 minutos cada em 4xSSC/0,05% Tween em temperatura ambiente. As metáfases foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) e as imagens capturadas pelo próprio sistema da câmera (Olympus DP72).

## Resultados

As sequências parciais, amplificadas via PCR, dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* isolados de *H. nigromaculatus* apresentaram 553pb (Fig. 1a), 433pb (Fig. 1b) e 548pb (Fig. 1c), respectivamente. A localização física por FISH dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* nos cariótipos das espécies *H. ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara* mostrou sítios de acúmulo destes retroelementos na maioria dos cromossomos, tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas (Fig. 2).

Em *H. ancistroides*, os três elementos repetitivos foram localizados dispersos em todos os cromossomos, sendo observado um maior acúmulo dos elementos *Rex3* e *Rex6*. O elemento *Rex1* foi o menos abundante e alocado em pequenos clusters dispersos pelo genoma (Fig. 2).

Em *H. iheringii*, os elementos repetitivos apresentaram-se dispersos em todos os cromossomos, sendo observado um maior acúmulo do elemento *Rex6*, seguido dos elementos *Rex3* e *Rex1*, sendo este último o menos abundante e alocado em pequenos clusters dispersos pelo genoma. É pertinente ressaltar que não foi identificado sinal de hibridização com nenhum dos elementos *Rex* na porção terminal do braço longo do par 5, região onde é encontrada um conspícuo bloco heterocromático (Fig. 2).

Em *H. nigromaculatus*, os três retroelementos foram localizados dispersos em todos os cromossomos, sendo observado um maior acúmulo, em blocos mais proeminentes, do elemento *Rex1*, seguido dos elementos *Rex6* e *Rex3* (Fig. 2).

Em *H. tapijara*, os três retroelementos apresentaram-se dispersos em todos os cromossomos, sendo observado um maior acúmulo, em blocos mais proeminentes e bem definidos, do elemento *Rex6*. O elemento *Rex1* encontra-se mais concentrado, em pequenos clusters alocados, predominantemente, em regiões terminais de alguns cromossomos. O elemento *Rex3* é o menos abundante entre os elementos testados no presente estudo (Fig. 2).

## Discussão

Análise comparativa dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* isolados de *H. nigromaculatus* no presente trabalho revela similaridade com as respectivas sequências de outras espécies de peixes. A sequência parcial do *Rex1* de *H. nigromaculatus* exibiu 84% de similaridade com *H. leucofreantus*, 73% com *P. tietensis* e 71% com *Otocinclus flexilis* Cope, 1894. A sequência parcial de *Rex3* de *H. nigromaculatus* apresentou-se 90% similar à sequência de *P. tietensis* e 91% à sequência de *Corumbataia cuestae*. Esta similaridade encontrada entre essas sequências sugere que tais elementos são mantidos nos genomas de Loricariidae. Por sua vez, a sequência parcial do *Rex6* exibiu 100% de similaridade com *Cickla kelberi* e 81% com *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831).

Os elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* são elementos non-LTRs que têm demonstrado atividade na evolução de diversos grupos de peixes, podendo estar cromossomicamente organizados em *clusters* ou dispersos pelo genoma (Ferreira *et al.*, 2011a). As hibridizações *in situ* com sondas dos elementos repetitivos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* nas espécies analisadas evidenciaram a ocorrência de intenso acúmulo com um padrão disperso para as três sequências. Esse padrão de dispersão e acúmulo encontrado para as espécies aqui analisadas sugerem que essas sequências possam ter algum papel funcional nos genomas de *Hypostomus*. Ferreira *et al.* (2011b) também encontraram um caso similar ao investigar



a localização de *Rex1* e *Rex3* em três espécies da subfamília Hypoptopomatinae. Desta forma, os dados disponíveis sugerem que esse padrão disperso para os elementos *Rex* possa ser uma característica das espécies de Loricariidae.

