



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

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo.

Daniel Rodrigues Blanco

SÃO CARLOS

- 2012 -

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo.

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

**Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero
Harttia (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs
repetitivos na evolução cariotípica do grupo.**

DANIEL RODRIGUES BLANCO

**Tese de Doutorado 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 para a obtenção de título de
Doutor em Ciências, área de
concentração: Genética e Evolução.**

SÃO CARLOS

- 2012 -

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

B641ec

Blanco, Daniel Rodrigues.

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo / Daniel Rodrigues Blanco. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

167 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Citogenética de peixes. 2. Cascudo (Peixe). 3. *Harttia*. 4. DNA repetitivo. I. Título.

CDD: 597.087322 (20^a)

“Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo”

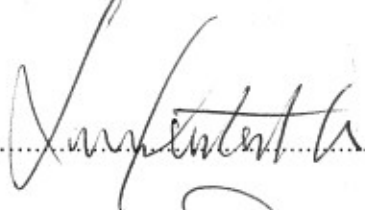
Tese de Doutorado de
DANIEL RODRIGUES BLANCO

Banca Examinadora:

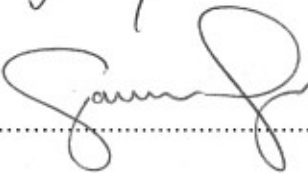
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho


.....

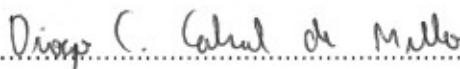
Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo


.....

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior


.....

Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello


.....

Prof. Dr. José Carlos Pansonato Alves


.....

Dedico este trabalho aos meus pais
Reinaldo Jesus Blanco e Maria de
Lourdes Rodrigues Blanco, e à
minha namorada Lallucha pelo
amor, apoio e confiança

“Foco no objetivo, Força para lutar e Fé para conseguir”

**“Quando se tem uma meta, o que era um obstáculo passa a ser apenas uma
etapa”.**

(Gerhard Erich Boehme)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que tenho em minha vida.

Gostaria de expressar meus agradecimentos aos meus pais: Reinaldo Jesus Blanco e Maria de Lourdes Rodrigues Blanco; e a minha namorada Lallucha por todo amor, carinho, dedicação, compreensão, compartilhando desde momentos de alegria até de extrema angústia. Obrigado por tudo. Amo vocês !!!

Ao meu “Pai Científico”, Amigo e Orientador, Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, obrigado por toda dedicação, pela excelente orientação, por todas as oportunidades e por sempre acreditar que seria possível! Valeu Paizão!!

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, meu coorientador e amigo, obrigado pelas considerações, pelo empenho, dedicação e principalmente pela amizade.

Aos professores Dr. Vladimir Pavan Margarido (UNIOESTE), Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo (UFSCar), Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG), Dra Viviane Nogaroto (UEPG) e Dra Mara Almeida (UEPG) pelas sugestões, companherismo e pela oportunidade de convívio. Ao professor Dr. Pedro Galetti Jr. pelos poucos momentos, porém de fundamental importância.

Ao Dr. Osvaldo T. Oyakawa, por estar sempre à disposição para identificar e depositar os exemplares de *Harttia*, assim como pela amizade.

Gostaria de agradecer ao meu “irmão” Roberto L. Lui, pela parceria e pelo enriquecimento pessoal e profissional oriundo do convívio fora e dentro do laboratório. Valeu Fiiiiiii!!!

Gostaria de agradecer aos amigos de laboratório: Josi, Juliana, Marcelo e Eli, pela amizade, pelos momentos de ajuda, descontração e pelo empenho em formar um grupo de citogenética.

Aos amigos e técnicos de laboratório e coleta Pedro Gallo (Cocó) e Luiz Henrique (Piau), obrigado por não medir esforços nas coletas e pela amizade que se fortalece a cada dia.

À Prof. Dr. Angélica Maria Penteado Martins Dias e ao Prof. Dr. Manuel Martins Dias Filho do INCT Hympar Sudeste da Universidade Federal de São Carlos pela amizade e por possibilitar a obtenção de fotografias, em seu laboratório, dos exemplares sob Lupa e MEV. Gostaria de agradecer também à Dr. Luciana Bueno dos Reis Fernandes, pela autoria das mesmas.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a toda à estrutura institucional e humana que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo e à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo 2009/15741-0), que muito auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Brasileiro de meio Ambiente – IBAMA – e ao Instituto Estadual de Floresta – IEF-MG, pela autorização a 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

DANIEL RODRIGUES BLANCO – Nascido em 4 de Novembro de 1981, na cidade de São Carlos, SP, Brasil. Iniciou sua graduação na Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Rio Claro e após dois anos concluídos transferiu-se para o curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, graduando-se em dezembro de 2007. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC em 2005 e, posteriormente, bolsista FAPESP em 2006 e 2007. Tornou-se Mestre em 2010 com a dissertação intitulada: “*Caracterização citogenética em populações alopátricas do gênero Hoplias (Characiformes, Erythrinidae), com enfoque nos grupos malabaricus e lacerdae*” (FAPESP - Proc: 2007/57301-1) e defendida, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo (UFSCar), junto ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar, com menção de Louvor. Em seguida ingressou no Doutorado pelo mesmo programa, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG), sendo bolsista FAPESP. Durante esse período, participou de vários projetos de pesquisa coordenados por seu orientador e co-orientador. Apresenta 13 artigos publicados em periódicos da área e 1 aceito. Orientou uma monografia. Participou de 14 eventos científicos da área, nos quais apresentou 45 trabalhos. Ministrou dois cursos de curta duração e participou como membro efetivo de 2 bancas de TCC.

Sumário

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	IV
Resumo	V
Abstract	VII
1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais da família Loricariidae e da subfamília Loricariinae	1
1.2. Estudos citogenéticos em Loricariidae, com enfoque em Loricariinae	3
1.3. Citogenética do gênero <i>Harttia</i>	4
1.4. DNA repetitivo	6
2. Justificativa	11
3. Objetivos	12
4. Materiais / Métodos	13
4.1. Metodologia Clássica	16
4.1.1. Tratamento “in vivo”	16
4.1.2. Tratamento “in vitro”	17
4.1.3. Bandeamento C	18
4.1.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Núcleolos (RONs)	18
4.2. Metodologia Molecular	19
4.2.1. Extração de DNA com tampão salino	19
4.2.2. Sequenciamento nucleotídico	19
4.2.3. Análise das sequências nucleotídicas	19
4.2.1. Dupla Hibridização in situ Fluorescente (Double-FISH)	20
4.3. Análises cariotípicas	21
5. Referências Bibliográficas (referentes à Introdução e aos Materiais / Métodos)	22
6. Resultados / Discussão	34
Capítulo I – Origem do sistema sexual XX/XY₁Y₂ em <i>Harttia carvalhoi</i>	35
Resumo	36
Introdução	37
Materiais e Métodos	38
Resultados	40
Discussão	42
Referências	47
Anexos	51
Capítulo II – Cromossomo B em <i>Harttia longipinna</i>	54
Resumo	55
Introdução	56
Material e Métodos	58
Resultados	59
Discussão	60
Referências	66
Anexos	71
Capítulo III – Sistema sexual X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y em <i>Harttia punctata</i>	73
Resumo	74
Introdução	75
Materiais e Métodos	76
Resultados	78

Discussão.....	80
Referências	85
Anexos.....	91
Capítulo IV – Diversidade cariotípica em <i>Harttia</i>	95
Resumo.....	96
Introdução.....	97
Materiais e Métodos	99
Resultados	101
Discussão.....	105
Referências	111
Anexos.....	116
Capítulo V – Mapeamento físico de <i>Rex1</i>, <i>Rex3</i> e <i>Rex6</i> em espécies de <i>Harttia</i>	121
Resumo.....	122
Introdução.....	123
Materiais e Métodos	125
Resultados	127
Discussão.....	129
Referência.....	134
Anexos.....	141
Capítulo VI – Correlação entre Aspectos biológicos e diversidade cromossômica.....	144
Resumo.....	145
Introdução.....	145
Material e Métodos.....	148
Resultados / Discussão	149
Referências	156
Anexos.....	160
Considerações Finais.....	165

Lista de Figuras

Materiais e Métodos

Figura 1. Mapa com pontos de coleta das espécies do gênero *Harttia* analisados no presente trabalho. Cada ponto no mapa a direita corresponde a uma espécie: Roxo: *H. kronei*; Laranja: *H. longipinna*; Preto: *H. gracilis*; Vermelho: *H. punctata*; Amarelo: *H. loricariformis*; Azul: *H. torrenticola*; Verde: *H. carvalhoi*. ----- **14**

Figura 2. Foto das espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho: (a) *Harttia kronei* com 7.43 cm, (b) macho de *H. longipinna* com 9.7 cm, (c) fêmea de *H. longipinna* com 8.5 cm, (d) *H. gracilis* com 12.1 cm, (e) *H. punctata* com 14.5 cm (f) *H. loricariformis* com 8.92 cm, (g) *H. torrenticola* com 9.05 cm, (h) *H. carvalhoi* com 7.16 cm----- **15**

Capítulo I

Figura 1. Cariótipos de *Harttia kronei* (a, b), *H. torrenticola* (c, d) e *H. carvalhoi* (fêmeas e, f; machos g, h), submetidos a coloração convencional por Giemsa (a, c, e, g) e bandamento C (b, d, f, h). Os cromossomos portadores das Ag-NORs estão em destaque. Barra = 10 µm. ----- **51**

Figura 2. Metáfases de *Harttia kronei* (a, b), *H. torrenticola* (c, d) e *H. carvalhoi* (e, f). Double-FISH (a, c, e) com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA 18S (sinal verde) e hibridização simples com sonda de sequências teloméricas [TTAGGG]_n (b, d, f). As setas indicam a presença de ITS nos cromossomos. Em destaque, o primeiro par metacêntrico de *H. torrenticola* e o cromossomo X correspondente em *H. carvalhoi*. Barra=10µm.----- **52**

Figura 3. Provável via de diferenciação cariotípica entre espécies de *Harttia* e a formação do sistema sexual XX/XY₁Y₂ em *Harttia carvalhoi*. ----- **53**

Capítulo II

Figura 1. Cariótipo de *H. longipinna*. (1) Coloração convencional por Giemsa, (2) Bandamento C, com Ag-NOR em destaque, (3) Double-FISH com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho), (4) Metáfase submetida a hibridização com sonda de DNA telomérico. A seta indica o cromossomo B. Barra=10 µm.----- **71**

Capítulo III

Figura 1. Cariótipos de fêmea (1, 2) e macho (3, 4) de *Harttia punctata* submetidos à coloração convencional por Giemsa (1, 3), bandamento C (2, 4) e Ag-NOR (em Box). Barra = 10 µm. ----- **91**

Figura 2. Cariótipos de fêmea (1) e macho (2) de *Harttia punctata* submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S (sinal verde) e rDNA 18S (sinal vermelho). Metáfase de macho de *H. punctata* submetidos à FISH com sonda de sequência telomérica (3). Barra = 10 µm. ----- **92**

Figura 3. Pintura cromossômica total com sondas dos cromossomos X₁ (sinal vermelho) e X₂ (sinal verde) em metáfase de fêmea (a, b, c) e macho (d, e, f) de *H. punctata*.----- **93**

Figura 4. Esquema da provável origem do sistema sexual X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y de *Harttia punctata*.----- **94**

Capítulo IV

Figura 1. Cariótipos das espécies de *Harttia* submetidos à coloração convencional. Ag-NORs em destaque. Barra = 10µm. ----- **117**

Figura 2. Cariótipos das espécies de *Harttia* submetidos ao bandamento C. Barra = 10µm. ----- **118**

Figura 3. Cariótipos das espécies de *Harttia* submetidas à Double-FISH com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA18S (sinal verde). Barra = 10µm. ----- **119**

Figura 4. Metáfases das espécies de *Harttia* submetidas à FISH com sonda de sequência [TTAGGG]_n. As setas indicam ITS (Interstitial Telomeric Sites). Barra = 10µm. ----- **120**

Capítulo V

Figura 1. Sequências dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* isolados de *Harttia kroni*. ----- **141**

Figura 2. Metáfases das espécies do gênero *Harttia* submetidas à hibridização *in situ* com sondas de retroelementos *Rex*. Barra = 10µm. ----- **142**

Figura 3. Metáfases das espécies do gênero *Harttia* submetidas à hibridização *in situ* com sondas de retroelementos *Rex*. Barra = 10µm. ----- **143**

Capítulo VI

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho.----- **160**

Figura 2. Vista dorsal (a) e lateral (b) de *H. longipinna*. Aparelho bucal de *H. carvalhoi* (c). Nadadeira peitoral de macho de *Harttia* com ênfase nos odontóides (d). Ênfase dessas estruturas sob microscopia eletrônica de varredura (e). Destaque para disposição dos dentes bifurcados. ----- **161**

Figura 3. Fêmea de *Harttia* apresentando gônadas maduras. Destaque para os ovócitos maduros (a) e para a cavidade abdominal contendo os mesmos (b). ----- **162**

Figura 4. Cariograma das espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho. Heterocromatina = preto; rDNA5S = azul; rDNA18S = vermelho.----- **163**

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1. Frequência de cromossomo B em população natural de <i>Harttia longipina</i>	72
--	-----------

Capítulo IV

Tabela 1. Dados cromossômicos das espécies de <i>Harttia</i> analisadas até o presente momento.	116
---	------------

Capítulo VI

Tabela 1. Maior comprimento total encontrado em machos e fêmeas das espécies analisadas no presente trabalho, assim como a média (χ) dos ovócitos maduros de algumas espécies.	164
---	------------

Resumo

Dentre os Siluriformes, a família Loricariidae é a mais numerosa, contendo cerca de 800 espécies distribuídas em aproximadamente 100 gêneros. Esta família é subdividida em seis subfamílias: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Delturinae e Hypostominae. *Harttia* é um pequeno gênero da subfamília Loricariinae que abriga os peixes que apresentam o corpo alongado, nadadeira adiposa e quilha lateral do tronco ausentes, nadadeira caudal emarginada e grandes placas ósseas circundando a papila anal. Habitam preferencialmente riachos e alguns trechos de calha principal de rios, e por não apresentarem hábitos migratórios formam pequenas populações semi-isoladas. Para este gênero são descritas aproximadamente vinte e três espécies. Dessas, dezessete estão alocadas em bacias hidrográficas brasileiras, entretanto poucas espécies foram, até então, analisadas no tocante às metodológicas citogenéticas. Desta forma este trabalho caracterizou, por meio de metodologias de citogenética clássica (Giemsa, bandamento C e Ag-NOR) e molecular (hibridizações com sonda de rDNA 5S, rDNA 18S, sequência [GATA]_n, sequência [TTAGGG]_n, além de retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*), 7 espécies do gênero *Harttia*: *H.kronei*, *H.gracilis*, *H.longipinna*, *H.punctata*, *H.loricariformis*, *H.torrenticola* e *H.carvalhoi*. Este trabalho traz a primeira descrição cromossômica para as espécies *H. gracilis*, *H. longipinna*, *H. punctata* e *H. torrenticola*. Os dados cromossômicos obtidos possibilitaram inferir que o sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY₁Y₂, encontrado em *H. carvalhoi*, originou-se de um evento de fissão cêntrica de um cromossomo metacêntrico originado por um evento de fusão ocorrido antes da diversificação do clado constituído por *H. carvalhoi* e *H. torrenticola*. Na análise cromossômica de uma população de *H. longipinna* foi verificada a presença de até 2 micro cromossomos B em 46% dos exemplares analisados. Os dados obtidos possibilitaram a detecção e caracterização de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y em *H. punctata* possivelmente originado por um evento inversão com subsequente translocação entre os

dois primeiros pares acrocêntricos, cromossomos estes portadores dos sítios ribossomais 5S e 18S. As hibridações com os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* mostraram que esses elementos encontram-se altamente dispersos no genoma de todas as espécies analisadas, tanto em regiões heterocromáticas, quanto eucromáticas. Apesar dos elementos transponíveis estarem frequentemente associados a rearranjos cromossômicos devido a sua capacidade de movimentação no genoma, para as espécies do gênero *Harttia*, o acúmulo das sequências *Rex* pode não estar correlacionada aos rearranjos cromossômicos. É provável que estas sequências possam ter uma atividade na regulação gênica, uma vez terem sido localizados em grande quantidade em regiões eucromáticas. Os dados referentes a aspectos biológicos do gênero *Harttia* permitem inferir que a restrição do fluxo gênico propiciado pelo isolamento das bacias hidrográficas pode ter contribuído para a fixação de diferentes rearranjos cromossômicos entre as espécies avaliadas. A grande diversidade cromossômica, aqui representada por: (i) diferentes números diploide e fórmulas cariotípicas encontradas entre as diferentes espécies analisadas, (ii) pela presença de cromossomos supranumerários em *H. longipinna* e sistemas de cromossomos sexuais múltiplos encontrados em *H. carvalhoi* e *H. punctata*, (iii) alocação diferenciada dos sítios de rDNA 5S e 18S entre as espécies; faz com que o gênero *Harttia* seja um excelente modelo para estudos de evolução cromossômica.

Abstract

Among the Siluriformes, the Loricariidae family is the most numerous, containing approximately 800 species distributed in approximately 100 genera (Eschmeyer & Fricke 2012). Loricariidae is subdivided into six subfamilies: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Delturinae and Hypostominae. *Harttia* is a small genus of the Loricariinae subfamily that includes the fish popularly known as armored catfish. Members of this subfamily are characterized by a long and depressed caudal peduncle, the absence of adipose fin, caudal fin emarginated and large bony plates surrounding the anal papilla. They inhabit specific regions of the rivers and streams, and form small semi-isolated populations because they have not migratory habits. In this genus are described nineteen species, of which seventeen are allocated in Brazilian basins, however only a few species had been analyzed by cytogenetic methods. Thus this work characterized, by conventional (Giemsa, C-banding and Ag-NOR) and molecular cytogenetics methods (hybridizations with 5S rDNA, 18S rDNA, [GATA]_n, [TTAGGG]_n, *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* probes), 7 species of *Harttia*: *H.kronei*, *H.gracilis*, *H.longipinna*, *H.punctata*, *H.loricariformis*, *H.torrenticola* and *H.carvalhoi*. This paper presents the first chromosomal description for the species: *H.gracilis*, *H.longipinna*, *H.punctata* and *H.torrenticola*. The chromosome data obtained allowed to infer that the sex chromosome system XX/XY₁Y₂, found in *H.carvalhoi*, originated from a centric fission event of a metacentric chromosome formed by a fusion event occurred before the diversification of the clade formed by *H.carvalhoi* and *H.torrenticola*. In the chromosomal analysis of a population of *H.longipinna* was verified up to 2 micro B chromosomes. The data obtained enabled the detection and characterization of the sex chromosome system X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y in *H.punctata* possibly caused by a translocation event between the first two acrocentric pairs, chromosomes that carrying the 5S and 18S rDNA sites. The hybridizations with the *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* retroelements showed that these elements are highly dispersed in the genome of the species

analyzed, both in heterochromatic regions as euchromatic regions. Although transposable elements are often associated with chromosomal rearrangements due to its ability to move in the genome, for the species of the *Harttia*, the accumulation of *Rex* sequences can not be correlated to chromosomal rearrangements. It is likely that these sequences can have an activity in gene regulation since it was found in large quantities in euchromatic regions. The data regarding biological aspects of *Harttia* allow infer that the restriction of gene flow brought about by isolation of the watersheds may have contributed to the fixation of the chromosomal rearrangements among the analyzed species. The great chromosomal diversity, here represented by: (i) different diploid numbers and karyotype formulas found between different species analyzed, (ii) for the presence of supernumerary chromosomes in *H. longipinna* and multiple sex chromosomes systems found in *H. carvalhoi* and *H. punctata*, (iii) allocation differentiated of the sites of 5S and 18S rDNA, makes the *Harttia* genus an excellent model for studies of chromosomal evolution.

1. Introdução

A citogenética de peixes Neotropicais, que teve seu início na década de 70, vem contribuindo em muito para o conhecimento desse grupo de vertebrados, apresentando informações relevantes sobre os processos evolutivos que promovem sua diversidade, tais como polimorfismos estruturais e/ou numéricos, rearranjos cromossômicos e sistema de cromossomos sexuais heteromórficos.

Com o advento da biologia molecular, estudos referentes aos DNAs repetitivos têm despertado um crescente interesse no meio científico. Estudos da organização, estrutura, composição e localização *in situ* dessa classe de DNA repetitivo têm promovido grandes avanços no entendimento da evolução genômica e cariotípica, pois essas frações particulares do genoma são excelentes marcadores cromossômicos que estão diretamente envolvidos com extensivos mecanismos de diversificação dos genomas dos peixes, sendo importantes na elucidação de mecanismos envolvidos na evolução cromossômica, principalmente relacionadas à composição e origem de cromossomos B, na diferenciação de cromossomos sexuais e função de domínios heterocromáticos específicos em determinados grupos.

1.1. Aspectos gerais da família Loricariidae e da subfamília Loricariinae

Loricariidae compreende os peixes popularmente conhecidos como cascudos e acaris. Podem ocupar habitats bem variados, vivendo tanto em ambientes lóticos ou lênticos, em rios não muito profundos com fundo arenoso ou pedregoso. Apresentam corpo achatado e recoberto por placas dérmicas, boca em forma de ventosa localizada na região ventral e nadadeiras anatomicamente modificadas. Sua distribuição abrange grande parte da região Neotropical, desde o norte da Costa Rica até o sul da Argentina (Reis *et al.*, 2003). São caracterizados pela baixa fecundidade, com relativamente poucos ovos grandes. Em alguns casos, há dimorfismo sexual e cuidado parental

(Menezes, 1949), o que é comparável às condições observadas nas espécies de ciclídeos dos rios do leste africano (Schaefer & Stewart, 1993).

De acordo com Ferraris (2007), a família Loricariidae é a segunda mais numerosa entre os peixes neotropicais. Recentemente, Eschmeyer & Fricke (2012) descreveram 834 espécies reconhecidas em Loricariidae alocadas em cerca de 100 gêneros. Reis *et al.* (2006) levando em consideração os estudos realizados por Armbruster (2004) sugeriram que Loricariidae é dividida em seis subfamílias: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Delturinae e Hypostominae. A subfamília Hypostominae encontra-se subdividida em cinco tribos: Corymbophanini; Rhineleporini; Pterygoplichtini; Ancistrini e Hypostomini.

Loricariinae apresenta algumas peculiaridades morfológicas: cabeça, corpo e pedúnculo caudal achatados; corpo alongado, “focinho” projetado para frente (Ferraris, 2003). Outra característica relevante é a presença de dimorfismo sexual, caracterizado pelo tamanho e localização dos odontóides na cabeça, corpo, pela nadadeira peitoral, e pela forma do lábio inferior (Reis *et al.*, 2003). Esta subfamília é encontrada principalmente nos rios da América do Sul, desde a bacia de *La Plata* até os rios do sul do México. Poucas espécies ocorrem na costa do Pacífico, nos rios da Colômbia, Equador e Panamá.

Loricariinae tem sido considerada um grupo monofilético bem definido, sendo grupo irmão de Hypostominae (Schaefer, 1987; Pinna, 1998), apresentando 209 espécies distribuídas em 31 gêneros (Ferraris, 2007). A maior parte das espécies desta subfamília é de tamanho pequeno a médio, sendo *Spatuloricaria euacanthagenys* a maior espécie encontrada, atingindo mais de um metro e meio, enquanto que *Hartiella crassicauda* é a menor espécie atingindo poucos centímetros (Reis *et al.*, 2003).

1.2. Estudos citogenéticos em Loricariidae, com enfoque em Loricariinae

Apesar de ser uma família muito grande, apenas cerca de 100 das mais de 800 espécies pertencentes à Loricariidae foram estudadas por metodologias citogenéticas. Esta família possui grande variabilidade no que se refere ao número diploide, variando de 34 cromossomos em *Ancistrus cuiabae*, *Ancistrus* sp. 1 e *Ancistrus* sp. 2 (Oliveira, 2006; Mariotto *et al.*, 2011) a 96 cromossomos em *Upsilonodus* sp. (Kavalco *et al.*, 2004b). A macroestrutura cariotípica também é muito variável, podendo ocorrer somente cromossomos meta-submetacêntricos, como em *Otocinclus affinis* que possui $2n=54$ cromossomos e $NF=108$ (Andreatta *et al.*, 1994) ou cariótipos formados predominantemente por cromossomos subtelo-acrocêntricos como em *Hypostomus strigaticeps* que possui $2n=74$ cromossomos e $NF=86$ (Michele *et al.*, 1977).

Em Loricariinae, apesar de apenas 15 espécies pertencentes à cinco gêneros terem sido estudadas citogeneticamente, tem-se verificado uma grande diversidade cariotípica (Kavalco *et al.*, 2005). Uma avaliação dos dados mostra uma grande variabilidade quanto ao número diploide, desde 36 cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998) a 74 cromossomos em *Sturisoma cf. nigrirostrum* (Artoni & Bertollo, 2001). Michelle *et al.* (1977) estudando *Loricaria macrodon* evidenciaram um número diploide igual a 58 cromossomos. *Loricariichthys platymetopon* apresenta número diploide de 54 cromossomos (Scavone & Júlio Jr., 1995). Alves *et al.* (2003, 2005) evidenciaram para *H. kronei* $2n=58$ cromossomos; *Rineloricaria pentamaculata* $2n=56$ e *Rineloricaria kronei* $2n=64$ cromossomos, e Kavalco *et al.* (2004b) evidenciaram para *Harttia loricariformis* $2n=56$ cromossomos. Rodrigues (2010) encontrou em uma população de *Harttia* sp. n. coletada no rio Passa-Cinco, estado de São Paulo, um número diploide de 62 cromossomos.

Nesta subfamília são frequentes os exemplos de polimorfismo relacionados ao número cromossômico e fórmula cariotípica. Scavone & Julio Jr. (1994) observaram cromossomos supranumerários em 2 espécies de *Loricaria*. Em *Rineloricaria latirostris* ocorreu uma variação de

2n=36 a 48 cromossomos (Giuliano-Caetano, 1998) e Errero-Porto (2007) encontrou em *Rineloricaria pentamaculata* um número diploide constante com 56 cromossomos, mas duas fórmulas cariotípicas diferentes, além da presença de cromossomos B. Por sua vez, Rosa *et al.* (2012) encontraram uma variação de 2n=70 – 66 cromossomos em *Rineloricaria lima* com evidências de fusão cromossômica detectada pelo marcador rDNA 5S, presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS).

Sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos já foram evidenciados em Loricariinae. Scavone & Júlio Jr. (1995) encontraram o sistema sexual do tipo ZZ/ZW para *Loricariichthys platymetopon*, enquanto Centofante *et al.* (2006) encontraram sistema do tipo XX/XY₁Y₂ em *Harttia carvalhoi*.

Essa grande diversidade cariotípica aliada ao fato de que as diferenças morfológicas nem sempre são evidentes, colocam esta subfamília entre aquelas que apresentam dificuldades em sua taxonomia, assim como na compreensão de suas relações evolutivas.

1.3. Citogenética do gênero *Harttia*

Steindachner (1876) descreveu o gênero *Harttia*, com base na forma do corpo alongado, nadadeira adiposa e quilha lateral do tronco ausente, nadadeira caudal emarginada e grandes placas ósseas circundando a papila anal, para abrigar a espécie *Harttia loricariformis* (Oyakawa, 1993).

Harttia apresenta uma limitada capacidade de dispersão, formando pequenos isolados populacionais. A maioria das espécies deste gênero habita as cabeceiras de pequenos afluentes, porém algumas espécies habitam restritas regiões na calha principal de alguns rios. Buckup (1999) afirma que a identificação de áreas de endemismo associadas aos eventos de vicariância é um campo promissor para estudos de ordem genética e evolutiva, enfatizando a necessidade de se ampliar os

conhecimentos sob a peculiar ictiofauna dessas áreas como, por exemplo, a cabeceiras de rios e riachos.

Estudos citogenéticos e morfológicos em espécies que estão restritas as cabeceiras de riachos já foram realizados. Em *Astyanax scabripinnis* estas análises demonstraram tratar-se de um complexo de espécies, ocorrendo uma grande diversidade cromossômica que não é acompanhada por uma diferenciação morfológica pronunciada (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Diferentemente, no gênero *Harttia* as espécies são muito bem definidas e de fácil reconhecimento pelos taxonomistas. Existem aproximadamente vinte e três espécies conhecidas do gênero *Harttia*. Destas, dezessete são encontradas em território brasileiro, distribuídas em diversas bacias brasileiras: *H. carvalhoi* Miranda Ribeiro, 1939; *H. depressa* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001; *H. dissidens* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001; *H. duriventris* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001; *H. garavelhoi* Oyakawa, 1993; *H. gracilis* Oyakawa, 1993; *H. kronei* Miranda Ribeiro, 1908; *H. leiopleura* Oyakawa, 1993; *H. longipinna* Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001; *H. loricariformis* Steindachner, 1876; *H. novalimensis* Oyakawa, 1993; *H. punctata* Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001; *H. rhombocephala* Miranda Ribeiro, 1939; *H. torrenticola* Oyakawa, 1993; *H. trombetensis* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001; *H. uatumensis* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001; e *Harttia* sp. n., sendo onze delas descritas para rios da região Sudeste, cinco para região Norte e uma para região Centro Oeste. Das 23 espécies de *Harttia*, somente 4 espécies foram caracterizadas citogeneticamente: *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003), *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004b), *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010)

A macroestrutura cariotípica das espécies analisadas é muito diversificada. O número diploide varia de 52 cromossomos encontrados em fêmeas de *Harttia carvalhoi* proveniente do Ribeirão Grande na bacia do rio Paraíba da Sul – SP (Centofante *et al.*, 2006) a 62 cromossomos (14m+22sm+16st+10a, NF=114) em *Harttia* sp.n, proveniente da bacia do Passa-Cinco - SP

(Rodrigues, 2010). Alves *et al.* (2003) caracterizaram uma população de *H. kroni*, proveniente do rio Betari – SP e encontraram um número diploide de 58 cromossomos (40s/SM+18st, NF=98). Kavalco *et al.* (2004b) encontraram em uma população de *Harttia loricariformis* do rio dos Macacos - SP (bacia do rio Paraíba do Sul) $2n=56$ cromossomos (16m+22sm+10st+8a, NF= 106). Centofante *et al.* (2006) caracterizaram uma população de *Harttia carvalhoi* do ribeirão Grande na bacia do rio Paraíba do Sul (SP), encontrando número diploide de 52 cromossomos (18m+18sm+4st+4a) para as fêmeas e 53 cromossomos (17m+18sm+4st+6a) para os machos, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX / XY₁Y₂.

Até o presente momento, pouco dados referentes ao mapeamento de sequências repetitivas foram obtidos no gênero *Harttia*. Kavalco *et al.* (2004a) encontraram apenas um sítio de rDNA 5S na posição intersticial de um par cromossômico acrocêntrico grande de *Harttia loricariformis*. Segundo Kavalco *et al.* (2005) este mesmo par é portador do cístron de rDNA 18S na porção proximal configurando, assim, uma marcação sintênica. Configuração similar foi relatada por Centofante *et al.* (2006) ao encontrarem o maior par acrocêntrico de *Harttia carvalhoi* portando um sítio de rDNA 5S na porção terminal do braço longo e um sítio de rDNA 18S na porção proximal. Entretanto os mesmos autores encontraram, nesta mesma espécie, um sítio extra de rDNA 5S em um cromossomo metacêntrico pequeno.

1.4. DNA repetitivo

O genoma dos organismos eucariotos apresenta porções heterocromáticas, a qual aloca a maioria das famílias de DNAs repetitivos. Estes podem ser definidos como segmentos de tamanhos variados repetidos milhares de vezes no genoma, sendo classificados em codificador, com funções biológicas bem definidas, e não codificador cujo conjunto de sequências se encontra dispersa no genoma ou se repetem em tandem (Griffiths *et al.*, 2006). Entre os codificantes, as famílias

multigênicas ribossomais 45S, além do rDNA 5S são os mais amplamente estudados. Com relação à classe não codificante, este pode estar organizado em *tandem* no genoma como, por exemplo, os microssatélites, minisatélites e DNA satélites; ou disperso pelo genoma, como por exemplo, os elementos transponíveis.

A análise de sequências de DNA repetitivos vem sendo muito utilizada em peixes, pois levam a dados consistentes, que ajudam na melhor compreensão da evolução genômica de determinadas espécies, auxiliando na detecção de homeologias cromossômicas, diversificação de cromossomos sexuais e origem de cromossomos B (Vicari *et al.*, 2010). Além disso, todas as classes de elementos transponíveis são encontradas no genoma de peixes (Volf *et al.*, 2003).

Uma considerável porção do genoma dos eucariotos superiores consiste de heterocromatina constitutiva, preferencialmente na região centromérica e pericentromérica (Corradini *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2007), embora há descrição desse tipo de DNA em região telomérica e intersticial (Adega *et al.*, 2007; Meles *et al.*, 2008). Essa porção do genoma é, na maioria das vezes, composta por sequências de DNAs altamente repetitivos denominados DNAs satélite (satDNA) (John, 1988; Chaves *et al.*, 2004), e organizados dentro de arranjos longos ininterruptos em *tandem* de unidades variáveis (Charlesworth *et al.*, 1994).

Essas regiões são caracterizadas por se apresentarem compactadas durante o ciclo celular e estão relacionadas, na maioria dos casos, com a inatividade transcricional (Beridze, 1986; Vicari *et al.*, 2008b). Porém, alguns genes podem se apresentar intercalados com regiões heterocromáticas, sem que ocorra sua inativação (Lohe & Hilliker, 1995; Pimpinelli *et al.*, 1986).

Com relação aos DNA satélites a primeira descrição em peixes Neotropicais foi realizada por Haaf *et al.* (1993) para *Hoplias malabaricus* pertencente à família Erythrinidae. Desde então, várias famílias de DNAs repetitivos já foram prospectadas de diferentes espécies de peixes neotropicais como, por exemplo: As51 isolado por Mestriner *et al.* (2000) de *Astyanax scabripinnis*; pPh2004

isolado por restrição genômica de *Parodon hilarii* Vicente *et al.* (2003), SATH1 e SATH2 isolados por restrição genômica em *Prochilodus lineatus* (Jesus *et al.*, 2003), 5SHindIII isoladas de *Hoplias malabaricus* (Martins *et al.*, 2006), Al-HindIII isolado de *Achirus lineatus* por Azevedo *et al.* (2005); elemento repetitivo LeSpeI isolado do genoma de *Lepirunus elongatus* (Parise-Maltempo *et al.*, 2007); retroelemento RCK isolado de *Cichla kelberi* (Teixeira *et al.*, 2009); WAp da fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon ibitiensis* (Vicari *et al.*, 2010); sonda oriunda do cromossomos B de *Prichilodus lineatus* (Voltolin *et al.*, 2010); entre outros. Considerando a grande dinâmica evolutiva dos DNA repetitivos (Wichman *et al.*, 1991) relataram que estas sequências podem promover informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-específicas e/ou cromossomo específicas (Ugarkovic & Plohl, 2002), assim como estudos filogenéticos (Pons *et al.*, 2002; Pons & Gillespie, 2003; Kantek *et al.*, 2009).

Outra classe de DNA satélite que vem sendo explorada em estudos evolutivos em peixes é a denominada Bkm (Banded Krait Minor) que se encontra amplamente distribuída entre os eucariotos, e, apresenta como maior componente, a repetição de tetranucleotídeos [GATA]_n. A sequência GATA foi primeiramente descrita por Eppelen *et al.* (1982) como o maior componente do DNA satélite de *Elaphe radiata*. Vários estudos demonstraram que esta sequência apresenta-se conservada entre diferentes espécies, incluindo humanos (Srivastava *et al.*, 2008) e parece estar associada na determinação e evolução de cromossomos sexuais. Além disso, esta sequência não está presente em organismos procariotos.

Os DNAs ribossomais (rDNA) são sequências repetitivas dispostas em *tandem* que codificam RNA ribossômico. O mapeamento físico, por FISH, dos DNAs ribossomais (em especial o rDNA 5S e o rDNA 18S) vem sendo utilizado com grande frequência em estudos citogenéticos em peixes neotropicais (Martins & Galetti, 1999; 2000; Souza *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2005; Fernandes & Martins-Santos, 2006a; b;

Martins *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Lui *et al.*, 2009; Mariotto *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2011; Mariotto *et al.*, 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011, Pansonato-Alves *et al.*, 2011; Scacchetti *et al.*, 2012) por auxiliarem na resolução de problemas de ordem taxonômica, biogeográfica e filogenética. Entretanto para o gênero *Harttia*, até o recente momento, somente *Harttia carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e *Harttia loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004a; 2005) apresentam análises utilizando esses marcadores.

Os retrotransposons como marcadores cromossômicos também vêm sendo amplamente explorado em estudos de diversidade cariotípica em peixes. Dentre os diversos retroelementos descritos, destacam-se a família *Rex*, que foi isolada do genoma de *Xiphophorus*. Estudos mostraram que esses elementos apresentavam-se ativos durante a evolução de diferentes linhagens de peixes (Ozsouf-Costaz *et al.*, 2004). Teixeira *et al.* (2009), encontraram uma distribuição cromossômica similar de *Rex1* e *Rex3* no genoma de *Cichla kelberi*, sugerindo, assim, que essas sequências possam ter evoluído juntas, apresentando uma atividade cooperativa no genoma dessa espécie. Para algumas espécies da subfamília Hypoptopomatinae foi encontrado um padrão similar de dispersão do *Rex1* e *Rex3*, sendo alocados em pequenos clusters e dispersos por todo cromossomo, tanto em regiões heterocromáticas quanto eucromáticas, entretanto *Rex3* apresentou-se mais disperso do que *Rex1* em todas as espécies analisadas (Ferreira *et al.*, 2010). Outro retroelemento do grupo *Rex* que também já foi encontrado no genoma de peixes é o denominado *Rex6*, o qual se mostrou disperso nos cromossomos de *C. kelberi*, e não apenas alocado na região centromérica (como ocorre com *Rex1* e *Rex3*, nesta espécie) indicando, desta forma, que esse retroelemento provavelmente apresente diferentes padrões evolutivos, independente de outras sequências (Teixeira *et al.*, 2009).

Telômeros são estruturas encontradas na região terminal dos cromossomos cuja função básica é manter a integridade e estabilidade cromossômica, sendo conservada em organismos eucariotos (Slijepcevic, 1998). Os vertebrados apresentam esse tipo de repetição de sequência

[TTAGGG]_n. A utilização dessa repetição como sonda vem se mostrando uma importante ferramenta na detecção de rearranjos, principalmente com relação a fusões cêntricas recentes, indicadas pela presença de ITS -Interstitial Telomeric Sequences - (Slijepcevic, 1998).

As sequências de DNAs repetitivos citadas acima, vêm sendo utilizadas em trabalhos relacionados à evolução cromossômica de vários grupos de peixes, pois são ferramentas poderosas que auxiliam na elucidação de problemas taxonômicos (Bellafronte *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2011), filogenéticos (Teixeira *et al.*, 2009), mapeamento de genomas (Ferreira *et al.*, 2010), diferenciações populacionais (Martinez *et al.*, 2011), relações biogeográficas (Vicari *et al.*, 2005), evolução de cromossomos sexuais (Vicari *et al.*, 2008a; Schemberger *et al.*, 2011) e de cromossomos B (Jesus *et al.*, 2003, Artoni *et al.*, 2006, Vicari *et al.*, 2011), entre outros.

2. Justificativa

A associação de informações obtidas a partir da citogenética clássica e da citogenética molecular tem se mostrado uma ótima ferramenta para elucidar problemas de ordem taxonômica e evolutiva. Considerando a diversidade interespecífica já evidenciada na macroestrutura cariotípica de espécies do gênero *Harttia*, aliada à escassez de dados cromossômicos disponíveis, um aprofundamento nos estudos referentes à citogenética clássica e molecular mostra-se relevante para um melhor entendimento da evolução cariotípica desse grupo de peixes.

Embora os estudos citogenéticos em *Harttia* sejam ainda escassos, estes já enfatizam a diversidade cromossômica que se encontra presente nesse gênero, acompanhada por uma evidente diferenciação morfológica. Assim sendo, *Harttia* representa um excelente modelo para estudos de citogenética evolutiva, podendo representar um modelo interessante para abordagens dessa natureza. Desta forma, a caracterização do número e morfologia cromossômica, da estrutura cariotípica, distribuição de bandas heterocromáticas e dos sítios de regiões organizadores de nucléolos, além da identificação de prováveis sistemas de cromossomos sexuais, representam marcadores citogenéticos informativos para a citotaxonomia e biodiversidade desse grupo de peixes.

Paralelamente aos caracteres cromossômicos clássicos, as informações que vem sendo obtidas com as diversas classes de DNAs repetitivos têm se mostrado valiosas para o entendimento das relações evolutivas entre espécies e gêneros relacionados, considerando a distribuição e localização dessas sequências nos cromossomos, contribuindo também no tocante a diversas problemáticas de natureza citotaxonômica e de sistemática filogenética.

3. Objetivos

O intuito do presente trabalho foi o de contribuir para o conhecimento da biodiversidade e dos processos de diferenciação e evolução cariotípica no gênero *Harttia*, grupo até então escasso no tocante a caracteres diagnósticos que embasem esses processos. Para tanto, os seguintes objetivos foram realizados:

1. Entender a variabilidade cromossômica em *Harttia*, a partir da análise citogenética de espécies provenientes de diversas bacias hidrográficas brasileiras.
2. Analisar a organização, distribuição e localização cromossômica por hibridização *in situ* fluorescente específicas e interespecíficas de diversas classes de DNAs repetitivos.
3. Caracterizar a evolução cromossômica ocorrida neste grupo e o papel exercido pelos DNAs repetitivos, associando os caracteres da citogenética clássica e da citogenética molecular, em uma análise comparativa entre as diferentes espécies estudadas.
4. Desvendar os rearranjos cromossômicos que originaram os sistemas de cromossomos sexuais.

4. Materiais / Métodos

Exemplares de sete espécies do gênero *Harttia* foram coletados em diferentes bacias hidrográficas brasileiras: *H. kronei* (rio Açungui, bacia do rio Ribeira, município de Campo Largo, estado do Paraná, GPS: 25° 22' 44"; 49° 39' 08"), *H. longipinna* (calha principal do rio São Francisco, município de Pirapora, estado de Minas Gerais, GPS: 17° 21' 22,8"; 44° 56' 59,5"), *H. gracilis* (córrego Machadinho, afluente do rio Sapucaí, bacia do rio Sapucaí-Mirin, município de Santo Antônio do Pinhal, estado de São Paulo, GPS: 22° 48' 31"; 45° 41' 21"), *H. punctata* (rio Itiquira, bacia do Tocantins município de Formosa, estado de Goiás, GPS: 15° 19' 25"; 47° 25' 26"), *H. loricariformis* (rio Paraitinga, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Cunha, estado de São Paulo, GPS: 22° 52' 22"; 44° 51' 0,2"), *H. torrenticola* (ribeirão das Araras, bacia do rio São Francisco, estado de Minas Gerais, GPS: 20° 16' 15"; 45° 55' 39") e *H. carvalhoi* (ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, no município de Pindamonhangaba, estado de São Paulo, GPS: 22° 47' 8"; 45° 27' 19") (Fig. 1) (Fig. 2). Os espécimes de *H. kronei*, *H. longipinna*, *H. gracilis*, *H. punctata*, *H. loricariformis*, *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*. foram identificados pelo Dr. Osvaldo T. Oyakawa e depositados na coleção do Museu de Zoologia da USP (SP), sob os vouchers MZUSP 109783, MZUSP 106767, MZUSP 111384, MZUSP 111385, MZUSP 111386, MZUSP 109784, MZUSP 109782, respectivamente.

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas, arrastões e puçás. 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 até serem processados para a obtenção dos cromossomos metafásicos.