Os elementos *Rex* presentes no genoma de diferentes espécies de peixes têm sofrido processos de transposição, alguns dos quais identificados como eventos recentes (Ferreira *et al.*, 2011a). O padrão disperso dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* encontrado para as espécies analisadas no presente trabalho também foi encontrado em grupos que apresentam uma grande diversidade cromossômica como, por exemplo, em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Cioffi *et al.*, 2010). Em contrapartida, grupos que apresentam uma conservação mais acentuada na macroestrutura cariotípica como, por exemplo, os ciclídeos, apresentam esses retroelementos alocados preferencialmente na região centromérica e telomérica da maioria dos cromossomos (Valente *et al.*, 2011). Essa diferença na distribuição dos TEs, aqui representados pelos elementos *Rex*, possivelmente está relacionada com um diferencial número de cópias dessas sequências no genoma de diferentes espécies e, com a atuação destas sequências na diversificação cariotípica das espécies.

Na maioria dos casos já descritos, os retroelementos *Rex* mostram-se acumulados preferencialmente em porções heterocromáticas (Da Silva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2004; Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). Entretanto, assim como o encontrado por Ferreira *et al.* (2011b) para outros gêneros de Loricariidae, os dados do presente trabalho ressaltam que a localização destes elementos não concentrada somente em região heterocromáticas, e sim estendendo-se até as porções eucromáticas do genoma, parece ser uma característica das espécies pertencentes a esta família (Fig. 2). Um diferente caso foi observado em *H. iheringii*. Nesta espécie há um conspícuo bloco heterocromático alocado no braço longo do par submetacêntrico 5, bloco este envolvido num possível processo de heterocromatinização e evidenciado sob a condição de polimorfismo (Traldi *et al.*, 2012). No indivíduo analisado (heterozigoto para o bloco heterocromático) não foi detectada a presença de nenhum dos retroelementos testados neste

cromossomo portador do bloco (Fig. 2). Desta maneira, é possível especular sobre a ocorrência da dispersão dos elementos *Rex* posteriormente ao processo de heterocromatinização neste bloco, sendo que tal heterocromatina compartimentalizada haveria impedido a dispersão destas sequências nesta região cromossômica.

Estudos com elementos repetitivos dispersos em genomas já demonstraram que estes, após a fase de invasão, tendem a ser silenciados e posteriormente sofrer deterioração molecular até serem incorporados no genoma hospedeiro (Fernández-Medina *et al.*, 2012). Na fase de deterioração molecular o elemento se torna inativado, e progressivamente acumula mutações, inserções e deleções em taxas neutras até perder completamente sua identidade ou ser perdido do genoma hospedeiro (Fernández-Medina *et al.*, 2012). Foi verificado que a deterioração dos elementos dispersos transforma estas cópias em sequências neutras no genoma e estas podem servir de matéria bruta para a domesticação pelo genoma hospedeiro (Miller *et al.*, 1997). O conceito de domesticação molecular foi utilizado para descrever o processo onde uma sequência TE tem uma co-opção para realizar uma função diferente da original para qual ela foi selecionada e trazer benefícios para o genoma hospedeiro (Miller *et al.*, 1997). De fato, cópias de elementos TE truncadas podem modular a expressão gênica no genoma hospedeiro por providenciar novos sítios regulatórios, alternativas para sítios de “splice”, sinais de poliadenilação, novos sítios de ligação de fatores de transcrição, bem como, regulação pós-transcricional e regulação da tradução (Marino-Ramirez *et al.*, 2005; Muotri *et al.*, 2007; Polavarapu *et al.*, 2008). Em adição, tem sido mostrado que inúmeros genes para microRNAs derivam dos TEs (Piriyapongsa *et al.*, 2007). Assim, a intensa invasão dos elementos da família *Rex* em *Hypostomus*, demonstrada pela localização física destes elementos com acúmulo em regiões eucromáticas, pode representar novas alternativas genômica e evolutivas, atuando na adaptação e diferenciação destas espécies.