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

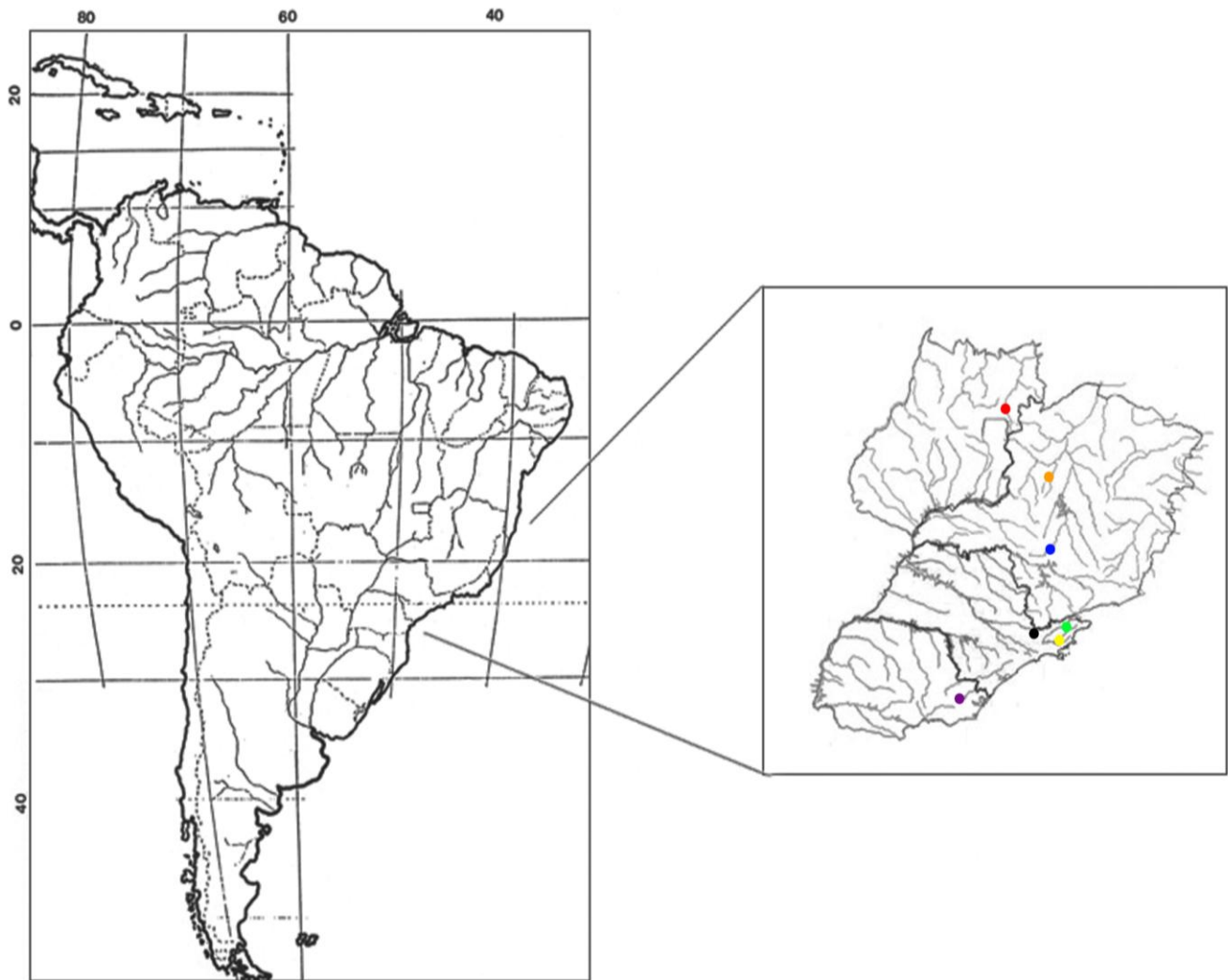


Figura 1. Mapa com pontos de coleta das espécies do gênero *Harttia* analisados no presente trabalho. Cada ponto no mapa a direita corresponde a uma espécie: Roxo: *H. kronei*; Laranja: *H. longipinna*; Preto: *H. gracilis*; Vermelho: *H. punctata*; Amarelo: *H. loricariformis*; Azul: *H. torrenticola*; Verde: *H. carvalhoi*.

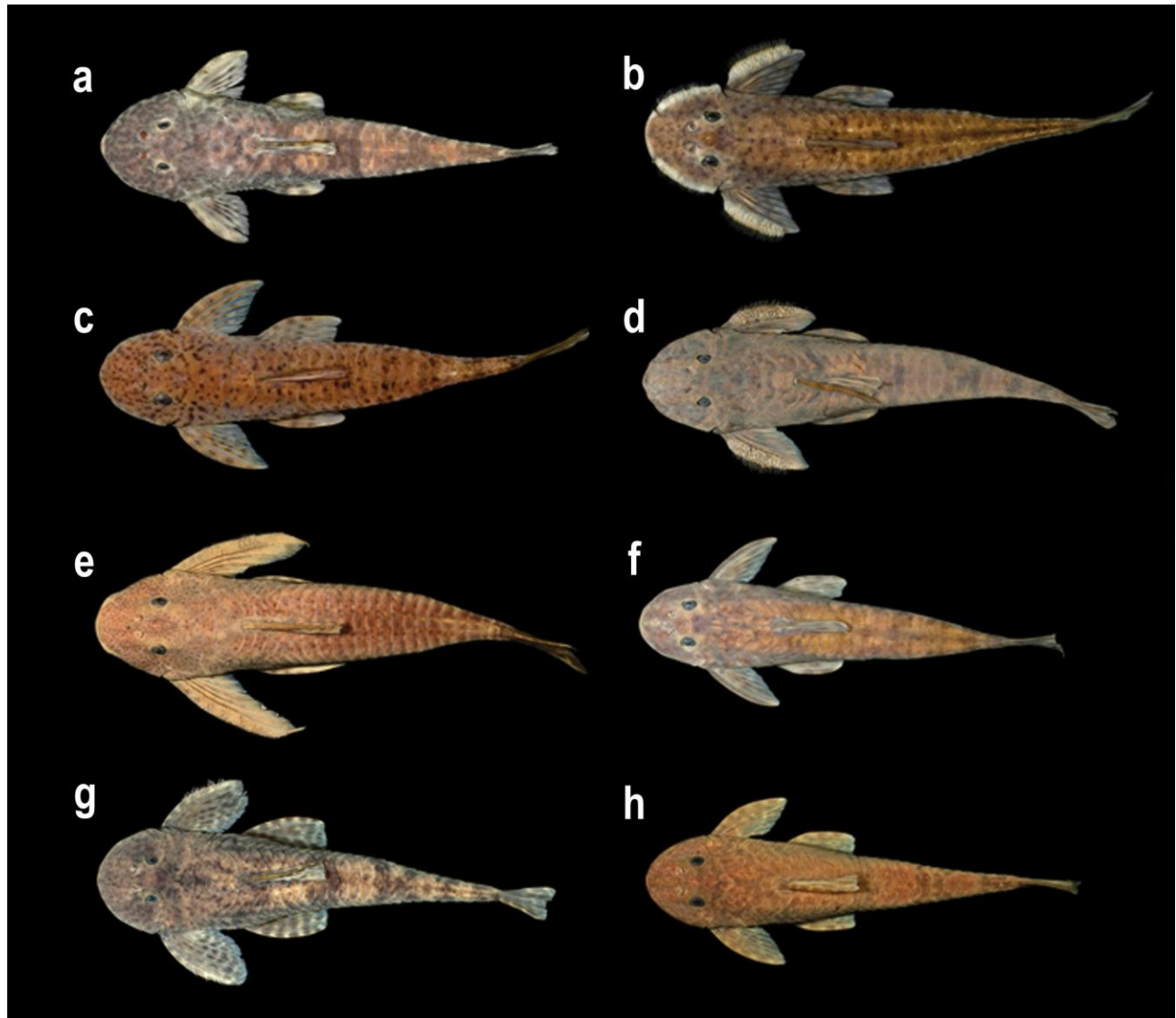


Figura 2. Foto das espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho: (a) *Harttia kronei* com 7.43 cm, (b) macho de *H. longipinna* com 9.7 cm, (c) fêmea de *H. longipinna* com 8.5 cm, (d) *H. gracilis* com 12.1 cm, (e) *H. punctata* com 14.5 cm (f) *H. loricariformis* com 8.92 cm, (g) *H. torrenticola* com 9.05 cm, (h) *H. carvalhoi* com 7.16 cm.

4.1. Metodologia Clássica

4.1.1. Tratamento “*in vivo*”

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

Injetou-se no animal, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025 %, na proporção de 1 mL/100 g de peso. Posteriormente, o peixe foi mantido em aquário bem arejado durante 50 – 60 minutos. Decorrido esse tempo, o animal foi sacrificado e retiradas porções do rim anterior. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075 M), transferindo-o para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10 mL desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, completando 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 vinte minutos. O material foi re-suspendido, com cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida transferida para um tubo de centrífuga. Algumas gotas de fixador, recém-preparado (metanol; ácido acético – 3: 1) foram acrescentadas ao material que posteriormente foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm, descartando o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se, vagarosamente, 5-7 mL 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, adicionou-se 1 mL de fixador, misturando bem o material. Este foi então ser guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo “Ependorff”, ou trabalhado conforme a descrição abaixo:

Pingar 3 a 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 ao redor 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 a 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 10 mL 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 centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se de 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 – 800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Transferiu-se esse material novamente para estufa a 36 °C, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 6 gotas de fixador (metanol ; ácido acético – 3:1) misturado-as com o material repetidas vezes, deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, adicionado 10 mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes. Seguiu-se nova centrifugação, por 10 minutos e repetida à fixação por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular com material cromossômico fixado. Por fim, o material foi pingado sobre lâminas bem limpas e aquecidas ao redor de 25 – 30 °C. Após a secagem ao ar, seguiu-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. Bandeamento C

Adotou-se o procedimento básico descrito por Sumner (1972), com modificações na etapa de coloração (Lui *et al.*, 2009). As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2 N 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 0,2 N, 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 solução de Iodeto de Propídeo (50mg/mL) e analisado em microscopia de fluorescência.

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 (1 g/100 mL de água destilada e 0,5 mL 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 três 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 a 30 segundos com Giemsa 5 %, diluído em tampão fosfato (pH 6,8).

4.2. Metodologia Molecular

4.2.1. Extração de DNA com tampão salino

A extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Aljanabi & Martinez (1997):

Homogeneizar o tecido (50-100 mg-1cm²) em 800 µL de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris-HCl 10 mM pH=8,0 e EDTA 2 mM pH = 8,0) por 10-15 segundos. Adicionar 80 µL de SDS 20 % (Cf = 2 %) e 16 µL de Proteinase K 20 mg/mL (Cf=400 µg/µL) e misturar bem. Incubar as amostras a 55-65 °C por ao menos 1 hora. Adicionar 300 µL de NaCl 6 M. Vortexar as amostras por 30 segundos a velocidade máxima e centrifugar por 20 minutos a 13.000 g. Transferir o sobrenadante para outro tubo. Adicionar igual volume de isopropanol e misturar bem. Incubar a - 20 °C por 1 hora. Centrifugar por 10 minutos a 4 °C a 13.000 g. Lavar o pellet com etanol 70 %, 300 µL, centrifugar por 5 minutos a 13.000 g. Secar e ressuspender em 300-500 µL de H₂O estéril (100 µL = 98 µL TE + 2 µL de RNase 10 mg/mL).

4.2.2. Sequenciamento nucleotídico

Os produtos de PCR 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.

4.2.3. Análise das sequências nucleotídicas

A edição das sequências foi realizada com o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (Hall, 1999) e para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas online BLASTn (Altschul *et al.*,

1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.2.1. Dupla Hibridização *in situ* Fluorescente (Double-FISH)

A localização dos sítios de DNA repetitivo nos cromossomos foi obtida pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH), segundo Pinkel *et al.* (1986), com algumas adaptações:

Foram utilizadas sondas de rDNA 18S (Hatanaka & Galetti Jr. 2004), rDNA 5S (Martins & Galetti Jr., 1999), além de sonda de sequência telomérica [TTAGGG]_n e sequência [GATA]_n (Ijdo *et al.*, 1991). Os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram obtidos via PCR (Volff *et al.*, 1999; 2000 e 2001).

Marcação das sondas

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 16 - dUTP e digoxigenina 11 dUTP (Roche). O produto desta reação foi precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a – 20 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, descartado o sobrenadante, e deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a 37 °C. As sondas teloméricas foram marcadas diretamente por PCR.

Hibridização e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µL da solução de hibridação permanecendo “overnight” 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 0,05 % / 4 x SSC, por 5 minutos, incubadas em 90 µL de tampão NFDm a 5 %, por 15

minutos em câmara úmida e lavadas duas vezes com Tween 20 0,05 % / 4 x SSC, cinco minutos cada. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas 100 µl do mix contendo 94 µL de NFDM, 1 µL de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidin) conjugada e 5 µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo por 60 minutos a 37 °C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas três vezes em Tween 20 0,05 % / 4 x SSC, cinco minutos cada. Em seguida realizou-se a desidratação em série de etanol a 70 %, 85 % e 100 % à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos serão contra corados com DAPI (0,2 µg/mL) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

4.3. Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas obtidas pela citogenética 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 - FISH) foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51), com filtros apropriados e as imagens capturadas pelo próprio sistema da câmera (Olympus DP72).

Os resultados obtidos com a citogenética básica e molecular para cada uma das espécies do gênero *Harttia* foram comparados com os resultados citogenéticos e moleculares já disponíveis na literatura e utilizados para um melhor entendimento da evolução cromossômica do grupo.

5. Referências Bibliográficas (referentes à Introdução e aos Materiais / Métodos)

- Adega, F.; Chaves, R.; Guedes-Pinto, H. (2007). Constitutive heterochromatin characterization of White-lipped and Collared peccaries (Tayassuidae). **J. Genet.** 86: 19–26.
- Aljanabi, S.M.; Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic. Acids. Res.** 25: 4692–4693.
- 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). **Cytogenet. Genome Res.** 97 (3-4): 229-233.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 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, L.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2005) Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica.** 124: 127-136.
- Andreatta, A.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Oliveira, C.; Toledo-Filho, S.A. (1994). Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. **Caryologia** 47: 27-37.
- Armbruster, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoo J. Linnean Society** 141: 1-80.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the Kariotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134: 201-210.

- Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Endler, A.L.; Cavallaro, Z.I.; Jesus, C.M.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica** 127: 277-284.
- 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.
- Bellafronte, E.; Margarido, V.P.; Moreira filho, O. (2005). Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces: Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetics analyses. **Genet. Mol. Biol.** 28(4): 710-716.
- Beridze, T. (1986). **Satellite DNA**. Springer-Verlag, Berlin. 1-149.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil. J. Genet.** 2: 103-120.
- Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S.; Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Res.** 8: 603-613.
- Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C. (2011). Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenet. Gen. Res.** 132: 71-78.
- Buckup, P.A. (1999). **Sistemática e biogeografia de peixes de riachos**. In: Caramaschi, E.P.; Mazzoni, R.; Peres-Neto, P.R. (eds). Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis. Rios de Janeiro: PPGEV-UFRJ, 6: 91-138.

- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2006). Cytogenetic characterization and description of an XX/X₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet. Gen. Res.** 112: 320-324.
- 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.
- Corradini, N.; Rossi, F.; Giordano, E.; Caizzi, R.; Vern, F.; Dimitri, P. (2007). *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. **Heredity** 98: 3–12.
- Epplen, J.T.; McCarrey, 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. **Proc. NatL Acad. Sci.** 79: 3798-3802.
- Errero-Porto, F. (2007). **Estudo citogenético e de polimorfismo cromossômico em populações do gênero *Rineloricaria* (Loricariidae, Siluriformes) da bacia do rio Paraná**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, PR.
- Eschmeyer, W.; Fricke, R. (2012). Catalog of fishes electronic version. Acesso em: 31-01-2012. California Academy of Sciences.
- Fernandes, C.A.; Martins-Santos, I.C. (2006a). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genet. Mol. Biol.** 29: 1-5.
- Fernandes, C.A.; Martins-Santos, I.C. (2006b). Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. **Caryologia.** 59: 253-259.

- Ferraris Jr., C.J. (2003). **Subfamily Loricariinae**. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPURCS 330-350.
- Ferraris Jr., C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa** 1418: 1-628.
- Ferreira, I.A.; Bertollo, L.A.C.; Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S HindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenet. Gen. Res.**118: 78–83.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2010). Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet. Gen. Res.**132(1-2): 64-70.
- 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. **Genet. Mol. Res.**. 9: 364-385
- Giuliano-Caetano, L. (1998). **Polimorfismo cromossômico robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP.
- Griffiths, A. J.; Wessler, S. R.; Gelbart, W. M.; Suzuki, D. T. & Miller, J. H. (2006). Introdução à Genética. 8a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 123, 181, 184, 192
- 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 Res.** 1: 77-86.

- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41: 95-98.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., 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)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res.** 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 University Press. Cambridge, 1-147.
- 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*). **J. Fish Biol.** 75: 408–421.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2004a). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenet. Gen. Res.** 106: 107-110.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2004b). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Heredity** 141: 237-242.
- 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.

- Langeani, F.; Oyakawa, O.T.; Montoya-Burgos, J.I. (2001). New species of *Harttia* (Loricariidae, Loricariinae) from the Rio São Francisco Basin. **Copéia** 1: 136-142.
- Lohe, A.R.; Hilliker, A.J. (1995). Return of the H-word (heterochromatin). **Curr. Opin. Genet. Dev.** 5: 746-755.
- 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). **Micron** 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). **Genet. Mol. Biol.** 27: 536–542.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**. 123: 211-216.
- 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). **Neot. Ichthyol.** 7(4): 595-600.
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.V.; 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. **Comp.Cytogenet.** 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(1): 121-128.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.** 7: 363-367.

- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) Chromosomes. **Chromosome Res.** 8: 353-355
- 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.
- Meles, S.; Adegá, F.; Guedes-Pinto, H.; Chaves, R. (2008). The karyotype and sex chromosomes of *Praomys tullbergi* (Muridae, Rodentia): a detailed characterization. **Micron** 39: 559–568.
- Menezes, R.S. (1949). Alimentação de carí chicote, “*Loricaria typus*” Bleeker, da Bacia do Rio Parnaíba, Piauí (Actinopterygii, Loricariidae, Loricariinae). **Rev. Bras. Biol.** 9: 381–387.
- 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*. **Comp. Cytogenet.** 5: 133.
- 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). Kariotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia** 42: 536-549.
- Mirada Ribeiro, P. (1908). Peixes do Ribeira, resultado da excursão do Sr. Ricardo Kone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Komos** 5: 1-5.
- Miranda Ribeiro, P. (1939). Sobre o gênero *Harttia* Steindachner (Peixes: Loricariidae). Boletim Biológico (nova série) 4: 11-13.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Rev. Bras. Genet.** 14: 331-357.
- Oliveira, R.R. (2006). **Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução**

cromossômica. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 81p.

Oyakawa, O.T. (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner 1876 da região Sudeste do Brasil e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comum. Mus. Ciênc. PUCRS**, série zool., Porto Alegre, 6: 3-27.

Ozouf-Costaz, C; Brandt, J; Körting, C; Pisano, E; Bonillo, C; Coutanceau, JP; Volff, JN (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. **Antarctic Sci.** 16(1): 51–57.

Pansonato-Alves, J.C.; Vicari, M.R.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011). Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **J. Fish Biol.** 78: 183-194.

Parise-Maltempi, P.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 for the sex chromosome in *Leporinus*. **Cytogenet. Gen. Res.** 116: 218-223.

Pimpinelli, S.; Bonaccorsi, S.; Gatti, M.; Sandler, L. (1986). The peculiar genetic organization of *Drosophila* heterochromatin. **Trends Genet.** 2: 17-20.

Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83: 2934-2938.

Pinna, M.C.C. (1998). **Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophsi) Historical Overview and Synthesis of Hypotheses.** In: Malabarba, R.M.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, C. A. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPURCRS, 375p.

Pons, J.; Petitpierre, E.; Juan, C. (2002). Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Mol. Biol. Evol.** 19: 1329-1340.

- 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.
- Rapp Py-Daniel, L.H.; Oliveira, E.C. (2001). Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyol. Explor. Freshwat** 12(1): 79-96.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (2003). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPURCS, 742p.
- 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*. **Zool. J. Linnean Soc.**, 147: 227-299.
- Rodrigues RM (2010) **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em species de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. 2018p.
- Rosa, R.; Bellafronte, E.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2006) Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S DNAr genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). **Genetica**. 128: 159–166.
- 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. **Rev. Fish Biol. Fisheries**. 22(3): 739-749.
- Rossi, F.; Moschetti, R.; Caizzi, R.; Corradini, N.; Dimitri, P. (2007). Cytogenetic and molecular characterization of heterochromatin. Gene models in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 175: 595–607.
- Scacchetti, P.C.; Alves, J.C.P.; Utsunomia, R.; Claro, F.L.; Almeida-Toledo, L.F.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2012). Molecular Characterization and Physical Mapping of Two Classes of 5S

- rDNA in the Genomes of the *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). **Cytogenet. Gen. Res.** 136: 131-137.
- Scavone, M.D.P.; Júlio Jr.; H.F. (1994). Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females (Loricariidae – Siluriformes) from the Paraná river basin. **Rev. Ictiol.**, 2/3:41-47.
- Scavone, M.D.P.; Júlio Jr.; H.F. (1995). Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). **Rev. Bras. Genet.** 1: 31-35.
- Schaefer, S.A. (1987). Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the Loricariid subfamilies (Pisces, Siluroidei) **Cont. Sci. Nat. Hist. Mus.** Los Angeles county.
- Schaefer, S.A.; Stewart, D.J. (1993). Systematics of the *Panaque dentex* species group (Siluriformes: Loricariidae), wood-eating armored catfishes from tropical South America. **Ichthyolo. Explor. Freshwater** 4:309-342.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schulli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica** 139: 1499-1508.
- 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.
- Srivastava, J.; Premi, S.; Kumar, S.; Ali, S. (2008). Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoal transcriptomes in *Buffalo Bubalus bubalis*. **BMC Genomics** 9(132): 1-17.
- Steindachner, F. (1876). Die Süßwasserfische des Südöstlichen Brasilien (III). **Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien.** 74: 559-694.

- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 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. **Cytogenet 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.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2005). Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genet. Mol. Biol.** 28(1): 103-110.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2006). Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and Divergence. **Caryologia.** 59(3): 260-266.
- Vicari, M.R., Artoni, R.F., Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008a). Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica** 134: 311-317.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008b). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenet. Gen. Res.** 122: 67-72.
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noleto, 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. **J. Fish Biol.** 76: 1094-1116.
- Vicari, M.R.; Pistune, H.F.M.; Castro, J.P.; Almeida, M.C.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M., Artoni, R.F. (2011). New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica** 139: 1073-1081.

- 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.; Schartl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Mol Biol Evol** 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. **Mol Biol Evol** 17: 1673-1684.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Meyer, A.; Schartl, M. (2001). Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. **Mol Biol Evol** 18: 427-431
- Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends Gen.** 19: 674-678.
- Voltolin, T.A.; Laudicina, A.; Senhorini, J.A.; Bortolozzi, J.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2010) Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. **Genetica** 138: 1133-1139.
- 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. **J. Heredity** 82: 369-377.

6. Resultados / Discussão

Os resultados juntamente com a discussão foram alocados em capítulos, sendo que cada capítulo corresponde a um artigo.

Capítulo I: O papel dos rearranjos Robertsonianos na diferenciação cromossômica e origem do sistema de cromossomos sexuais XX/XY_1Y_2 em *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae).

Capítulo II: Caracterização cromossômica de *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): primeiro relato de cromossomo B no gênero.

Capítulo III: Origem do sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae): Pintura cromossômica e genes ribossomais 5S e 18S.

Capítulo IV: Diversidade cromossômica e tendências evolutivas em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae).

Capítulo V: Extensivo acúmulo de retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em 7 espécies de *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae).

Capítulo VI: Correlação entre aspectos biológicos e diversidade cromossômica em algumas espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariinae).

Capítulo I

O PAPEL DOS REARRANJOS ROBERTSONIANOS NA DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA E ORIGEM DO SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS XX/XY₁Y₂ EM *Harttia carvalhoi* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE).

Daniel Rodrigues Blanco¹, Marcelo Ricardo Vicari², Roberto Laridondo Lui¹, Luiz Antonio Carlos Bertollo¹, Orlando Moreira-Filho¹

Palavras chave: *H. kronei*, *H. torrenticola*, *H. carvalhoi*, Fusão cêntrica, Fissão cêntrica

Capítulo referente ao publicado *on line* na *Reviews in Fish Biology and Fisheries*

Resumo

Harttia é um pequeno gênero da subfamília Loricariinae, que abriga os peixes popularmente conhecidos como cascudos e acaris. Este grupo habita preferencialmente regiões específicas de rios e riachos e, por não apresentar hábitos migratórios, formam pequenos isolados populacionais. São descritas vinte e três espécies de *Harttia*, dezesseis das quais alocadas em bacias brasileiras. Além da diversidade cariotípica interespecífica presente neste grupo, um sistema de cromossomos sexuais múltiplos XX/XY₁Y₂, relativamente raro entre os peixes, já foi descrito para *H. carvalhoi*. Neste contexto, este estudo teve como objetivo inferir sobre o papel dos rearranjos cromossômicos na diferenciação cariotípica de *Harttia*, empregando procedimentos da citogenética clássica e molecular. A espécie *H. torrenticola* foi aqui analisada citogeneticamente pela primeira vez, sendo *H. kronei* e *H. carvalhoi* reanalisadas à luz de novos marcadores, obtidos por bandamentos cromossômicos e por hibridização *in situ* fluorescente com sondas de genes ribossomais e de sequências teloméricas [TTAGGG]_n. Os resultados obtidos revelam que rearranjos Robertsonianos tiveram papel de destaque na diversificação cromossômica das espécies analisadas conduzindo, inicialmente, à redução do número diploide a partir de um cariótipo ancestral similar ao encontrado em *H. kronei*. Assim sendo, o cromossomo metacêntrico 1, o maior do cariótipo, compartilhado *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*, deve ter se originado a partir de um evento de fusão cêntrica entre diferentes pares presentes no cariótipo ancestral. Posteriormente, um evento de fissão cêntrica, associado a este primeiro par metacêntrico do cariótipo, possibilitou a origem do sistema de cromossomos sexuais múltiplos XY₁Y₂, específico de *H. carvalhoi*. Desta forma, além de rearranjos Robertsonianos na diferenciação cariotípica das espécies estudadas, foi possível também concluir que a ocorrência de uma fissão cêntrica, contrariamente ao de uma fusão como anteriormente hipotetizado, esteve diretamente implicada na origem do sistema sexual de *H. carvalhoi*.

Introdução

Os dados sobre variabilidade cariotípica em Loricariidae revelam uma alta diversidade relacionada ao número e morfologia cromossômica, embora algumas tendências evolutivas possam ser destacadas entre subfamílias distintas. Artoni & Bertollo (2001) sugeriram que $2n=54$ seria uma característica ancestral em Loricariidae, uma vez que este número diploide é encontrado em gêneros considerados basais, bem como no grupo irmão, Trichomycteridae (superfamília Loricarioidea). Desta forma, as subfamílias Loricariinae e Hypostominae apresentam uma grande diversidade com relação ao número diploide e outros marcadores cromossômicos compreendendo, assim, características altamente diferenciadas com quando comparados com outros grupos mais primitivos dentro de Loricariinae (Artoni & Bertollo, 2001). Os rearranjos Robertsonianos são eventos importantes na origem da diversidade cariotípica em Loricariinae, com $2n$ variando de 36–74 cromossomos (Ziemniczak *et al.*, 2012). Segundo Perry *et al.* (2004), as fissões cêntricas podem gerar sítios de cromossomos instáveis, o que necessitaria de outro rearranjo para estabilizar esses sítios. Possivelmente tal situação ocorreu em várias espécies da subfamília Loricariinae (Rosa *et al.*, 2012).

Entretanto, em alguns gêneros de Loricariidae ainda são escassos de estudos citogenéticos. Tal é o caso de *Harttia* (Loricariinae), onde somente quatro espécies já foram cariotipicamente caracterizadas: *H. kronei*, $2n=58$ (Alves *et al.*, 2003), *H. loricariformis*, $2n=56$ (Kavalco *et al.*, 2004), *H. carvalhoi*, $2n=52$ nas fêmeas e $2n=53$ nos machos em decorrência de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos (Centofante *et al.*, 2006) e *Harttia* sp. n. $2n=62$ (Rodrigues *et al.*, 2010).

Comparativamente a vários outros grupos de vertebrados, poucas espécies de peixes apresentam cromossomos sexuais heteromórficos. Entre as espécies neotropicais, três sistemas simples (XX/X0, XX/XY, ZZ/ZW) e quatro sistemas múltiplos (XX/XY₁Y₂, X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y, ZZ/ZW₁W₂, Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) de cromossomos sexuais já foram identificados, onde a heterogametia feminina

é mais frequente, sendo encontrada em mais de 50% dos casos descritos, geralmente entre espécies da ordem Characiformes (Moreira-Filho *et al.*, 1993). Especificamente entre os Loricariidae, alguns sistemas simples e múltiplos encontram-se representados entre espécies das subfamílias Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae, esta última apresentando o maior número de casos provavelmente por concentrar a maioria dos estudos citogenéticos na família. Neste contexto, embora com poucas espécies estudadas, o gênero *Harttia* se destaca por apresentar um sistema de cromossomos sexuais XX/XY₁Y₂, relativamente raro entre os peixes, presente em *H. carvalhoi*.

O presente estudo teve por objetivo inferir sobre o papel dos rearranjos Robertsonianos na diversificação cariotípica de espécies de *Harttia*, assim como na origem do sistema sexual XX/XY₁Y₂ em *H. carvalhoi*. Neste contexto, a espécie *H. torrenticola* foi aqui analisada pela primeira vez, além de uma reanálise cariotípica em *H. kronei* e *H. carvalhoi*, empregando-se diferentes marcadores cromossômicos clássicos e moleculares que possibilitaram uma avaliação resolutive dos processos de evolução cariotípica deste grupo.

Materiais e Métodos

Foram analisados, no tocante às metodologias citogenéticas clássicas e moleculares, três espécies do gênero *Harttia* provenientes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras: 18 espécimes (11 machos e 7 fêmeas) de *H. kronei* Miranda Ribeiro, 1908 proveniente do rio Açungui, bacia do rio Ribeira, município de Campo Largo, estado do Paraná; 13 exemplares (5 machos e 8 fêmeas) de *H. torrenticola* Oyakawa, 1993 provenientes do ribeirão das Araras, afluyente do rio São Francisco, município de Piumhi, estado de Minas Gerais e 24 exemplares (13 machos e 11 fêmeas) de *H. carvalhoi* Miranda Ribeiro, 1939 do ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, no município de Pindamonhangaba, estado de São Paulo. Os exemplares foram depositados no Museu de Zoologia,

Universidade de São Paulo, Brasil com os vouchers MZUSP 109783; MZUSP 109784; MZUSP 109782.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993) e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com a relação de braços (Levan *et al.*, 1964). Para determinar o número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados portadores de dois braços cromossômicos. A distribuição da heterocromatina C-positiva foi obtida conforme Sumner (1972), com modificações segundo Lui *et al.* (2009) e a localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) foi obtida segundo descrito por Howell & Black (1980). As técnicas de Bandamento C e Ag-NOR foram realizadas utilizando-se das mesmas metáfases anteriormente coradas com Giemsa (análise sequencial).

Três sondas foram utilizadas para hibridização *in situ* fluorescente: uma sonda de rDNA 18S obtida do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004); uma sonda de rDNA 5S isolada do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti, 1999); e uma sonda da sequência telomérica geral de vertebrados [TTAGGG]_n (Ijdo *et al.*, 1991). A sonda de rDNA 18S foi marcada por *Nick Translation* com biotina-16-dUTP (Biotin Nick Translation mix – Roche) e a sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Dig Nick Translation mix – Roche). A sonda de sequência [TTAGGG]_n foi marcada por PCR, utilizando digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science).

Todos os processos de hibridização seguiram o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), sob alta estrigência (200 ng 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 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 consistindo de duas lavagens de 5

minutos. A detecção do sinal foi realizada utilizando streptavidin-alexa fluor 488 (Molecular Probes) para a sonda de rDNA 18S; e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) para as sondas de rDNA 5S e sequência telomérica [TTAGGG]_n. Os cromossomos foram analisados em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) acoplado de um sistema de captura de imagem (Olympus DP72). Para determinar o número diploide, fórmula cariotípica e presença ou ausência de ITS, aproximadamente 30 metáfases foram analisadas. Foi considerado como sinal de hibridização verdadeiro, tanto para os DNAs ribossomais quanto para os ITS, os sítios que apresentaram 100 % de repetibilidade.

Resultados

Harttia kroniei

Esta espécie apresenta $2n = 58$ cromossomos ($14m+20sm+14st+10a$) e $NF=106$, tanto nos machos como nas fêmeas, sem a presença de um sistema de cromossomos sexuais diferenciados (Fig.1a). O bandamento C evidenciou uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva C-positiva, preferencialmente alocada na posição pericentromérica de poucos cromossomos do complemento. Destaca-se claramente um bloco C+ bem evidente na posição intersticial do braço curto do segundo par metacêntrico, coincidente com a localização das Ag-NORs (Fig. 1b, em destaque). FISH com sonda de rDNA 18S confirmou os resultados quanto ao número e localização das NORs, previamente evidenciados pela coloração com o nitrato de prata. A hibridização com sonda de rDNA 5S evidenciou um único par desse marcador, presente na posição proximal do braço longo do primeiro par cromossômico metacêntrico (Fig. 2a). Nenhum ITS (Interstitial Telomeric Sites) foi detectado no cariótipo com o emprego das sondas teloméricas (Fig. 2b).

Harttia torrenticola

Esta espécie apresenta $2n = 56$ cromossomos ($16m+10sm+16st+14a$) e $NF = 98$, tanto nos machos quanto nas fêmeas, evidenciando também a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos (Fig. 1c). O bandamento C destacou pouca heterocromatina C-positiva, localizada principalmente na região centromérica e terminal de alguns pares cromossômicos, com exceção de um sítio grande C+ na região pericentromérica do par 22, e de um sítio menor na região terminal do braço longo também deste mesmo par cromossômico, o maior acrocêntrico do cariótipo (Fig. 1d). A coloração com nitrato de prata evidenciou apenas um par de NORs, intersticialmente localizado no braço longo do par 22, em concordância com o sítio C+ localizado neste cromossomo (Fig. 1d, em destaque). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S confirmou a natureza simples das NORs e sua localização no cariótipo desta espécie. FISH com sonda de rDNA 5S mostrou apenas um par de cromossomos metacêntricos portador destes sítios no cariótipo (Fig. 2c). A hibridização com sondas de DNA telomérico destacou a ocorrência de ITS evidentes, localizados no braço curto de um par submetacêntrico pequeno e no braço curto do primeiro par metacêntrico do cariótipo (Fig. 2d).

Harttia carvalhoi

Nesta espécie ocorrem $2n = 52$ cromossomos nas fêmeas e $2n=53$ cromossomos nos machos (Fig. 1e, g). Esta diferença no número diploide entre os sexos é acompanhada pela presença de dois cromossomos acrocêntricos exclusivos dos machos, além da ausência, neste mesmo sexo, de um dos cromossomos do primeiro grande par metacêntrico característico das fêmeas, reforçando assim a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 , previamente descrito para esta espécie. A heterocromatina C+ apresentou-se distribuída principalmente na região pericentromérica dos cromossomos, com bandas terminais mais conspícuas em alguns pares do cariótipo, como no par 23 (primeiro par acrocêntrico), onde foram também detectadas duas outras

bandas mais relevantes, uma na região centromérica e outra na região intersticial do braço longo, adjacente a uma constrição secundária (Fig. 1f, h). A coloração com nitrato de prata evidenciou sítios de NORs no braço longo do par 23, intercalares aos blocos heterocromáticos proximal e intersticial localizados neste cromossomo (Fig. 1f, h, em destaque). As hibridizações com sonda de rDNA 5S evidenciaram dois pares cromossômicos portadores desses cístrons. Um sítio maior foi localizado na região intersticial no braço longo do par 23, portanto o mesmo par portador dos sítios 18S, enquanto que um sítio menor foi localizado no braço curto de um pequeno par de cromossomos metacêntricos (Fig. 2e). FISH com sonda de sequência telomérica evidenciou um ITS no primeiro par submetacêntrico, além de um segundo sítio situado no braço curto do maior metacêntrico do cariótipo, ou seja, o cromossomo X (Fig. 2f).

Discussão

Caracteres moleculares mitocondriais e nucleares, utilizados em análises filogenéticas no gênero *Harttia*, demonstraram a grande proximidade existente entre *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*, as quais constituem um grupo monofilético, enquanto que *H. kronei* ocupa uma posição mais basal entre as espécies de *Harttia* descritas para a região Sul e Sudeste do Brasil (Costa-Silva, 2009). Os marcadores cromossômicos ora obtidos corroboram com esta proposta.

De fato, o compartilhamento do grande par metacêntrico (par 1), a localização e posicionamento das NORs no maior par de acrocêntricos do cariótipo, assim como o padrão de distribuição da heterocromatina C-positiva nos cromossomos reforçam as relações de proximidade entre *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*, assim como uma maior diferenciação no que se refere a *H. kronei*. Por outro lado, enquanto que o par 23, portador das NORs, também apresenta sítios de rDNA 5S em *H. carvalhoi*, isto não ocorre em *H. torrenticola*, embora tenha sido igualmente verificado em *H.*

loricariiformis (Kavalco *et al.*, 2005). Tal sintenia dos genes de rRNA 18S e 5S evidencia que a transposição de genes ribossomais atuou como um fator diversificador do genoma entre as espécies de *Harttia*, o que é também corroborado por *H. kronei*, onde a NOR se localiza em um cromossomo metacêntrico, de tamanho menor, portanto provavelmente não homeólogo dos cromossomos portadores da NOR em *H. carvalhoi* e *H. torrenticola*. No que se refere aos sítios de rDNA 5S, à exceção do par 23 de *H. carvalhoi*, os demais cromossomos portadores desses sítios provavelmente correspondam a pares homeólogos, representados por um dos cromossomos metacêntricos presentes no cariótipo das três espécies.

Nos Loricariidae, $2n=54$ cromossomos tem sido considerado o provável número diploide ancestral, atribuindo-se aos rearranjos Robertsonianos como sendo os principais eventos de diversificação cariotípica para este grupo, ao lado de alguns outros rearranjos adicionais, como inversões, translocações e heterocromatinização cromossômica (Artoni & Bertollo, 2001). Considerando esta condição $2n$ ancestral, duas tendências de diversificação cariotípica se destacam entre os Loricariidae, ou seja, a redução do número cromossômico para alguns grupos, assim como o aumento deste número para outros.

Neste cenário, considerando as espécies de *Harttia* estudadas, é possível hipotetizar que a diversificação cariotípica deve ter ocorrido a partir de uma linhagem ancestral com $2n=58$ cromossomos, semelhante ao cariótipo encontrado em *H. kronei*, onde ocorreram fusões e fissões cromossômicas. Na análise comparativa entre as três espécies aqui apresentadas, fica evidente que fusões cêntricas originaram o primeiro par metacêntrico grande em *H. torrenticola*, provavelmente a partir de pares subtelo/acrocêntricos semelhantes aos encontrados no cariótipo de *H. kronei* reduzindo, assim, o número diploide de 58 cromossomos a 56 cromossomos entre estas duas espécies. O primeiro par acrocêntrico, presente em *H. torrenticola*, também compartilhado por *H. carvalhoi*, e não evidenciado em *H. kronei*, provavelmente se diferenciou a partir do provável cariótipo ancestral por

rearranjos não-Robertsonianos. Já a redução do número diploide entre *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*, de $2n=56$ a $2n=52$, pode ser correlacionada a fusões cêntricas que deram origem a alguns pares cromossômicos de *H. carvalhoi*, onde a manutenção de alguns ITS é indicativo desses rearranjos. Em *H. torrenticola* é observado também um par submetacêntrico pequeno portador de ITS em posição subterminal.

Embora a frequência das fissões cêntricas seja comparativamente menor em relação à das fusões cêntricas, há algumas evidências concretas da participação desses rearranjos na diferenciação cariotípica entre os peixes. Tal é o caso, por exemplo, de espécies do gênero *Potamorhina* (Curimatidae), cujo cariótipo difere drasticamente, tanto em número como na morfologia, dos demais representantes desta família. De fato, a maioria das espécies de Curimatidae apresentam $2n=54$ cromossomos meta-submetacêntricos, o que parece corresponder a uma condição ancestral para este gênero (Feldberg *et al.*, 1993; Brasseco *et al.*, 2004). Entretanto, *P. altamazonica* (Feldberg *et al.*, 1993) e *P. squamoralevis* (Brassesco *et al.*, 2004), apresentam $2n=102$ cromossomos, praticamente o dobro de cromossomos e na sua quase totalidade acrocêntricos, indicando a ocorrência de inúmeras fissões cêntricas na diversificação do cariótipo dessas espécies. Igualmente entre os Loricariidae, Rosa *et al.* (2012) inferiram que a linhagem que originou a espécie *Rineloricaria lima* passou por inúmeras fissões cromossômicas, divergindo também de outras espécies deste gênero. Posterior aos eventos de fissão e aumento do $2n$, *R. lima* sofreu fusões cêntricas e inversões gerando o polimorfismo numérico de $2n=70 - 66$ cromossomos.

Os rearranjos Robertsonianos, além de atuarem na diversidade cariotípica geral de inúmeras espécies, estão também frequentemente associados à diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos. De fato, entre os peixes neotropicais, este evento está bem representado na origem do sistema ZZ/ZW₁W₂ de *Apareiodon affinis* (Parodontidae), onde as fêmeas apresentam $2n=55$ e os machos $2n=54$ cromossomos. Neste caso, um evento de fissão cêntrica, no maior cromossomo

metacêntrico do cariótipo, originou os cromossomos W_1 e W_2 exclusivos do cariótipo das fêmeas. Consequentemente, no cariótipo dos machos são encontrados dois homólogos constituindo o primeiro par metacêntrico do cariótipo (cromossomo Z), enquanto que no cariótipo das fêmeas apenas um desses cromossomos encontra-se presente (Moreira-Filho *et al.*, 1980).

Harttia carvalhoi apresenta um sistema heteromórfico de cromossomos sexuais do tipo XX/XY₁Y₂, já descrito por Centofante *et al.* (2006). Os dados obtidos no presente estudo de fato reafirmam a presença deste sistema nesta espécie, onde o maior cromossomo metacêntrico do cariótipo corresponde aos cromossomos X e os cromossomos Y₁ e Y₂, exclusivos dos machos, correspondem a dois acrocêntricos, similares em tamanho a cada braço do cromossomo X. Os ITS encontrados no braço curto do cromossomo X de *H. carvalhoi*, assim como no primeiro par metacêntrico de *H. torrenticola*, reforçam a hipótese de que tais cromossomos originaram-se pela fusão em tandem de cromossomos presentes em um cariótipo ancestral, provavelmente entre um cromossomo submetacêntrico grande e um acrocêntrico pequeno. Desta forma, o surgimento desse grande cromossomo metacêntrico deve ter ocorrido antes da diversificação dessas duas espécies (Fig. 3). Ao que tudo indica, um evento subsequente de fissão cêntrica, em um dos cromossomos deste par, originou os cromossomos acrocêntricos Y₁ e Y₂, diferenciando assim o sistema de cromossomos sexuais múltiplos XX/XY₁Y₂ exclusivo de *H. carvalhoi* (Fig. 3). Contudo, considerando que o primeiro par metacêntrico apresenta ITS em um dos braços, seria esperado que um dos cromossomos acrocêntricos, resultantes dessa fissão cêntrica, apresentasse também este sítio intersticial o que, contudo, não foi detectado. É possível que tal ausência possa ser decorrente de modificações genômicas pós-evento de fissão, decorrentes do próprio processo de diferenciação/fixação dos cromossomos sexuais na espécie.

Na origem dos sistemas sexuais múltiplos, os rearranjos envolvidos podem propiciar a formação de novos grupos de ligação entre genes anteriormente dispersos pelo genoma. Nestes

sistemas, os cromossomos sexuais geralmente apresentam pouca heterocromatina constitutiva, como pode ser também verificado no caso relativo à *H. carvalhoi*, geralmente restrita aquela já pré-existente nos cromossomos ancestrais que originaram tais sistemas. Tal fato pode ser uma condição importante para a estabilidade desses sistemas, considerando que a amplificação de grandes segmentos heterocromáticos, como geralmente verificado nos cromossomos W ou Y dos sistemas simples, poderia interferir no balanceamento meiótico do trivalente sexual (Moreira-Filho *et al.*, 1993).