Desta forma, considerando o intenso acúmulo dos retroelementos *Rex* nos *Hypostomus* avaliados, pode ser hipotetizado que estas sequências, devido a sua mobilidade no genoma,

apresentam uma significativa influência na evolução cromossômica e podem estar frequentemente associadas aos rearranjos cromossômicos do grupo. Ainda, com o intenso acúmulo de elementos *Rex* em sítios eucromáticos é possível inferir a domesticação molecular pelos genomas hospedeiros de *Hypostomus* com estas sequências servindo de co-opção para novas funções regulatórias.

## Referências

- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Foresti, F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. 128:1-9.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215(3):403-410.
- 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.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**. 49(1):81-90.
- Artoni, R.F.; Venere, P.C.; Bertollo, L.A.C. (1998). A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**. 63:421-425.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**. 106:209-214.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics** 2:103-120.

- Bitencourt, J.A.; Affonso, P.R.A.M.; Giuliano-Caetano, L.; Carneiro, P.L.S.; Dias, A.L. (2012). Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 11(2):933-943.
- Bouneau, L.; Fisher, C.; Ozouf-Costaz, C.; Froschauer, A.; Jaillon, O.; Coutanceau, J.P.; Körting, C.; Weissenbach, J.; Bernot, A.; Volff, J.N. (2003). An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**. 13:1686-1695.
- Capriglione, T.; Odierna, G.; Caputo, V.; Canapa, A.; Olmo, E. (2002). Characterization of a *Tc1*-Like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. **Gene**. 295(2):193-198.
- Capy, P.; Bazin, C.; Higuët, D.; Langin, T. (1998). **Dynamics and Evolution of Transposable Elements**. Austin/London, Landes Bioscience/Chapman & Hall.
- Cereali, S.S.; Pomini, E.; Rosa, R.; Zawadzki, C.H.; Froenlich, O.; Giluiano-Caetano, L. (2008). Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 7(3):583-591.
- Cioffi, M.B.; Martins, C.; Vicari, M.R.; Rebordinos, L.; Bertollo, L.A.C. (2010). Differentiation of the XY sex chromosomes in *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development** 4:176-185.
- Cramer, C.A.; Bonatto, S.L.; Reis, R.E. (2011). Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 59:43-52. doi: 10.1016/j.ympev.2011.01.002
- Da Silva, C.; Hadji, H.; Ozouf-Costaz, C.; Nicaud, S.; Jaillon, O.; Weissenbrach, J.; Crollius, H.R. (2002). Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 99:1636-1641.

- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2012). **Species of Fishes by family/subfamily**. Versão online datada de 10/05/2012.<<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species>By Family.asp>>
- Fernández-Medina, R.D.; Ribeiro, J.M.C.; Carareto, C.M.A.; Velasque, L.; Struchiner, C.J. (2012). Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BMC Genomics**. 13:272. doi: 10.1186/1471-2164-13-272
- Ferreira, D.C.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011a). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. **Mobile Genetic Elements**. 1(2):1-6.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011b). Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 132:64-70.
- Fischer, C.; Bouneau, L.; Coutenceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volf, J.N.; Ozouf-Costaz, C. (2004). Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**. 336:175-83.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘in vitro’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus fishes, Ciclidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. **Cytogenetic and Genome Research**. 127:43-53.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98.
- Hartl, D.L.; Lozovsaya, E.; Lawrence, J.G. (1992). Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. **Genetica**. 86:47-53.

- Horvath, J.E.; Bailey, J.A.; Locke, D.P.; Eichler, E.E. (2001). Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. **Human Molecular Genetics**. 10:2215-2223.
- Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. (2001). Perspectives: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**. 55:1-24.
- Marino-Ramirez, L.; Lewis, K.C.; Landsman, D.; Jordan, I.K. (2005). Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. **Cytogenetic and Genome Research**. 110:333-341.
- Martins, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B. G. **Fish Cytogenetics**. New Hampshire, Kapoor Science Publisher. p.421-453.
- Mendes-Neto, E.O.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (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*. **Comparative Cytogenetics**. 5:133-142.
- Michele, J.L.; Takahashi, C.S.; Ferrari, I. (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**. 42:539-546.
- Milhomem, S.S.R.; Castro, R.R.; Nagamachi, C.Y.; Souza, A.C.P.; Feldberg, E.; Pieczarka, J.C. (2010). Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comparative Cytogenetics**. 4(1):45-54.
- Miller, W.J.; McDonald, J.F.; Pinsker, W. (1997). Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**. 100:261-270.
- Muotri, A.R.; Marchetto, M.C.; Coufal, N.G.; Gage, F.H. (2007). The necessary junk: new functions for transposable elements. **Human Molecular Genetics**, 16(2):159-167.