Os resultados ora obtidos destacam que os rearranjos Robertsonianos tiveram, de fato, papel relevante na diversificação cromossômica entre espécies do gênero *Harttia*, conduzindo à redução progressiva do número diploide por eventos de fusão cêntrica a partir de um cariótipo ancestral similar ao encontrado em *H. kronei*. Adicionalmente, um evento de fissão cêntrica, associado ao primeiro grande cromossomo metacêntrico de *H. torrenticola*, possibilitou a origem do sistema de cromossomos sexuais múltiplos XY_1Y_2 , específico de *H. carvalhoi*. Desta forma, além de destacar a relevância dos rearranjos Robertsonianos na diferenciação cariotípica das espécies estudadas, foi também possível concluir que a ocorrência de uma fissão cêntrica esteve diretamente implicada na origem do sistema sexual de *H. carvalhoi*. Dados anteriores indicavam que um evento de fusão cêntrica teria sido a origem mais provável para este sistema (Centofante *et al.*, 2006). Entretanto, à luz de novos marcadores cromossômicos, e considerando os resultados comparativos com espécies anteriormente ainda não estudadas, como *H. kronei* e *H. torrenticola*, foi possível concluir que o processo de diferenciação do sistema XY_1Y_2 de *H. carvalhoi* decorreu de um evento de fissão cêntrica, ilustrando uma nova ocorrência deste tipo de rearranjo Robertsoniano, relativamente raro, na evolução cariotípica dos peixes.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa pela identificação dos exemplares. Aos técnicos Pedro Luis Gallo e Luis Henrique da Silva pelo esforço na captura dos exemplares. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

Referências

- Alves AL, Oliveira C, Foresti F: Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia** 56:57-63 (2003).
- Artoni RF, Bertollo LAC: Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134:201-210 (2001).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil. J. Genet.** 2: 103-120 (1978).
- Brassesco MS, Pastori MC, Roncati HÁ, Fenocchio AS: Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genet. Mol. Res.** 3 (2): 293-301 (2004).
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet. Genome Res.** 112:320-324 (2006).

- Costa-Silva GJ: **Análise filogenética entre gêneros da subfamília loricariinae (Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*, baseada em caracteres moleculares.** MSc dissertation (in Portuguese) Botucatu, Brazil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (2009).
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC, Nakayama, CM: Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome**. 36: 372-376 (1993).
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF: A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘*in vitro*’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813 (1993).
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122:239-244 (2004).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015 (1980).
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST: Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res.**19:4780 (1991).
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Heredity** 141:237-242 (2004).
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, 94:180-186 (2005).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52:201-220 (1964).
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O: First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron** 40(5-6):552-559 (2009).

- Martins C, Galetti Jr PM: Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.** 7:363-367 (1999).
- Mirada Ribeiro P (1908). Peixes do Ribeira, resultado da excursão do Sr. Ricardo Kone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Komos** 5:1-5.
- Miranda Ribeiro P (1939). Sobre o gênero *Harttia* Steindachner (Peixes: Loricariidae). Boletim Biológico (nova série) 4:11-13.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM: Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 33: 83-91 (1980).
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM: Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia.** 46: 115-125 (1993).
- Oyakawa OT (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner 1876 da região Sudeste do Brasil e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comum. Mus. Ciênc. PUCRS**, série zool., Porto Alegre, 6:3-27.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83:2934-2938.
- Perry J, Slater HR, Choo KHA: Centric fission - simple and complex mechanisms. **Chromosome Res**, 12: 627-640 (2004).
- Rodrigues RM: **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em species de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspective evolutiva.** MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. (2010).
- Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, Vicari MR: Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes, Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Rev Fish Biol Fisheries** (2012), 22(3): 739-749.

Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 75:304-306 (1972).

Ziemiczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR: Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Ital J Zool** (2012).
Doi:10.1080/11250003.2012.676677

Anexos

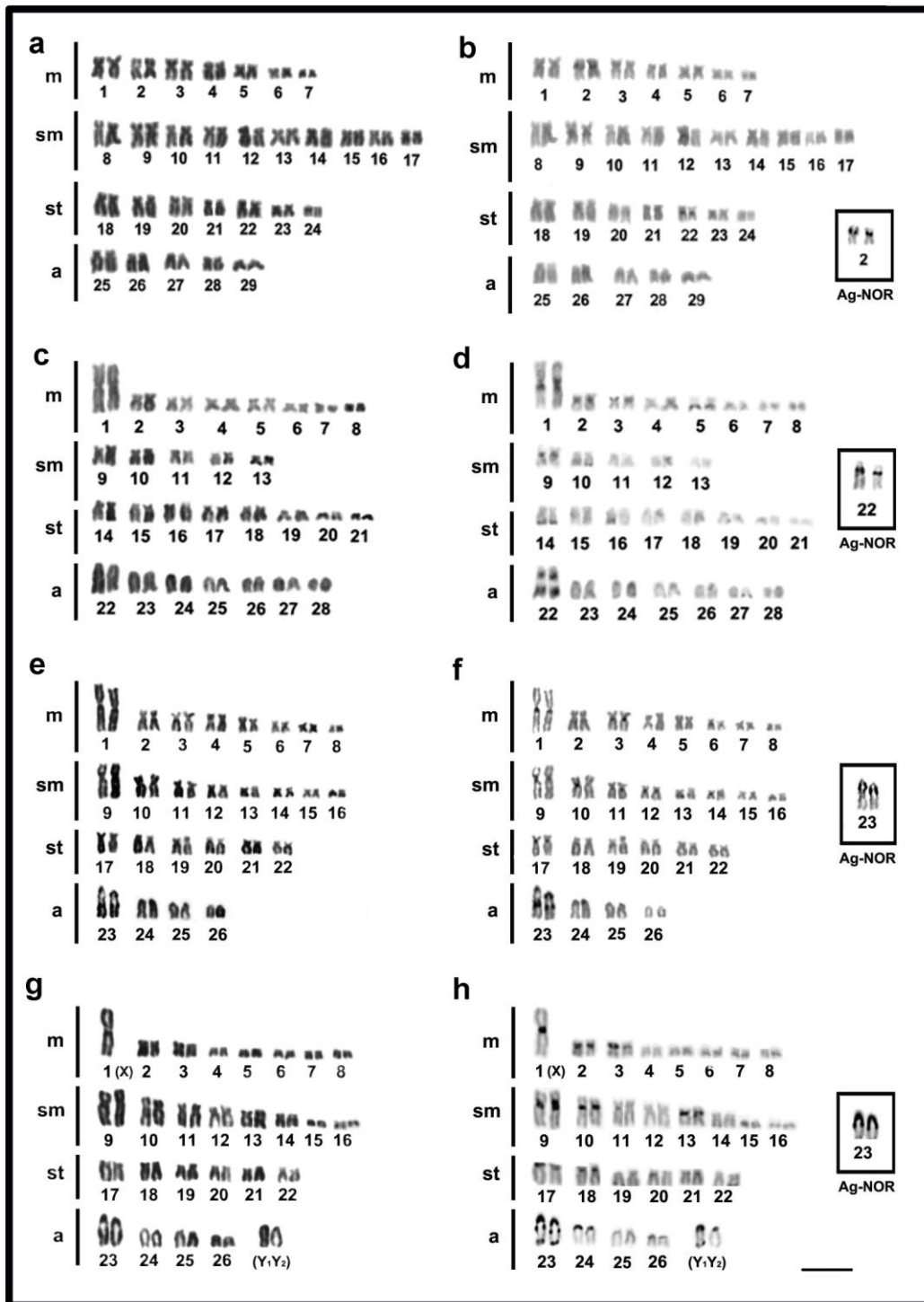


Figura 1. Cariótipos de *Harttia kronei* (a, b), *H. torrenticola* (c, d) e *H. carvalhoi* (fêmeas e, f; machos g, h), submetidos a coloração convencional por Giemsa (a, c, e, g) e bandamento C (b, d, f, h). Os cromossomos portadores das Ag-NORs estão em destaque. Barra = 10 μ m.

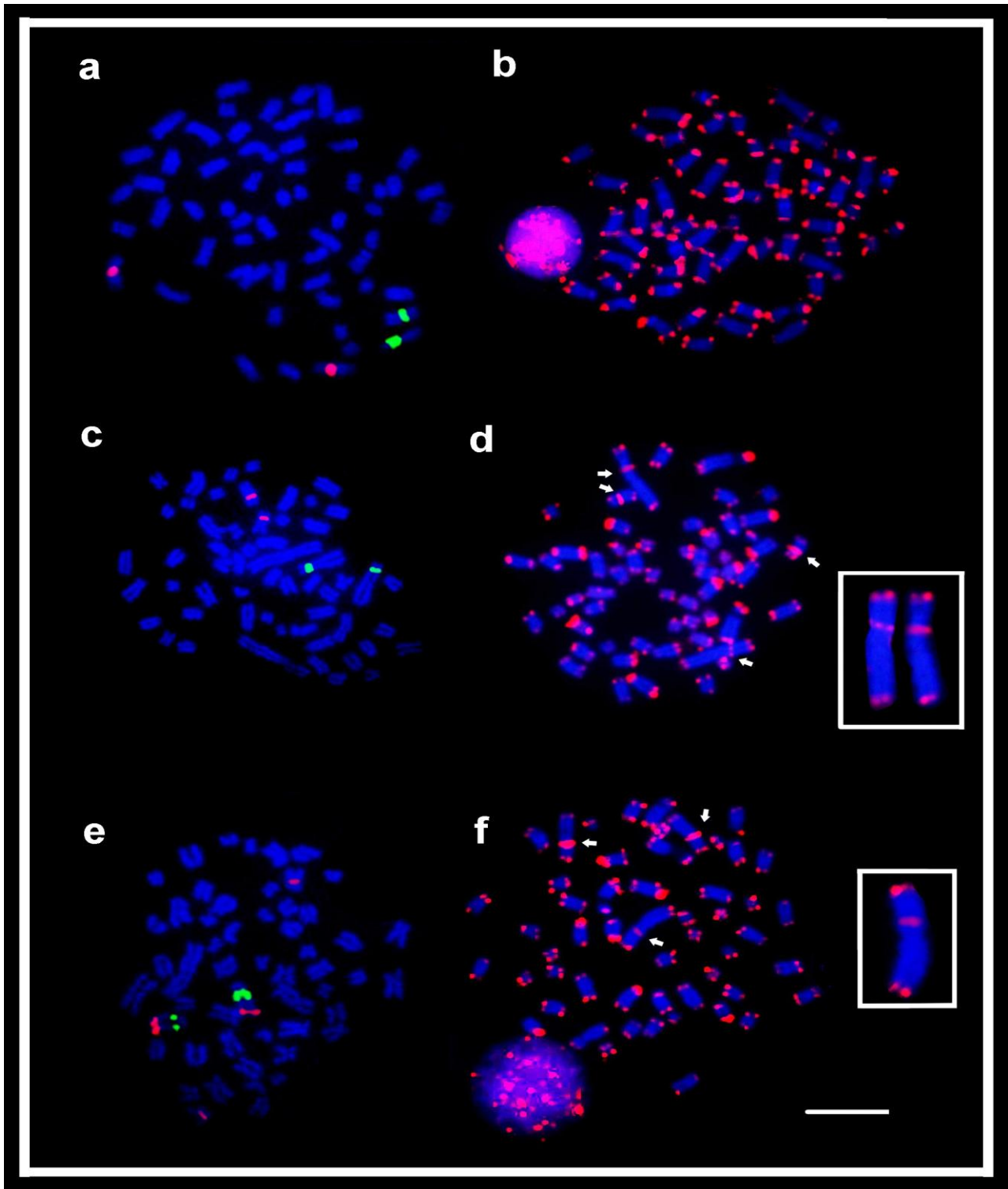


Figura 2. Metáfases de *Harttia kronei* (a, b), *H. torrenticola* (c, d) e *H. carvalhoi* (e, f). Double-FISH (a, c, e) com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA 18S (sinal verde) e hibridização simples com sonda de sequências teloméricas [TTAGGG] $_n$ (b, d, f). As setas indicam a presença de ITS nos cromossomos. Em destaque, o primeiro par metacêntrico de *H. torrenticola* e o cromossomo X correspondente em *H. carvalhoi*. Barra=10 μ m.

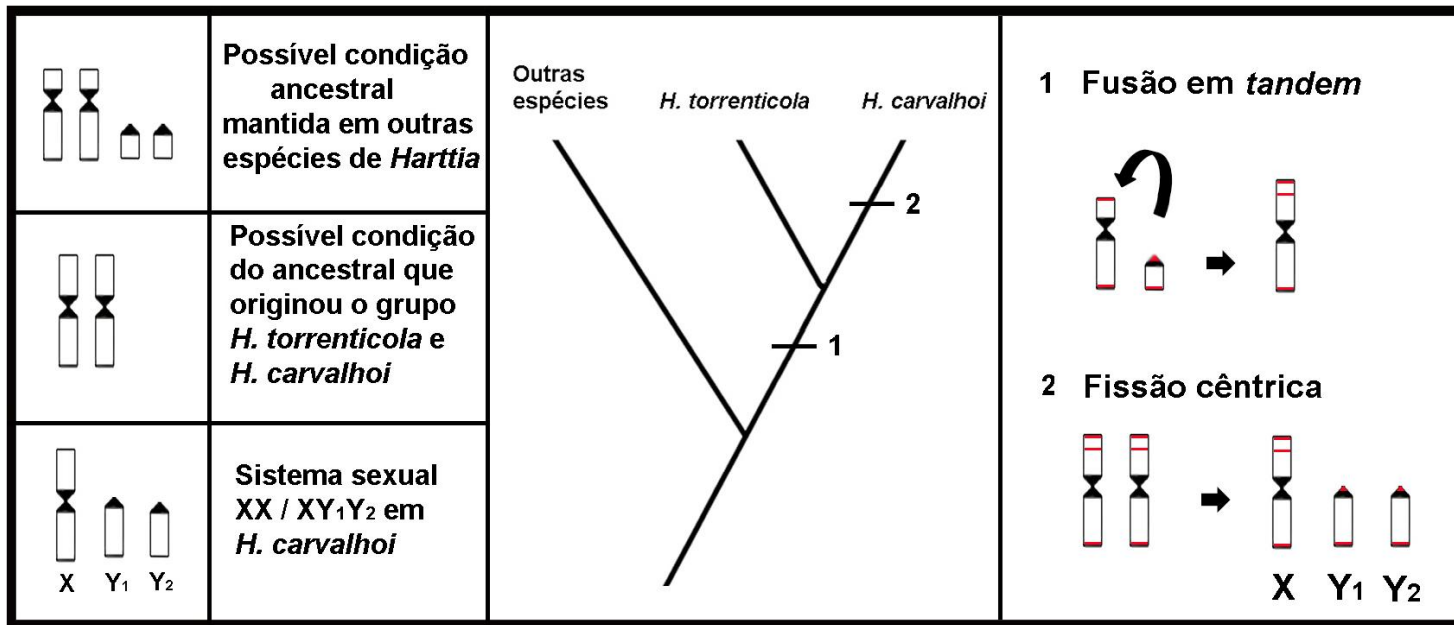


Figura 3. Provável via de diferenciação cariotípica entre espécies de *Harttia* e a formação do sistema sexual XX/XY₁Y₂ em *Harttia carvalhoi*.

Capítulo II

CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE *Harttia longipinna* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE): PRIMEIRO RELATO DE CROMOSSOMO B NO GÊNERO.

Daniel Rodrigues Blanco¹, Marcelo Ricardo Vicari², Roberto Ferreira Artoni², Josiane Baccarin
Traldi¹, Orlando Moreira Filho¹

Palavras chave: Cromossomo supranumerário, FISH, rDNA 5S, rDNA 18S, diversificação cariotípica, evolução cromossômica.

Capítulo referente ao artigo aceito na *Zoological Science*

Resumo

Os cromossomos chamados B ou supranumerários são elementos acessórios que apresentam evolução própria e são considerados dispensáveis ao crescimento, desenvolvimento e reprodução de organismos. Possuem replicação tardia, pois na maioria dos casos são heterocromáticos, variando em número, forma e tamanho. Apesar da grande variação encontrada em *Harttia*, até o presente momento, não havia relatos de cromossomos B neste gênero. Neste estudo, foram caracterizados através de metodologias de citogenética clássica (coloração convencional por Giemsa, Bandamento C e impregnação por nitrato de prata- Ag-NOR) e citogenética molecular (Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S e 18S) espécimes de *Harttia longipinna*, provenientes do rio São Francisco, no município de Pirapora - MG. O número diploide encontrado para os espécimes analisados foi de 58 cromossomos (16m+12sm+16st+14a), porém dos 50 indivíduos analisados (30 machos e 20 fêmeas), 23 espécimes (16 machos e 7 fêmeas) apresentaram variação intra-individual de 0 a 2 micro cromossomos B. As NORs foram localizadas na porção proximal do braço longo do primeiro par acrocêntrico, tanto pela coloração com nitrato de prata quanto pela FISH com sonda de rDNA 18S. A heterocromatina foi localizada na região centromérica de alguns pares cromossômicos. É pertinente ressaltar dois grandes blocos heterocromáticos presentes no primeiro par acrocêntrico: um proximal coincidente com a NOR e outro terminal no braço longo. Os cromossomos Bs se mostraram totalmente heterocromáticos. A hibridização *in situ* com sonda de DNA ribossomal 5S evidenciou um único cístron na porção proximal do braço curto de um par metacêntrico pequeno. Desta forma, os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho de *H. longipinna* ressaltam a diversidade cariotípica encontrada dentro de *Harttia*, além de apresentarem a primeiro relato de cromossomo B para este gênero.

Introdução

O gênero *Harttia* é representado por peixes de pequeno porte, pertencentes à subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae), com aproximadamente vinte e três espécies reconhecidas e endêmicas da região Neotropical (Oyakawa, 1993; Froese & Pauli, 2012). Membros dessa subfamília são caracterizados por apresentar pedúnculo caudal longo e achatado, sem nadadeira adiposa. Apresentam também variação na forma do corpo, na morfologia do lábio e na dentição. O dimorfismo sexual é muitas vezes pronunciado e se expressa através da hipertrofia de odontódeos sobre os raios da nadadeira peitoral, na margem do focinho e, às vezes, sobre a área predorsal de machos maduros. Certos gêneros também apresentam diferenças sexuais no lábio e estruturas dentárias (Covain & Fisch-Muller, 2007).

O gênero *Harttia* é considerado basal dentro de Loricariinae (Harttiini), seguido pelos clados irmãos de Loricariini, *Sturisoma* e *Farlowella* (Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Covain *et al.*, 2008). Até o presente momento, somente quatro espécies foram caracterizadas citogeneticamente: *H. kronei* (Miranda Ribeiro, 1908) apresentando $2n=58$ (Alves *et al.*, 2003), *H. loricariformis* (Steindachner, 1877) com $2n=56$ (Kavalco *et al.*, 2004), *H. carvalhoi* (Miranda Ribeiro, 1939) com $2n=52$ nas fêmeas e $2n=53$ nos machos em decorrência de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos (Centofante *et al.*, 2006) e *Harttia* sp.n. com $2n=62$ cromossomos (Rodrigues, 2010).

De acordo com Camacho (1993), cromossomos supranumerários ou Bs são considerados adicionais e não-homólogos ao complemento A, apresentam evolução própria e são considerados dispensáveis para o desenvolvimento dos organismos. Entretanto Yoshida *et al.* (2011) encontraram um efeito funcional destes cromossomos para a determinação do sexo em fêmeas de ciclídeos do lago Vitória, África. Jones & Rees (1982), que realizaram estudos mais detalhados sobre as características dos cromossomos B, consideraram que: (a) eles não são essenciais para a reprodução,

desenvolvimento e sobrevivência dos organismos; (b) mostram variabilidade intra e inter-individual em frequência numérica, variando também com relação á morfologia; (c) não são homólogos a nenhum cromossomo do complemento A; (d) são geralmente compostos por heterocromatina, desprovidos de genes, não apresentam efeito genotípico detectável e (e) não apresentam segregação mendeliana, não exibindo um comportamento definido na divisão meiótica e mitótica.

Em peixes neotropicais, há aproximadamente 61 relatos de cromossomo B (Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, para a família Loricariidae, até o presente momento, apenas em sete espécies foram observados esses cromossomos adicionais (Andreatta *et al.*, 1993; Scavone & Júlio Júnior, 1994; Alves *et al.*, 1999;. Souza Paes *et al.*, 2009) . Embora, até o presente momento, nenhuma relação entre a ocorrência de cromossomos B e a determinação sexual foi observada em peixes neotropicais de água doce, alguns estudos têm sugerido que os cromossomos B poderiam influenciar na determinação do sexo em algumas espécies de peixes (Noletto *et al.*, 2012).

Considerando este contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar *H. longipinna* (Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001), utilizando-se de ferramentas de citogenética clássica e molecular. A partir destes dados, realizou-se a primeira descrição da ocorrência de cromossomos B em *Harttia*, além de inferir sobre os possíveis processos de diversificação cromossômica nesse grupo de peixes.

Material e Métodos

Metodologias de citogenética clássica e molecular foram aplicadas em 50 espécimes (30 machos e 20 fêmeas) de *Harttia longipinna* provenientes da calha principal do rio São Francisco, no município de Pirapora, Estado de Minas Gerais, Brasil. Os cromossomos metafásicos foram obtidos do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993) e classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st) e acrocêntrico (a) de acordo com a razão de braços (Levan *et al.*, 1964). O padrão de distribuição heterocromática foi obtido segundo Sumner (1972), com modificações na etapa de coloração (Lui *et al.*, 2009). As regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) foram obtidas segundo metodologia descrita por Howell & Black (1980). A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo geral descrito por Pinkel *et al.* (1986), utilizando sonda de rDNA 18S (Hatanaka & Galetti Jr., 2004), rDNA 5S (Martins & Galetti Jr., 1999) e sonda telomérica (Ijdo *et al.*, 1991). As sondas de rDNA 18S e rDNA 5S foram marcadas por *nick translation* com biotina-16-dUTP (Biotin Nick Translation mix - Roche) e digoxigenina 11-dUTP (Dig 11 Nick Translation mix – Roche), respectivamente, de acordo com recomendações do fabricante. A sonda [TTAGGG]_n foi marcada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando biotina-16-dUTP (Roche Applied Science). Todas as hibridizações foram realizadas com estringência de 77 % (200 ng de cada sonda, 50 % de formamida, 10 % de sulfato dextrano, 2xSSC). As metáfases foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) e as imagens capturadas pelo próprio sistema da câmera (Olympus DP72).

Resultados

Os espécimes analisados apresentaram $2n=58$ cromossomos (16m+12sm+16st+14a), com número fundamental (NF) igual a 102, tanto em machos quanto em fêmeas, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (Fig. 1). A análise dos 50 exemplares, demonstraram que em 23 espécimes (16 machos e 7 fêmeas) apresentaram micro cromossomos B de tamanho similares (Fig 1.1; Fig 1.2 e Tab. 1). Entre os exemplares portadores de cromossomos B, foi verificado que 15 (9 machos e 6 fêmeas) apresentaram uma variação de 0-1 cromossomo B, e em 8 exemplares (7 machos e 1 fêmea) a variação observada destes cromossomos foi de 0-2 (Tab. 1).

Ainda entre os exemplares portadores de cromossomos B, 12 (7 machos e 5 fêmeas) apresentaram 100% das células evidenciando este elemento supranumerário, enquanto que em 11 exemplares (9 machos e 2 fêmeas), que corresponde a 47,8% dos casos de cromossomos B encontrados, foi constatada instabilidade intra-individual, pois a frequência destes cromossomos variou de 17,9% a 90% das células analisadas (Tab. 1)

O bandamento C evidenciou uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva C-positiva, preferencialmente alocada em posição pericentromérica de alguns cromossomos do complemento A. Entretanto, os pares cromossômicos 7, 8 e 20 apresentaram um bloco proeminente C+ abrangendo quase que a totalidade do braço curto desses cromossomos. Destacam-se, também, dois blocos heterocromáticos evidentes no par 23, sendo um em posição intersticial do braço longo e outro na região pericêntrica. Os pares cromossômicos 3, 10, 13, 16 e 19 apresentam discretas bandas heterocromáticas na região pericentromérica. Os cromossomos B apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Fig. 1.2).

A coloração com nitrato de prata evidenciou NORs simples alocadas na região proximal do braço longo do par 23, coincidente com o bloco de heterocromatina e adjacente ao outro grande bloco intersticial (Fig.1.2, em destaque). A FISH com sonda de rDNA 18S confirmou os resultados quanto

ao número e localização de NORs, previamente evidenciados pela coloração com o nitrato de prata (Fig. 1.3) e as hibridações com sonda de rDNA 5S evidenciaram um único par desse marcador, presente na posição pericentromérica do braço curto de um par submetacêntrico 11 (Fig. 1.3). A FISH com sonda telomérica evidenciou todas as regiões terminais, inclusive as do cromossomo B, não sendo detectada a presença de ITSs (Interstitial Telomeric Sites) no cariótipo (Fig 1.4).

Discussão

No gênero *Harttia*, o número diploide varia de 52 cromossomos observado em fêmeas de *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) a 62 cromossomos verificado em *Harttia* sp. n (Rodrigues, 2010). Alves *et al.* (2003) caracterizaram uma população de *H. kronei* como portadora de um número diploide igual a 58 cromossomos, similar ao encontrado em *H. longipinna* (Fig. 1.1). Kavalco *et al.* (2004) encontraram, em uma população de *H. loricariformis*, um número diploide de 56 cromossomos e Centofante *et al.* (2006) caracterizaram uma população de *Harttia carvalhoi*, encontrando número diploide de 52 cromossomos para as fêmeas e 53 cromossomos para os machos, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY₁Y₂, condição esta apomórfica no gênero. Costa-Silva (2009) utilizando marcadores mitocondriais e nucleares, em uma análise filogenética entre diversas espécies de *Harttia*, demonstrou que *H. kronei* apresenta uma posição mais basal entre as espécies descritas para o Sul e Sudeste do Brasil. Considerando que *Harttia* sp. n apresenta 2n=62 cromossomos, dois caminhos de diferenciação cariotípica podem ser observados em *Harttia*: (i) redução do 2n através da fusão cêntrica entre espécies com 2n menor do que 58 cromossomos e (ii) aumento do 2n atribuída à fissão Robertsoniana em *Harttia* sp. n, corroborando com os mecanismos descritos para a diferenciação cariotípica em Loricariinae (Rosa *et al.*, 2012).

Uma pequena quantidade de heterocromatina foi identificada no cariótipo de *H. longipinna*, preferencialmente alocada nas regiões pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos do complemento A. Esta distribuição restrita da heterocromatina parece ser uma característica inerente das espécies de *Harttia*, como observado em *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003), *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004), *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010).

A localização dos sítios de rDNA 5S e 18S têm se apresentada muito diversificada em peixes neotropicais, ocorrendo em poucos ou muitos cromossomos, o que permite que, em alguns casos, esses sítios estejam alocados em condição de sintênica (Martins & Galetti, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002). No gênero *Harttia*, duas espécies apresentam esta condição sintênica: *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004) e *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006). Inversamente, *H. longipinna*, espécie caracterizada neste estudo (Fig. 1.3), assim como *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003) e *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010) apresentam essas famílias de rDNA alocadas em diferentes cromossomos.

A coloração com nitrato de prata e a FISH com sonda de rDNA 18S evidenciaram NORs simples em todas as espécies de *Harttia* até então estudadas. Um único par portador da NOR em localização intersticial é considerado uma característica primitiva em Loricariidae, sendo esta mantida na maioria das espécies com $2n=54$ cromossomos (Artoni & Bertollo, 2001; Kavalco *et al.*, 2005; Ziemniczak *et al.*, 2012). Em *Harttia*, os cromossomos portadores desse cístron ribossomal não se mostram constantes entre as espécies até o presente momento analisadas. Em *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2005), *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006) e *H. longipinna* (presente trabalho) as NORs encontram-se alocadas em cromossomos correspondentes, sendo o maior par acrocêntrico do cariótipo (Fig. 1.3). Em contrapartida, em *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003) e *Harttia* n. sp. (Rodrigues, 2010), este sítio encontra-se alocado em cromossomos metacêntricos. Esta variação na morfologia destes cromossomos é possivelmente um indicativo de rearranjos cromossômicos, mais especificamente de inversões pericêntricas.

A escassez de dados sobre a localização do gene de rDNA 5S entre os Siluriformes, mais especificamente na família Loricariidae, torna difícil a utilização desse marcador na construção de um provável agrupamento de espécies relacionadas (Kavalco *et al.*, 2004). Assim como o encontrado em *H. longipinna*, na maioria das espécies de *Harttia* analisadas até o presente momento, os sítios de rDNA 5S estão alocados em somente um único par cromossômico, sendo *H. carvalhoi* a única a apresentar dois pares cromossômicos portadores desse cístron (Centofante *et al.*, 2006). Desta forma, com base na diferenciação cariotípica de Loricariidae, pode-se sugerir que a presença de um único par cromossômico portando o sítio de rDNA 5S deva ser uma característica basal dentro de *Harttia*. Ziemniczak *et al.* (2012) propuseram que a sintenia entre os rDNAs 5S e 18S poderia corresponder a um estado primitivo em Loricariidae, pois esta condição é detectada em espécies com um número diploide basal de 54 cromossomos e em espécies do grupo irmão, Trichomycteridae. Assim, a presença da condição não-sintênica em *H. longipinna* poderia representar um estado derivado na diferenciação cromossômica no gênero *Harttia*.

Comparando-se os dados de citogenética clássica (Giemsa, bandeamento C e Ag-NOR) e molecular (FISH com sondas de rDNA 5S e 18S) de *H. longipinna* apresentados acima, com os dados disponíveis da literatura de outras espécies do gênero, fica evidente que as variações cariotípicas, sejam elas numéricas ou estruturais, aliadas às diferenças morfológicas, levaram a uma grande diversidade em *Harttia*. A origem dos cromossomos supranumerários não é claramente conhecida, sendo que diferentes teorias têm sido propostas. Entretanto, a maioria dos autores acredita na hipótese de que esses segmentos de cromossomos emergem de elementos do complemento padrão (Camacho *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2011). Em *H. longipinna*, os rearranjos cromossômicos envolvidos na diferenciação Loricariidae poderiam ter criado uma condição favorável para a formação e manutenção de cromossomos B a partir do complemento A.

Andreatta *et al.* (1993) descreveram para duas populações de *Hisonotus leucofrenatus* [Britski & Garavello, 2007 (citado como *Microlepidogaster leucofrenatus*)] provenientes do rio Marumbi, além de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, até dois macro-cromossomos B metacêntricos. Além dos cromossomos B grandes de *H. leucofrenatus*, micro-cromossomos B têm sido relatados em quatro espécies de loricariídeos. Scavone & Júlio Júnior (1994) encontraram de 1 a 3 micro-cromossomos B em *Loricaria* sp. e até 5 micro-cromossomos B em *Loricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978), ambos provenientes do rio Paraná (PR). Alves *et al.* (1999) evidenciaram em uma população de *Neoplecostomus paranensis* (Langeani, 1990) da bacia do rio Paranapanema até dois micro-cromossomos B. No presente trabalho foi apresentada a primeira ocorrência de cromossomos B em *Harttia*, sendo que nenhuma evidência sobre a influência desses cromossomos na determinação do sexo foi visualizado.

De acordo com Jones & Rees (1982), o termo cromossomo B pode ser aplicado apenas em casos nos quais os cromossomos supranumerários exibem uma frequência particular na população e representam uma característica intrínseca da mesma, ou seja, representem um polimorfismo ao invés de uma simples variação. Na população de *H. longipinna* analisada no presente trabalho, 46 % dos espécimes analisados apresentam, pelo menos, um cromossomo supranumerário (Tab. 1). Esses cromossomos B foram detectados em um número máximo de dois por célula, tanto em machos quanto em fêmeas (16 machos e 7 fêmeas) (Tabela 1). Segundo Camacho *et al.* (2000), o número máximo de cromossomos B suportado por uma população é resultante do balanço entre o sistema de acúmulo (aumento da frequência) e os efeitos prejudiciais que esses cromossomos podem gerar aos seus portadores. A frequência de cromossomos B na população de *H. longipinna*, aqui estudada, indica uma instabilidade mitótica em 47,8 % dos casos, independentemente do sexo. Em aproximadamente 40 % dos casos em peixes neotropicais, apenas um cromossomo B por indivíduo foi encontrado (Carvalho *et al.*, 2008; Lui *et al.*, 2009). Entretanto, Erdtmann *et al.* (1990) mostraram que em *Callichthys*

callichthys (Linnaeus, 1758), esse número pode chegar a até 16 cromossomos B. Entre os loricariídeos, a maioria das espécies analisadas apresentou uma variação de até dois cromossomos supranumerários (Carvalho *et al.*, 2008), no entanto em *L. prolixa* (Scavone e Júlio-Júnior, 1994) uma variação de até 5 micro-cromossomos B foi encontrada.

Os cromossomos B podem apresentar um comportamento peculiar conhecido como desvio meiótico, preferencialmente presentes em um dos sexos (Zimmering *et al.*, 1970). Em *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842), por exemplo, as fêmeas de algumas das populações analisadas preferencialmente continham cromossomos B (Vicente *et al.*, 1996;. Moreira-Filho *et al.*, 2004). Em *H. longipinna*, as frequências de espécimes machos e fêmeas foram de 60 % e 40 % dos animais analisados, respectivamente. Com base na ocorrência de cromossomos B, 69,5% dos espécimes portadores desses cromossomos eram do sexo masculino e 30,5% eram do sexo feminino. Comparando estes valores com os dos totais de machos e fêmeas analisados, nenhum desvio evidente entre a incidência dos cromossomos B e o sexo dos espécimes foi visualizado (Tab. 1).

Em condições ambientais ótimas para a sobrevivência da espécie espera-se encontrar uma maior frequência de polimorfismos cromossômicos, devido à menor pressão de seleção (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Além disso, as condições ambientais podem, em alguns casos, estar diretamente relacionada com a presença e quantidade de cromossomos B que uma população é capaz de suportar (Hewitt & Brown, 1970; Hewitt & Ruscoe, 1971; Néó *et al.*, 2000). Por exemplo, diferentes populações de uma espécie de gafanhoto, *Myrmeleotettix maculatus* (Thunberg 1815), apresentam variação no número de cromossomos B nas diferentes localidades estudadas, sendo possivelmente relacionadas as diferenças das condições ambientais das regiões (Hewitt & Brown, 1970; Hewitt & Ruscoe, 1971). Esta variação na quantidade de cromossomas B não deve estar associada com um único elemento, de modo que uma grande variedade de fatores ambientais deva ser considerada para esta situação (Jones & Rees, 1982). Com relação aos peixes, Néó *et al.* (2000) encontraram um aumento na

frequência de cromossomos B em *A. scabripinnis*, em um gradiente de populações oriundas de regiões de menor para maiores altitudes na Serra da Mantiqueira. Considerando que as populações de *Harttia* são altamente adaptadas para explorar micro-habitats restritos de riachos e rios (Covain & Fisch-Muller, 2007), a formação de pequenas populações semi-isoladas reduz o fluxo gênico entre elas. Com base nessas características, esta condição ambiental pode favorecer o estabelecimento de rearranjos estruturais como, por exemplo, os cromossomos B encontrados em *H. longipinna*.

Neste contexto, essa diversificação na macroestrutura cromossômica, seja ela representada por diferentes números diploides (sistema de cromossomos sexuais e cromossomos B), distintas fórmulas cariotípicas, ou número e posições dos genes ribossomais 5S e 18S, são forte evidência de uma diversificação cariotípica acompanhada de uma diferenciação morfológica, assim como o modo de exploração dos micro-habitat específicos nos ambientes lóticos e sua distribuição geográfica pela região Neotropical faz com que o gênero *Harttia* possa ser considerado um excelente modelo para estudos de ordem evolutiva.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa pela identificação dos exemplares, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Técnico do Estado do Paraná).

Referências

- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Moysés CB, Fonteles SBA, Lopes CE, Akama A and Foresti F (2002) Chromosome evolution in fish: Sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae). **Cytogenet Genome Res** 99:164-169.
- Alves LA, Oliveira C, Foresti F (1999) Ocorrência de microcromossomos B em *Neoplecostomus paranensis* (Siluriformes, Loricariidae). **Genet Mol Biol**, 22 (Suppl), 67.
- Alves AL, Oliveira C, Foresti F (2003) Karyotipe variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia** 56:57-63.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho AS (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II ZZ/ZW sex chromosome system, B-chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. **Cytogenet Cell Genet** 63:215-220.
- Artoni RF, Bertollo LAC (2001) Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134:201-210.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet** 2: 103-120.
- Camacho JPM (1993) **Polymorphisms and geographic distribution**. Proc. First B Chromosome Conference, Madrid, Espanha, 2-4.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol Sci* 55: 163-178.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **J Fish Biol** 72:1907-1932.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2006) Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet Genome Res** 112: 320-324.

- Costa-Silva GJ (2009) **Análise filogenética entre gêneros da subfamília Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*, baseada em caracteres moleculares**. MSc dissertation [in Portuguese] Botucatu, Brazil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 58pp.
- Covain R, Fisch-Muller S (2007) The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. **Zootaxa** 1462: 1-40.
- Covain R, Dray S, Fisch-Muller S, Montoya-Burgos JI (2008) Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. **Mol Phylogenet Evol** 46: 986-1002.
- Erdtmann B, Calcagnoto D, Rabolini L, Malabarba LR (1990) Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Pisces). **Ciênc Cult** 42:452.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Froese R, Pauly D (2012). Editors. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2011). [Accessed 16 february 2012].
- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122: 239-244.
- Hewitt GM, Brow F M (1970) The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) V. A steep cline in East Anglia. **Heredity** 25: 363-371.
- Hewitt GM, Ruscoe C (1971) Changes in microclimate correlated with a cline for B-chromosome in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) (Orthoptera: Acrididae). **J Anim Ecol** 16: 548-578.
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015.

- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res** 19:4780.
- Jones RN, Rees H, (1982) **B Chromosomes**. Academic Press, London.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004) Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Heredity** 141:237-242.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity** 94:180-186.
- Langeani F, Oyakawa OT, Montoya-Burgos JI (2001). New species of *Harttia* (Loricariidae, Loricariinae) from the Rio São Francisco Basin. **Copéia** 1: 136-142.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52:201-220 (1964).
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron** 40(5-6):552-559.
- Martins C, Galetti Jr, PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 7:363-367.
- Martins C, Galetti Jr. PM (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? **Genetica** 111(1-3):439-446.
- Montoya-Burgos JI, Muller S, Weber C, Pawlowski J (1998) **Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences**, pp. 363-374. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds). Phylogeny and Classification of neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC (2004) B chromosomes in the fish “*Astyanax scabripinnis*” (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenet Genome Res** 106:230-234.

- Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** 108: 211-215.
- Noieto RB, Vicari MR, Cestari MM, Artoni RF (2012) Variable B chromosomes frequencies between males and females of two species of pufferfishes (Tetraodontiformes). **Rev Fish Biol Fisheries** 22: 343-349.
- Oyakawa O (1993) Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner, 1876 da região sudeste do Brasil, e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comum Mus Ciênc PUCRS, ser Zool** 6:3-27.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83: 2934-2938.
- Rodrigues RM (2010) **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em species de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspective evolutiva**. MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. 2018p.
- Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, Vicari MR (2012) Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Rev Fish Biol Fisheries**. 22(3): 739-749.
- Scavone MPD, Júlio HF Jr (1994) Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. females (Loricariidae - Siluriformes) from the Paraná River basin. **Rev Ictiol** 2/3:41-47.
- Souza Paes AC, Nagamachi YC, Milhomem RSS, Feldberg E, Pieczarka CJ (2009) Cytogenetic analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Comp Cytogenet** 3:31-32.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res** 75:304-306.

- Vicari MR, Pistone HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica** 139:1073–1081.
- Vicente VE, Moreira-Filho O and Camacho JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Cell Genet** 74:70-75.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N (2011) B chromosomes have a functional effect on female sex determination in lake Victoria cichlid fishes. **PLoS Genetic** 7(8): e1002203. doi:10.1371/journal.pgen.1002203.
- Zienniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR (2012) Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Ital J Zool.** Doi:10.1080/11250003.2012.676677
- Zimmering S, Sandler L, Nicoletti B (1970) Mechanisms of meiotic drive. **Annu Rev Genet** 4: 409-436.

Anexos

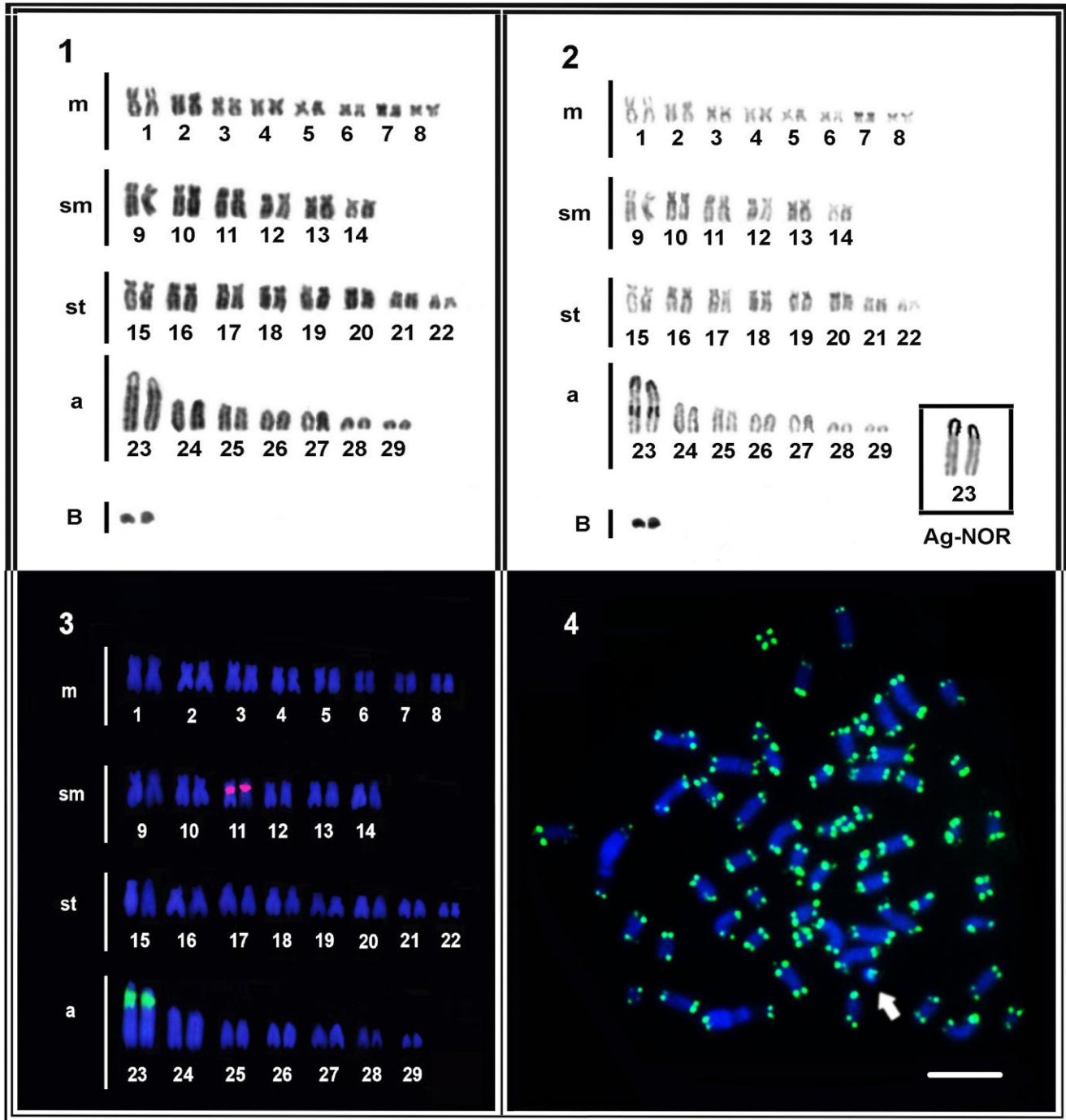


Figura 1. Cariótipo de *H. longipinna*. (1) Coloração convencional por Giemsa, (2) Bandamento C, com Ag-NOR em destaque, (3) Double-FISH com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho), (4) Metáfase submetida a hibridização com sonda de DNA telomérico. A seta indica o cromossomo B. Barra=10 µm.