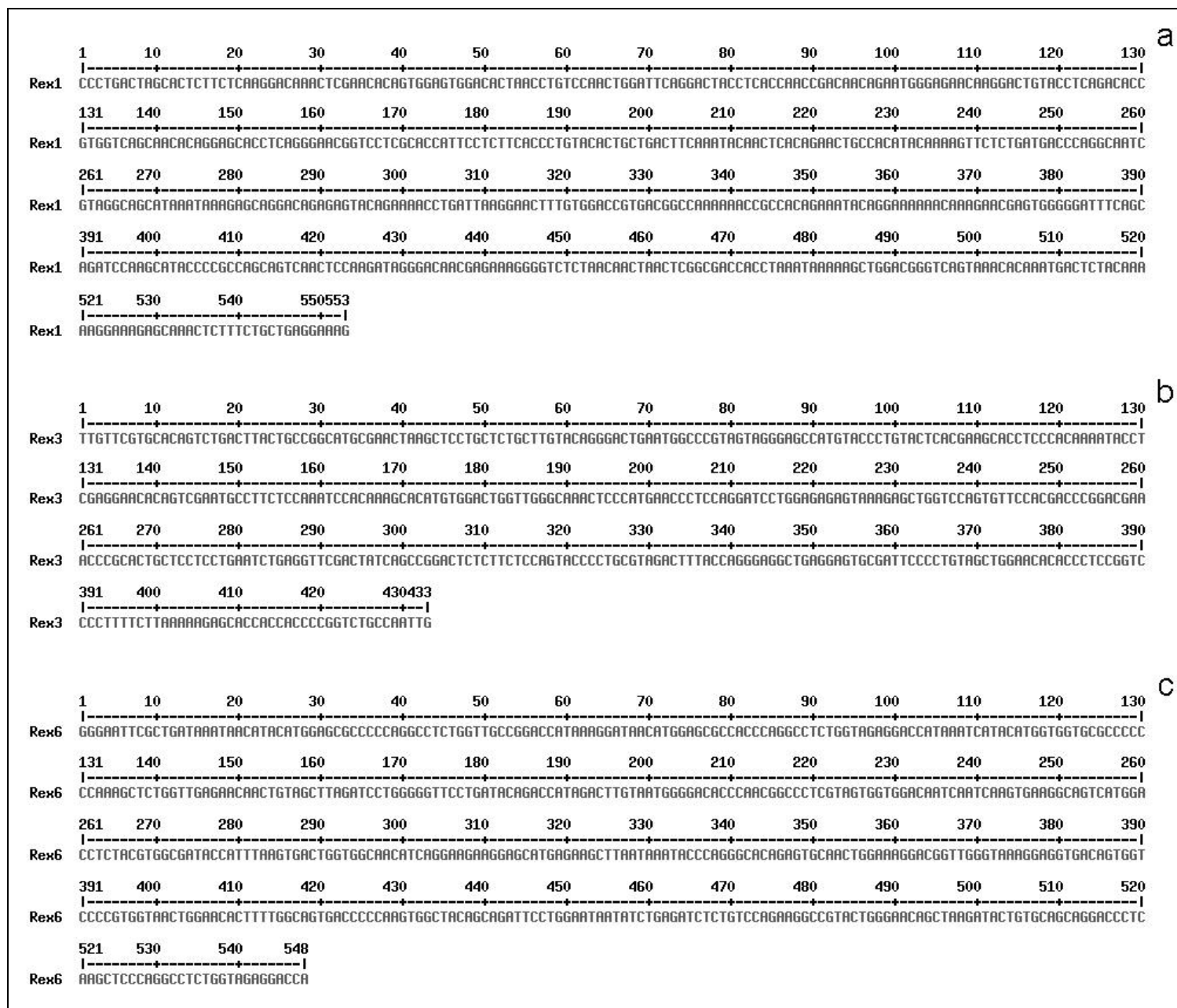
- Muramoto, I.; Ohno, S.; Atkin, N.B. (1968). On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**. 24:59-66. doi: 10.1007/BF00329607
- Oliveira, C.; Wang, Y.; Bryden, L.J.; Wriqth, J.M. (2003). Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent in situ hybridization. **Caryologia**. 56:177-85.
- Ozouf-Costaz, C.; Brandt, J.; Körting, C.; Pisano, E.; Bonillo, C. (2004). Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarctic Science**. 16:51-57.
- Phillips, R.B.; Reed, K.M. (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. **Aquaculture**. 140:197-216.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Piriyapongsa, J.; Marino-Ramirez, L.; Jordan, I.K. (2007). Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. **Genetics**. 176:1323-1337.
- Polavarapu, N.; Marino-Ramirez, L.; Landsman, D.; McDonald, J.F.; Jordan, I.K. (2008). Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA. **BMC Genomics**. 9:226.
- Raskina, O.; Barber, J.C.; Nevo, E.; Belyayev, A. (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic and Genome Research**. 120:351-357.
- 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**. 147:227-299.

- Rubert, M.; Zawadzki, C.H.; Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**. 6:93-100.
- Rubert, M.; Rosa, R.; Jerep, F.C.; Bertollo, L.A.C.; Giulino-Caetano, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**. 5:397-410.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York, Laboratory Press.
- Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. (2009). Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**. 125:224-34.
- Traldi, J.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. **Comparative Cytogenetics**. 6(2):115-125. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i2.2595
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Barros, A.V.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (in press). Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**.
- Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. (2011). Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and Genome Research**.133:34-42.

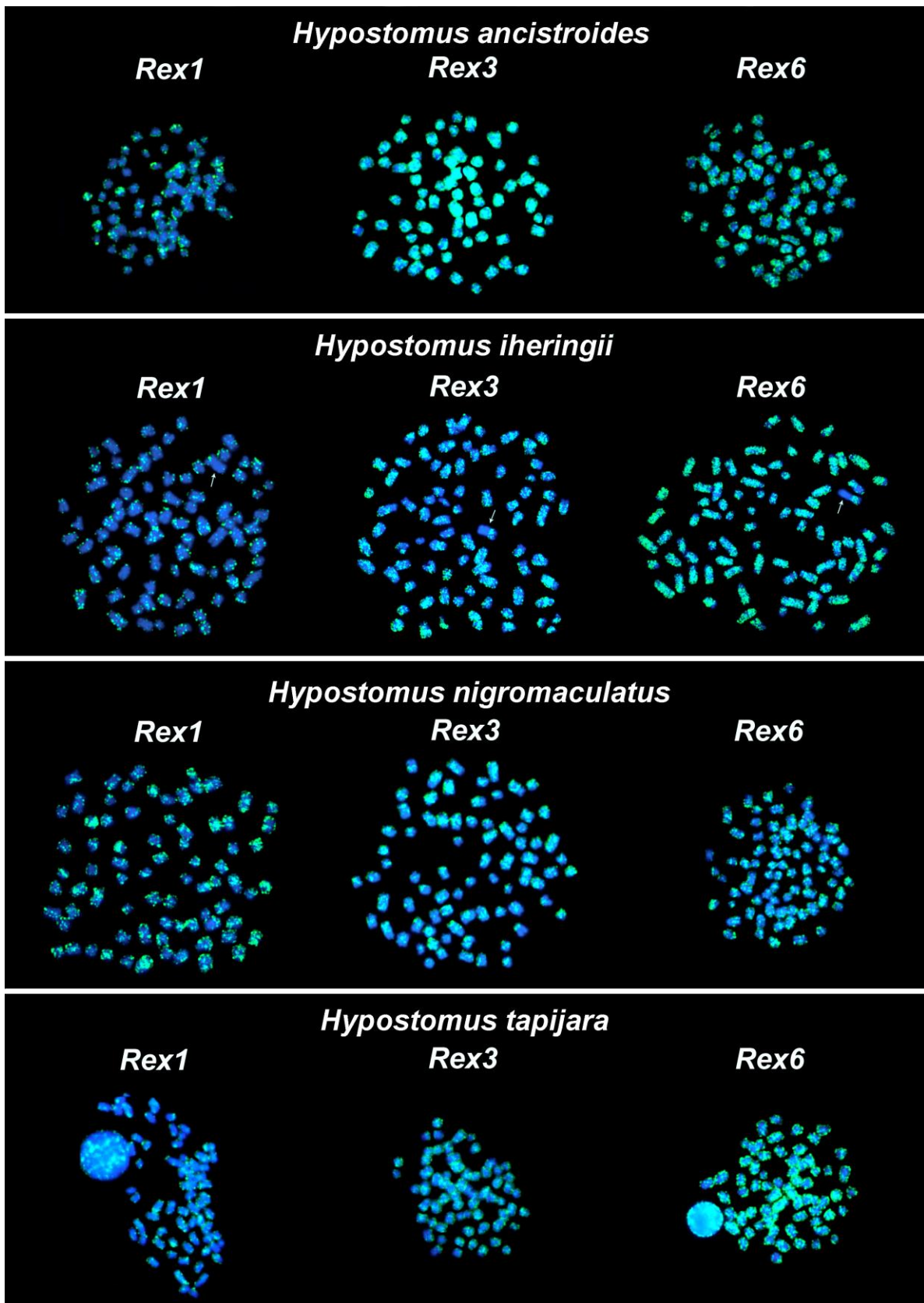


- Volff, J.N.; Körting, C.; Sweeney, K.; Schartl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution.** 16:1427-1438
- Volff, J.N.; Körting, C.; Schartl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution.** 17:1673-1684.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Meyer, A.; Schartl, M. (2001). Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. **Molecular Biology and Evolution.** 18:427-431.
- Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. (2010). A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology.** 8(4):719-725.