Tabela1. Frequência de cromossomo B em população natural de *Hartia longipina*

Espécimes	Sexo	Número de B/célula			Células analisadas	Células com B (%)
		0 B	1 B	2 B		
19600	♂	-	32	-	32	100
19602	♀	-	8	8	16	100
19604	♀	28	-	-	28	0
19609	♀	-	12	-	12	100
19662	♂	16	-	-	16	0
19663	♂	8	-	-	8	0
19665	♀	15	-	-	15	0
19668	♀	8	36	-	44	<u>81,8 82</u>
19669	♀	36	-	-	36	0
19670	♂	24	-	-	24	0
19676	♀	16	-	-	16	0
20151	♂	8	2	-	10	20
20152	♂	4	36	-	40	90
20154	♂	13	-	-	13	0
20156	♂	16	5	-	21	<u>23,8 24</u>
20157	♀	-	8	-	8	100
20159	♀	12	-	-	12	0
20160	♂	-	16	12	28	100
20161	♂	32	7	-	39	<u>17,9 18</u>
20162	♂	35	-	-	35	0
20163	♂	17	-	-	17	0
20164	♂	32	-	-	32	0
20165	♂	-	15	13	28	100
20166	♂	13	8	-	21	38,1
20167	♂	14	-	-	14	0
20168	♀	9	-	-	9	0
20169	♀	-	18	-	18	100
20171	♀	12	-	-	12	0
20172	♂	23	-	-	23	0
20175	♀	12	-	-	12	0
20176	♂	7	5	1	13	46,2
20177	♂	-	10	4	14	100
20178	♂	-	11	15	26	100
20179	♂	5	9	21	35	85,7
20180	♀	8	-	-	8	0
20181	♂	13	-	-	13	0
20182	♂	7	-	-	7	0
20183	♀	-	19	-	19	100
20185	♀	10	4	-	14	28,6
20186	♂	1	9	-	10	90
20187	♀	28	-	-	28	0
20188	♂	3	9	6	18	83,3
20189	♂	9	-	-	9	0
20191	♀	24	-	-	24	0
20192	♀	12	-	-	12	0
20193	♀	17	-	-	17	0
20194	♂	15	-	-	15	0
20196	♂	-	9	-	9	100
20197	♂	13	-	-	13	0
20198	♂	-	14	-	14	100
TOTAL	50	575	302	80	957	

Capítulo III

ORIGEM DO SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ DE *Harttia punctata* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE): PINTURA CROMOSSÔMICA E GENES RIBOSSOMAIS 5S E 18S

Palavras chave: diversificação cariotípica, translocação, origem independente.

Artigo em preparação

Resumo

Harttia é um gênero da subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae), que abriga peixes popularmente conhecidos como cascudos e acaris. Apresenta ampla diversidade cariotípica no tocante a variação numérica/estrutural interespecífica dos cariótipos aliada a presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo XX/XY₁Y₂ encontrado em *H. carvalhoi*. Considerando este contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar cromossomicamente, pela primeira vez, *Harttia punctata*, assim como inferir sobre os rearranjos que originaram o sistema sexual múltiplo X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y, presente nesta espécie. Os dados obtidos no presente trabalho tanto pelas metodologias clássicas (Giemsa, bandamento C e Ag-NOR) como moleculares (hibridização *in situ* fluorescente) e por microdissecção cromossômica indicam que translocação parcial entre distintos cromossomos acrocêntricos, acompanhada por deleções em ambos cromossomos devem ter originado o cromossomo neo-Y desta espécie. Os dados também indicam que os sistemas de cromossomos sexuais múltiplos presentes em *Harttia carvalhoi* e *Harttia punctata* tiveram provável origem independente.

Introdução

A transformação de cromossomos autossômicos em sexuais diferenciados é devida, principalmente, (i) aquisição de sequência benéfica a determinação do sexo, (ii) mutações e (iii) ao acúmulo de mutações não funcionais em regiões específicas de alguns cromossomos a ponto destes se tornarem heteromórficos. Essa retenção não aleatória de algumas mutações possivelmente foi facilitada por uma redução geral na taxa de mutações no genoma dos indivíduos do sexo heteromórfico (Lucchesi, 1999).

Os peixes neotropicais apresentam sete distintos de sistemas de cromossomos sexuais, sendo três sistemas simples (XX/X_0 , XX/XY , ZZ/ZW) e quatro múltiplos (XX/XY_1Y_2 , $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, ZZ/ZW_1W_2 , $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$) (Oliveir *et al.*, 2009). A heterogametia feminina é mais frequente, sendo encontrada em mais da metade dos casos reportados, estando estes, preferencialmente entre espécies da ordem Characiformes (Moreira-Filho *et al.*, 1993). Especificamente entre os loricariídeos, alguns sistemas simples e múltiplos são representados entre espécies das subfamílias Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae. Segundo Kitano & Peichel (2011), dentre os sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, o mais comumente encontrado em peixes é o X_1X_2Y . Segundo os mesmos autores, presença de sistema de cromossomos sexuais em diferentes grupos de peixes indica que esses sistemas tenham se originado de linhagens independentes.

Para o gênero *Harttia*, até o presente momento, somente um caso de sistema de cromossomos sexuais havia sido descrito. Centofante *et al.* (2006) encontraram para *H. carvalhoi* um número diploide de 52 cromossomos para fêmeas e 53 cromossomos para machos caracterizando, assim, um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY_1Y_2 . Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar cromossomicamente *Harttia punctata*, além de descrever um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e inferir sobre os possíveis rearranjos cromossômicos que originaram este sistema.

Materiais e Métodos

Foram analisados, no tocante às metodologias citogenéticas clássicas e moleculares, 32 espécimes (18 machos e 14 fêmeas) de *Harttia punctata* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001 provenientes do rio Itiquira, pertencente à bacia do Tocantins, próximo ao município de Formosa, Goiás, Brasil, GPS: 15°19'25"S; 47°25'26"W. Os exemplares foram depositados no Museu de Zoologia da USP, sob o número de registro MZUSP 111385.

Os animais foram anestesiados com óleo de cravo de acordo com a metodologia descrita por Griffiths (2000). Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993) e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com a relação de braços (Levan *et al.*, 1964). Para determinar o número fundamental (NF), cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados portadores de dois braços cromossômicos e os acrocêntricos como portadores de apenas um braço. A distribuição das heterocromatinas C-positivas foi obtida conforme Sumner (1972), com modificações segundo Lui *et al.* (2009), e a localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) foi obtida segundo protocolo descrito por Howell & Black (1980). As técnicas de Bandamento C e Ag-NOR foram realizadas utilizando-se das mesmas metáfases anteriormente coradas com Giemsa (análise sequencial).

Seis sondas foram utilizadas na hibridização *in situ* fluorescente: uma sonda de rDNA 5S isolada do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti, 1999), uma sonda de rDNA 18S obtida do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004), sondas de sequências repetitivas [TTAGGG]_n e [GATA]_n (Ijdo *et al.*, 1991) e duas sondas obtidas a partir da microdissecção total dos cromossomos X₁ e X₂ de *H. punctata*. A microdissecção cromossômica foi

realizada em microscópio invertido (Olympus IX51) equipado com micromanipulador mecânico (Narishige). Os capilares de vidro utilizados para microdissecção foram produzidos por um puxador de micropipeta (Narishige) e apresentavam 0.7 μm de diâmetro. Foram microdissectados dez cromossomos X_1 e dez cromossomos X_2 , os quais foram transferidos para microtubos e posteriormente amplificados pelo kit Genome Plex[®] Single Cell - Whole Genome Amplification - WGA4 (Sigma), segundo recomendações do fabricante. O produto da amplificação dos cromossomos X_1 e X_2 foi purificado utilizando o kit GenElute[™] PCR Clean-Up (Sigma). Posteriormente, o produto purificado, referente aos cromossomos X_1 e X_2 de *H. punctata*, foi utilizado para reamplificar este DNA a ser utilizado como sonda cromossômica utilizando o kit Genome Plex[®] Whole Genome Amplification – WGA3 (Sigma). Na reação de amplificação WGA3 foi incorporado o nucleotídeo digoxigenina 11-dUTP para o cromossomo X_1 e; biotina 16--dUTP para o cromossomo X_2 , ambos na razão (7 dTTP: 3 dUTP marcado). As sondas de rDNA 18S e 5S foram marcadas por *nick translation* usando biotina-16-dUTP (Biotin Nick Translation mix - Roche) e digoxigenina 11-dUTP (Dig 11 Nick Translation mix – Roche), respectivamente, de acordo com as recomendações do fabricante. A sonda de [TTAGGG]_n e [GATA]_n foram obtidas por reação da polimerase em cadeia (PCR) e marcadas com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science).

Todo o processo de hibridização seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), sob alta condição de estringência – 77% (200 – 400 ng de cada sonda, 50 % de formamida, 10 % de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 – 7,2, a 37 °C *overnight*). Para as pinturas cromossômicas com as sondas dos cromossomos X_1 e X_2 foi realizada uma pré-hibridação e supressão das cópias de DNA repetitivo. Essa etapa consistiu em desnaturar o DNA cromossômico e aguardar uma renaturação inicial a 37 °C por 15 minutos e; acrescentar 1 μg de uma mistura de retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* para o *mix* de hibridação, desnaturar e, antes de colocar em contato com o material cromossômico aguardar uma renaturação a 37 °C por 15 minutos. 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). Aproximadamente 30 metáfases foram analisadas para se determinar número diploide, fórmula cariotípica, presença e localização dos sítios ribossomais e ausência ou presença de ITS. Foi considerado um sinal verdadeiro de hibridização os que apresentavam repetitividade de 100%.

Resultados

O número diploide encontrado para *H. punctata* foi de 58 cromossomos para as fêmeas e 57 para os machos, ambos apresentaram NF=116, sendo o cariótipo das fêmeas constituído por 16 metacêntricos (m), 20 submetacêntricos (sm), 12 subtelocêntricos (st) e 10 acrocêntricos (a) e o dos machos, por 16 metacêntricos (m), 21 submetacêntricos (sm), 12 pares subtelocêntricos (st) e 8 acrocêntricos. Desta forma, é claramente destacável uma heterogametia masculina representada por um cromossomo submetacêntrico grande presente exclusivamente no cariótipo dos machos, além de dois cromossomos acrocêntricos sem seus homólogos, correspondentes aos pares 25 e 26 nas fêmeas (Fig. 1).

A heterocromatina apresentou-se preferencialmente alocada, em ambos os sexos, na região pericentromérica de alguns cromossomos do complemento. É pertinente ressaltar três grandes blocos heterocromáticos alocados nos dois maiores pares acrocêntricos em ambos os sexos, sendo que no par cromossômico 25 foi encontrado um bloco proximal e um terminal, e no par 26 foi evidenciado um bloco na porção intersticial. Na porção terminal do braço longo do cromossomo submetacêntrico exclusivo dos machos foi verificado um bloco bem evidente de banda C positiva. As NORs

apresentaram-se alocadas na porção intersticial do par acrocêntrico 26, coincidente à banda heterocromática, cromossomo este que somente um dos homólogos foi encontrado no cariótipo dos machos (Figs. 1 e 2).

A FISH com sonda de rDNA 5S localizou estes sítios na região terminal do par acrocêntrico 25 nas fêmeas. Nos machos, este cístron apresentou-se no único homólogo correspondente ao par 25, na mesma posição do encontrado nas fêmeas, em contrapartida no cromossomo submetacêntrico exclusivo dos machos foi evidenciada uma marcação deste sítio na região terminal do braço longo. Tanto nos machos quanto nas fêmeas, os sítios de rDNA 5S encontram-se coincidentes com os blocos heterocromáticos (Fig. 2). Nenhum ITS (Interstitial Telomeric Sites) foi detectado no cariótipo com o emprego das sondas teloméricas (Fig. 2). A sequência $[GATA]_n$ não apresentou sinal visualizável por FISH (dados não mostrados).

A pintura cromossômica total com sonda do cromossomo X_1 nas fêmeas foi eficiente em localizar o par cromossômico X_1 , além da heterocromatina proximal do cromossomo X_2 . Já nos machos, a sonda X_1 localizou o cromossomo X_1 , a heterocromatina proximal do cromossomo X_2 e, praticamente toda a região distal do braço longo do cromossomo Y (Figura 3). Por sua vez, a pintura cromossômica total do cromossomo X_2 nas fêmeas foi eficiente em localizar o par cromossômico X_2 , além da heterocromatina proximal do cromossomo X_1 . Já nos machos a sonda X_2 marcou o cromossomo X_2 , a heterocromatina proximal do cromossomo X_1 e a extensão que compreende da região proximal do braço longo ao final do braço curto do cromossomo Y (Fig. 3). As regiões terminais dos braços longo dos cromossomos X_1 e X_2 mostraram uma pequena região compartilhada, as quais, com a pré-hibidação e supressão das cópias repetitivas não foram evidenciadas (dados não mostrados).

Discussão

Espécies de Loricariidae apresentam uma ampla diversificação cariotípica numérica e estrutural (Artoni & Bertollo, 2001; Rosa *et al.*, 2012; Ziemniczak *et al.*, 2012). No entanto, a presença de cromossomos sexuais nesta família é pouco frequente e principalmente descrita para a subfamília Hypostominae. A análise comparativa entre os cariótipos de machos e fêmeas de *Harttia punctata* mostrou um heteromorfismo entre os sexos compatível com a presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, no qual o cromossomo Y corresponderia ao submetacêntrico grande exclusivo dos machos e, os cromossomos X_1 e X_2 correspondem aos maiores pares acrocêntricos, 25 e 26, respectivamente (Fig. 1).

O sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ é observado, entre os peixes, em aproximadamente quarenta espécies distribuídas em quatorze ordens, sendo mais frequentemente encontrado em Perciformes (Kitano & Peichel, 2011). Segundo os mesmos autores, apesar de em alguns casos os autores não discutirem sobre a possível origem desse sistema sexual, em aproximadamente 25% dos casos foi atribuída a translocação como o provável rearranjo responsável pela origem do sistema de cromossomos sexuais múltiplos. É pertinente ressaltar que o caso relatado no presente trabalho corresponde à segunda descrição do sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ para a ordem Siluriformes e a primeira para a família Loricariidae.

Em peixes, os sistemas de cromossomos sexuais têm demonstrado origens independentes entre diferentes grupos ou famílias. No entanto, quando analisado um mesmo gênero ou família, geralmente estes sistemas apresentam origem comum (Artoni & Bertollo, 2002; Vicari *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2011; Schemberger *et al.*, 2011). No que diz respeito à diferenciação cariotípica e a presença de cromossomos sexuais em *Harttia*, a espécie *H. carvalhoi* apresenta o sistema XX/XY_1Y_2 com evidências de fissão cêntrica do maior par metacêntrico (cromossomo X) originando os cromossomos acrocêntricos Y_1 e Y_2 (Blanco *et al.*, 2012) e sem a presença de rDNAs nestes cromossomos. Por sua

vez, no presente estudo, *H. punctata* apresenta uma provável origem independente para o sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ verificada pela presença de rDNA nos cromossomos sexuais.

As espécies de *Harttia* analisadas até o presente momento apresentaram uma grande diversidade cariotípica, com diferenças consideráveis no número diploide: *H. carvalhoi* com $2n=52/53$ cromossomos (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012), *H. loricariformis* com $2n=56$ cromossomos (Kavalco *et al.*, 2005), *H. punctata* com $2n=57/58$ cromossomos (presente trabalho), *H. kronei* com $2n=58$ cromossomos (Alves *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2012) e *Harttia* sp. n. com $2n=62$ cromossomos (Rodrigues, 2010). Costa-Silva (2009) utilizou vários caracteres moleculares mitocondriais/nucleares e demonstraram que *H. kronei* (que apresenta $2n=58$ cromossomos) pode ser considerada basal para as espécies descritas para a região Sul e Sudeste do Brasil. Fusões e fissões cêntricas são os principais eventos responsáveis pela diferenciação de Loricariidae (Artoni & Bertollo, 2001; Rosa *et al.*, 2012; Ziemniczak *et al.*, 2012). *Harttia punctata* apresentou o $2n$ primitivo putativo do gênero e compartilha a ausência de ITS em espécies com número diploide de 58 cromossomos.

Uma pequena quantidade de heterocromatina foi evidenciada em *H. punctata*, assim como nas demais espécies de *Harttia* analisadas até o presente momento, inclusive em *H. carvalhoi*, que apresenta um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 (Centofante *et al.*, 2006). Segundo Moreira-Filho *et al.* (1993), essa pequena quantidade de heterocromatina seria restrita aquela já pré-existente (proximal e heterocromatina associada aos ribossomais nos cromossomos X_1 e X_2) nos cromossomos ancestrais que originaram tais sistemas. Essa condição seria importante para a estabilidade desses sistemas, considerando que a amplificação de grandes segmentos heterocromáticos, como geralmente verificado nos cromossomos W ou Y dos sistemas simples, poderia interferir no pareamento dos cromossomos trivalentes dos sistemas sexuais múltiplos e conseqüentemente no balanceamento meiótico (Moreira-Filho *et al.*, 1993).

A região organizadora de nucléolo está alocada em um cromossomo grande em todas as espécies de *Harttia* analisadas até o presente momento, sendo que em *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012), *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004) e *H. punctata* (presente trabalho) este sítio se encontra alocado na porção proximal de um grande par acrocêntrico. Por outro lado, em *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010) e *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003, Blanco *et al.*, 2012) este sítio ribossomal está alocado na porção intersticial do braço curto de um par metacêntrico. Esta análise comparativa interespecífica para a localização da NOR demonstra que este cromossomo esteve envolvido na diferenciação cariotípica numérica e estrutural no gênero *Harttia*.

A sequência [GATA]_n que foi primeiramente descoberta por Epplen *et al.* (1982) está diretamente relacionada com a evolução e diferenciação de sistemas sexuais em alguns grupos de cobras (Jones & Singh, 1985). Apesar de evidências de que essa sequência possa estar relacionada com estágios iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais em poecilídeos (Nanda *et al.*, 1992), os dados do presente trabalho sugerem que esta sequência não está diretamente relacionada com a diferenciação dos cromossomos sexuais em *Harttia punctata*, uma vez que tais repetições não foram detectadas no genoma por hibridização *in situ*.

Com relação ao rDNA 5S, este apresenta localização em um único par cromossômico não correspondente nas espécies analisadas: *H. loricariformis*, posição terminal do maior par acrocêntrico (Kavalco *et al.*, 2004); *Harttia* sp. n. posição intersticial do braço longo de um par submetacêntrico (Rodrigues, 2010) e *H. kronei*, porção proximal de um par metacêntrico pequeno (Alves *et al.*, 2003, Blanco *et al.*, 2012). Entretanto, em *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006 Blanco *et al.*, 2012) os sítios de rDNA 5S estão alocados em dois pares cromossômicos, sendo um na região terminal do maior par acrocêntrico e outro na região proximal de um par metacêntrico pequeno. *Harttia punctata* apresentou esse sítio ribossomal alocado na porção terminal do primeiro par acrocêntrico (par 25), cromossomos que podem ser considerados correspondentes aos encontrados em *H. carvalhoi* e *H. loricariformis*.

Nos cromossomos sexuais de peixes, os genes ribossomais 5,8S, 18S e 28S foram relatados presentes em *Fundulus diaphanus* (Howell & Black, 1979), *Salvelinus alpinus* (Reed & Phillips, 1995), *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2000), *Triportheus guentheri* (Artoni & Bertollo, 2002, Diniz *et al.*, 2007) e espécies do gênero *Characidium* (Machado *et al.*, 2011). A presença de cístrons de rDNA 5S em cromossomos sexuais somente é encontrado em peixes, até o presente momento em *Oncorhynchus mykiss* (Moram *et al.*, 1996) e em *Erythrinus erythrinus* (Cioffi *et al.*, 2010). Entretanto, em *Hoplias malabaricus* há uma família de DNA satélite denominada 5SHindIII, originada de uma repetição interna do gene ribossomal 5S, que é amplamente distribuída nesse complexo de espécie, estando presente inclusive nos cromossomos sexuais de alguns cariomorfos (Ferreira *et al.*, 2007). Assim como os exemplos citados anteriormente, é pertinente ressaltar que os sítios de DNA ribossômico 5S e 18S, nos espécimes de *Harttia punctata* analisados no presente trabalho, estão alocados nos cromossomos envolvidos no sistema sexual. Os sítios de rDNA 5S encontram-se na porção terminal do par cromossômico X₁ nas fêmeas e no cromossomo X₁ e Y, na mesma posição, nos machos. Em contrapartida, os sítios de rDNA 18S estão alocados nos cromossomo X₂, sendo nos machos encontrado somente um sítio. Este é o primeiro caso, em peixes, em que os dois ribossomais estão envolvidos simultaneamente em um sistema de cromossomos sexuais múltiplo.

Dentre os postulados existentes para a origem dos sistemas de cromossomos sexuais, a heterocromatinização e os rearranjos cromossômicos são os mais aceitos. Para a origem dos sistemas de cromossomos sexuais simples, o acúmulo diferencial de sequências repetitivas específicas, acompanhadas de sua amplificação em *tandem* é o passo mais importante, pois diminuiria, ou até mesmo cessaria a recombinação entre os cromossomos portadores de genes importantes na determinação do sexo diferenciando (Charlesworth *et al.*, 2005). Esse acúmulo diferencial de heterocromatina é claramente observado na diferenciação do cromossomo W no sistema ZZ/ZW em peixes (Haaf & Schmid 1984; Philips & Ihssen 1985; Galleti Jr & Foresti 1986; Moreira-Filho *et al.*

1993; Artoni *et al.* 2001; Vicari *et al.* 2006; Rosa *et al.* 2006; Diniz *et al.*, 2007). Com relação aos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, os rearranjos do tipo fissão e fusão cêntrica, além de inversões e translocações, são os responsáveis pela diferenciação dos cromossomos envolvidos na determinação do sexo, pois estes eventos propiciariam a formação de grupos de ligação entre genes anteriormente dispersos pelo genoma, facilitando desta forma, a fixação desses sistemas sexuais.