## Figuras (Capítulo 4)



**Figura 1.** Sequências parciais dos retroelementos *Rex1* (a), *Rex3* (b) e *Rex6* (c) extraídos de *Hypostomus nigromaculatus*.



**Figura 2.** Metáfases de *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus iheringii*, *Hypostomus nigromaculatus* e *Hypostomus tapijara* submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*. As setas indicam o cromossomo do par 5 de *Hypostomus iheringii* portador do conspicuo bloco heterocromático.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de representar o gênero mais estudado através de técnicas citogenéticas em Hypostominae, *Hypostomus* ainda apresenta um enorme número de espécies não analisadas. A primeira caracterização cromossômica de *H. iheringii* e *H. tapijara* do presente trabalho reforçam esta ideia, e enfatizam a necessidade de mais estudos nestas espécies, em busca da ampliação do conhecimento sobre a evolução cariotípica do grupo.

Analisando os resultados obtidos no presente trabalho e aqueles disponíveis em literatura, nota-se a existência de uma grande variabilidade cariotípica intra e interespecífica em *Hypostomus*. Os indivíduos de *H. iheringii* exibiram um padrão polimórfico de bandamento C em dois pares cromossômicos, o qual possivelmente decorre de processos de heterocromatinização. *H. ancistroides* e *H. nigromaculatus* apresentaram variações no número diploide, fórmula cariotípica, padrão heterocromático e localização dos DNAs ribossômicos em relação a outras populações já estudadas.

*Hypostomus* é considerado um gênero derivado dentro de Loricariidae. Considerando  $2n = 54$  cromossomos como putativa condição primitiva em Loricariidae, rearranjos do tipo fissões cêntricas levariam ao aumento do número diploide observado na maioria das espécies do grupo. As quatro espécies aqui analisadas apresentam número diploide superior a 54 cromossomos, o que corrobora esses sucessivos eventos de fissões cêntricas. A verificação de marcações teloméricas restritas à porção terminal dos cromossomos em *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara* representa um indicativo de inexistência de fusões ou translocações cromossômicas na diferenciação cariotípica destas espécies, situação esta coerente com a hipótese evolutiva acima relatada para o gênero *Hypostomus*. Contudo, a possibilidade de perda destas sequências após a ocorrência dos rearranjos não pode ser descartada. Já a presença de ITS num par cromossômico do cariótipo de *H. iheringii* sugere a ocorrência de rearranjos dos tipos fusão, translocação ou inversão na diversificação cromossômica deste grupo, além das fissões cêntricas.

Os sítios ribossomais apresentam aparente conservação molecular entre grupos de organismos relacionados e, desta forma, tornam-se ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos. O mapeamento do gene de rDNA 18S nas quatro espécies de *Hypostomus* exibiu a ocorrência de variações no padrão de localização destes sítios, sendo encontradas tanto a condição simples (*H. nigromaculatus*) quanto a condição de múltiplos sítios (*H. ancistroides*, *H. iheringii* e *H. tapijara*). Foi verificada a inexistência de marcação pela FISH em todos os cromossomos dos pares portadores deste gene em *H. ancistroides* e *H. iheringii*, o que provavelmente decorre da limitada sensibilidade da técnica a sítios muito pequenos. Desta maneira, verifica-se a possível recorrência de sítios de rDNA 18S muito pequenos em *Hypostomus*. Com relação aos sítios de rDNA 5S também foi verificada variação, sendo que *H. iheringii* e *H. nigromaculatus* exibem sítios simples e *H. ancistroides* e *H. tapijara* exibem sítios múltiplos. Aparentemente, o sítio intersticial de rDNA 5S presente num par cromossômico metacêntrico é constante nas espécies de *Hypostomus*, conforme verificado nas quatro espécies analisadas. Desta forma, é possível que tal sítio represente uma condição primitiva dentro do gênero. Ainda em relação aos sítios ribossomais, foi verificada a ocorrência de sintenia com sobreposição destes dois genes em *H. ancistroides* e *H. tapijara*. Dado que a sintenia de genes ribossomais é considerada basal dentro de Loricariidae em função de sua presença no grupo irmão Trichomycteridae, é possível que tal situação encontrada em *H. ancistroides* e *H. tapijara* seja um resquício dessa condição primitiva, enquanto que em *H. iheringii* e *H. nigromaculatus* rearranjos cromossômicos devem ter propiciado o surgimento de uma condição derivada.

Nas quatro espécies analisadas, a sequência (GATA)<sub>n</sub> e os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* apresentaram padrão disperso. Possivelmente, a distribuição dispersa da sequência (GATA)<sub>n</sub> e dos retroelementos *Rex*, aliada à abundância de tais elementos no genoma das espécies aqui estudadas, possa estar relacionada à grande diversidade cariotípica encontrada em *Hypostomus*.

Estudos cromossômicos no gênero *Hypostomus* têm identificado a existência de grande variação cariotípica no grupo, a qual vai desde a exibição de caracteres derivados, como a recorrência de números diploides elevados e NORs múltiplas, até a manutenção de características primitivas, como a sintenia dos genes ribossomais, características estas aqui representadas em *H. ancistroides* e *H. tapijara*. Além disso, vale ressaltar outras tendências evolutivas do grupo, a exemplo do processo de heterocromatinização observado em *H. iheringii* e a participação de elementos repetitivos como a sequência (GATA)<sub>n</sub> e os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* na evolução cariotípica do grupo. Desta maneira, torna-se evidente a complexidade cromossômica deste gênero, a qual é acompanhada por uma grande variação morfológica, enfatizando o interessante modelo que este gênero pode representar na evolução cromossômica dos peixes neotropicais.