Os dados obtidos no presente trabalho tanto pelas metodologias clássicas (Giemsa, bandamento C e Ag-NOR) como moleculares (hibridizações *in situ* fluorescente) sugerem que um evento de inversão pericêntrica em heterozigose de um cromossomo do par 26, seguido de uma translocação envolvendo um dos homólogos dos pares 25 e 26 correspondentes ao cariótipo das fêmeas, teria promovido a união dos fragmentos terminais de cada um desses respectivos homólogos, com simultânea perda de fragmentos proximais dos dois pares, o que teria dado origem ao submetacêntrico neo-Y (Fig. 4). Esse evento poderia ter sido proporcionado por um pareamento errôneo entre cromossomos dos pares 25 e 26, devido ao fato desses cromossomos compartilharem uma similar heterocromatina equilocal (Fig. 4). Em *Harttia carvalhoi*, os cromossomos Y_1 e Y_2 , do sistema XX/XY_1Y_2 , originaram-se provavelmente de uma fissão de um dos homólogos do maior par metacêntrico (cromossomos X) (Blanco *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de na maioria dos relatos da origem desse sistema sexual múltiplo em peixes, os autores atribuírem às fusões como sendo o provável rearranjo que os originou, essa hipótese de translocação pode ser sustentada em *Harttia punctata* pela ausência de ITS no neo-Y, indicando que provavelmente não foi um evento de fusão/inversão paracêntrica que originou esse cromossomo e pela perda de um cístron de rDNA 18S nos machos (Fig. 2).

Por fim, o presente trabalho traz a descrição de um sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em *Harttia punctata*, sendo esta a segunda para a ordem Siluriformes e a primeira para a família Loricariidae. A presença de um sítio de rDNA 5S nos cromossomos Y e X_1 , a localização do sítio de

rDNA 18 no X_2 e as hibridizações com sonda de microdissecção total dos cromossomos X_1 e X_2 sugerem que este sistema se originou por um evento de translocação entre os cromossomos 25 e 26, acompanhada de deleções em ambos os cromossomos, originando o cromossomo neo-Y. Esses dados ressaltam a grande diversidade cariotípica encontrada no gênero *Harttia*, e podem conter informações relevantes para o entendimento da dinâmica da origem e manutenção desse sistema de cromossomos sexuais.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa pela identificação dos exemplares, aos técnicos de coleta Pedro Luis Gallo e Luis Henrique da Silva. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

Referências

- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134:201-210.
- Artoni, R. F.; L. A. C. Bertollo (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity** 89:15-19.

- Artoni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Na uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Res** 9:449–456
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics** 2: 103-120.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Traldi JB, Bertollo LA, Moreira-Filho, O. (2012). The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** On line.
- Born GG, Bertollo LAC (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research**, 8: 111-118.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2006) Cytogenetic characterization and description of na XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research** 12: 320-324.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity** 95: 118–128.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (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.
- Costa-Silva GJ (2009) **Análise filogenética entre gêneros da subfamília loricariinae (Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*, baseada em caracteres moleculares**. MSc dissertation (in Portuguese) Botucatu, Brazil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

- Diniz D, Moreira-filho O, Bertollo LAC (2007) Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica** 133:85-91.
- Epplen JT, McCarrey JR., 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. Proc. **Natl Acad. Sci.** 79:3798-3802.
- Ferreira IA, Bertollo LAC, 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'. **Cytogenetics and Genome Research** 118: 78-83.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with colchicine. **Experientia** 49: 810-813.
- Galetti PM Jr, Foresti F (1986). Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenet Cell Genet** 43:43-46
- Griffiths SP (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology** 57: 1453-1464.
- Haaf T, Schmid M (1984). An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). **Chromosoma** 89:37-41.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (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 WM, Black DA (1979). Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. **Copeia**, 3: 544-546
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015.

- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res.**19:4780.
- Jones KW, Singh L (1985). Snakes and the evolution of sex chromosomes. **Trends Genet.** 2:55-60.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. (2004). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Heredity** 141:237-242.
- Kitano J, Peichel CL (2011) Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. **Environ Biology and Fish** 94: 549-558.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- Lucchesi, JC (1999). On the origin of sex chromosomes. **BioEssays** 21:188-190.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron** 40: 552-559.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR. (2011) Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics** 12:65.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7: 363-367.
- Moran P, Martinez JL, Garcia-Vazquez E, Pendas AM (1996). Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenetic and Genome Research** 75: 2-3.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM (1993) Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia** 46:115-125.

- Nanda I, Scharl M, Feichtinger W, Epplen JT, Schmid M. (1992). Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. **Chromosoma** 101, 301-310.
- Phillips RB, Ihssen PE (1985). Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenet Cell Genet** 39:14–18
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (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.
- Rapp Py-Daniel LH, Oliveira EC (2001). Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyol. Explor. Freshwat** 12(1):79-96.
- Reed KM, Phillips RB (1995). Molecular cytogenetic analysis of the double-CMA3 chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 70: 104-107.
- Rodrigues RM (2010) **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em species de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. 2018p.
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP (2006). Constitutive heterochromatin, 5S and 18 rDNA genes in *Apareiodon* sp (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetica** 128:159–166.
- Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, Vicari MR (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(3): 739-749.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex

chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139:1499–1508.

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

Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LAC (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenet Genome Res** 114:163–168.

Zienniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR (2012). Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**. Doi:10.1080/11250003.2012.676677

Anexos

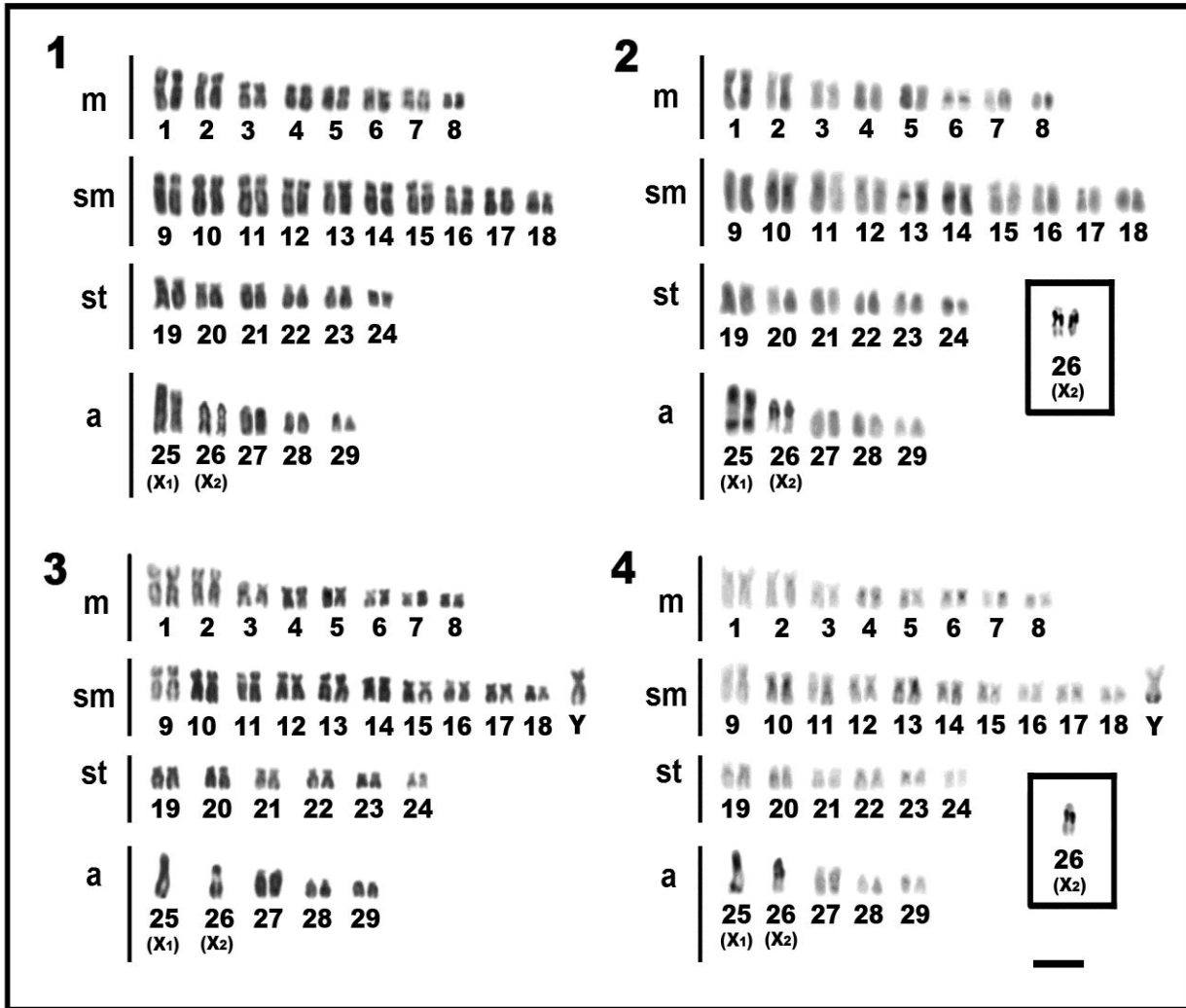


Figura 1. Cariótipos de fêmea (1, 2) e macho (3, 4) de *Harttia punctata* submetidos à coloração convencional por Giemsa (1, 3), bandamento C (2, 4) e Ag-NOR (em destaque). Barra = 10 µm.

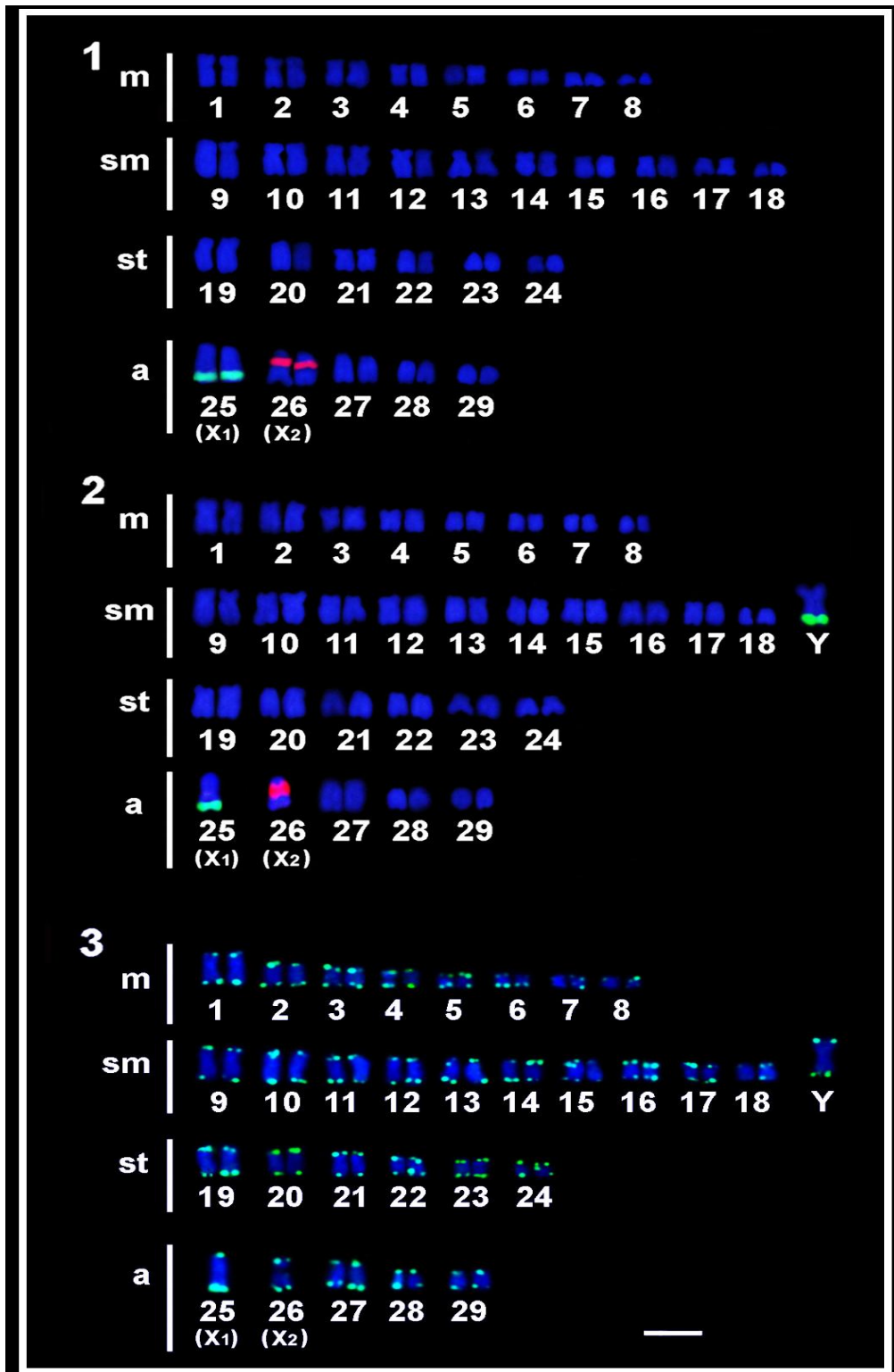


Figura 2. Cariótipos de fêmea (1) e macho (2) de *Harttia punctata* submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S (sinal verde) e rDNA 18S (sinal vermelho). Metáfase de macho de *H. punctata* submetidos à FISH com sonda de sequência telomérica (3). Barra = 10 μ m.

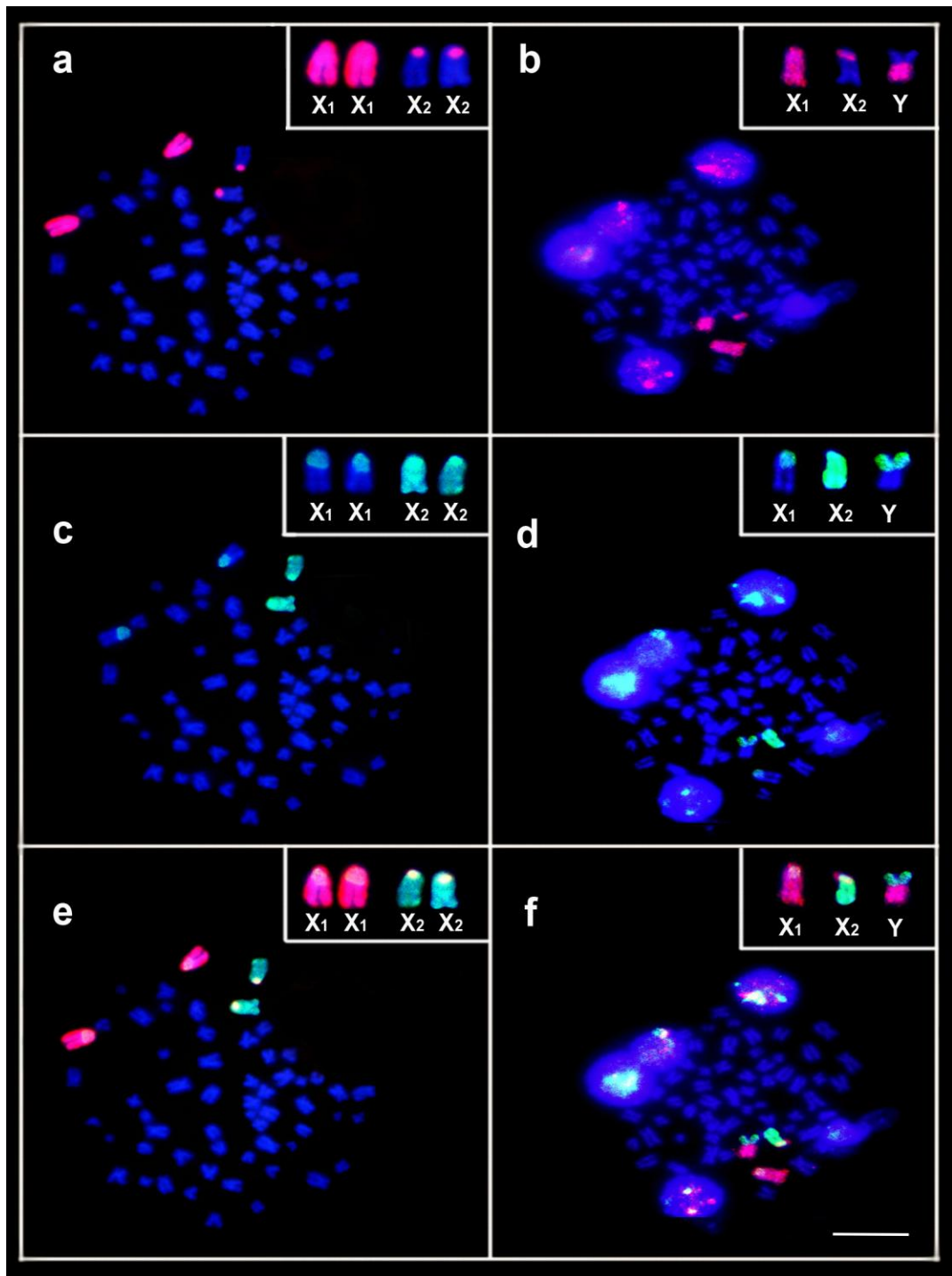


Figura 3. Pintura cromossômica total com sondas dos cromossomos X₁ (sinal vermelho) e X₂ (sinal verde) em metáfase de fêmea (a, c, e) e macho (b, d, f) de *H. punctata*. Barra=10 µm.

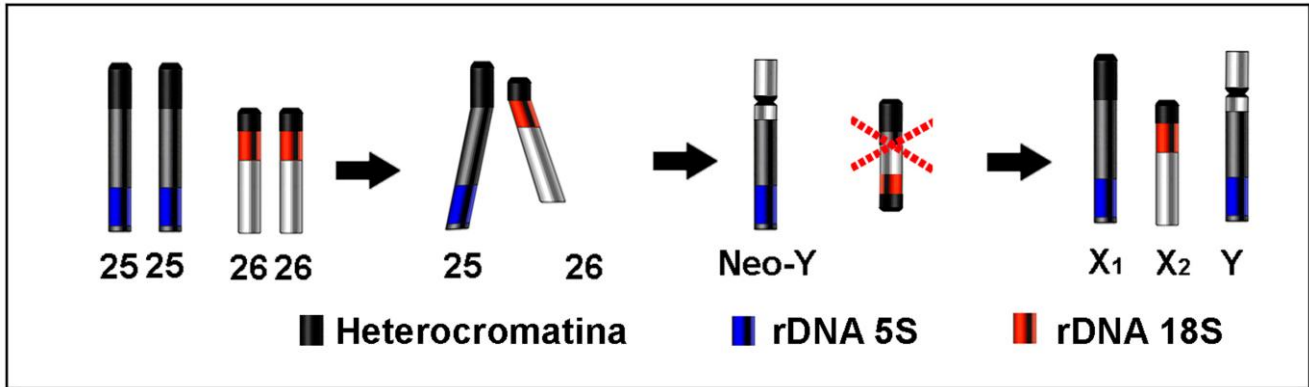


Figura 4. Esquema da provável origem do sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de *Harttia punctata*.

Capítulo IV

**Diversidade cariotípica e tendências evolutivas no gênero *Harttia*
(Siluriformes, Loricariidae).**

Palavras Chaves: Peixe, evolução cromossômica, FISH, DNA repetitivo, DNA ribossomal

Artigo em preparação

Resumo

A maioria das espécies do gênero *Harttia* habita as cabeceiras de pequenos afluentes, porém algumas espécies ficam restritas à calha principal de alguns rios. Este motivo, aliado a uma limitada capacidade de dispersão, faz com que haja a formação de pequenos isolados populacionais, com reduzido fluxo gênico. No gênero *Harttia*, as espécies são bem definidas taxonomicamente. Existem aproximadamente vinte e três espécies reconhecidas, sendo que dezessete destas são encontradas em território brasileiro, distribuídas em diversas bacias hidrográficas. Apesar desta grande diversidade, poucos dados cromossômicos são encontrados na literatura para as espécies pertencentes a esse gênero. Desta forma, este trabalho caracterizou, por meio de metodologias cromossômicas clássicas e moleculares, a diversidade cromossômica encontrada neste gênero com objetivo de discutir os processos relacionados à evolução e diferenciação de espécies no grupo. Para isto, sete espécies de *Harttia* foram analisadas: *H. kronei*, *H. longipinna*, *H. gracilis*, *H. punctata*, *H. loricariformis*, *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*. A diversidade cromossômica encontrada nas espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho estende-se desde a detecção de diferentes números diploides e números fundamentais entre as espécies aqui analisadas, distinta distribuição de diversas sequências repetitivas até a presença de cromossomos supranumerários em *H. longipinna* e sistemas de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/ XY_1Y_2 em *H. carvalhoi* e $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em *H. punctata*. Por fim, os dados obtidos ressaltam o gênero *Harttia* como excelente modelo para estudos de ordem evolutiva.

Introdução

Steindachner (1876) descreveu o gênero *Harttia* com base na forma do corpo alongado, nadadeira adiposa e quilha lateral do tronco ausentes, nadadeira caudal emarginada e grandes placas ósseas circundando a papila anal, para abrigar a espécie *Harttia loricariformis* (Oyakawa, 1993). As espécies do gênero *Harttia* habitam trechos específicos de rios e riachos, apresentam limitada capacidade de dispersão, que por consequência de uma distribuição geográfica distinta, formam pequenos isolados populacionais, propiciada por eventos de vicariância. Buckup (1999) afirma que a identificação de áreas de endemismo associadas aos eventos de vicariância é um campo promissor para estudos de ordem genética e evolutiva, enfatizando a necessidade de se ampliar os conhecimentos sobre a peculiar ictiofauna dessas áreas como, por exemplo, a cabeceiras de rios e riachos.

Existem vinte e três espécies conhecidas do gênero *Harttia*. Destas, dezessete são encontradas em território brasileiro, distribuídas em diversas bacias brasileiras: *H. carvalhoi* (Miranda Ribeiro, 1939); *H. depressa* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. dissidens* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. duriventris* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. garavelhoi* (Oyakawa, 1993); *H. gracilis* (Oyakawa, 1993); *H. kronei* (Miranda Ribeiro, 1908); *H. leiopleura* (Oyakawa, 1993); *H. longipinna* (Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001); *H. loricariformis* (Steindachner, 1877); *H. novalimensis* (Oyakawa, 1993); *H. punctata* (Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001); *H. rhombocephala* (Miranda Ribeiro, 1939); *H. torrenticola* (Oyakawa, 1993); *H. trombetensis* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. uatumensis* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001) e *Harttia* sp. n. sendo onze delas descritas para rios da região Sudeste, cinco para região Norte e uma para região Centro-Oeste. Das 23 espécies de *Harttia*, somente 5 espécies apresentam dados citogenéticos: *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2012a), *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004b), *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a), *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010) e *H. longipinna* (Blanco *et al.*, 2012b).

A macroestrutura cariotípica das espécies analisadas é muito diversificada. O número diploide varia de 52 cromossomos, encontrados em fêmeas de *Harttia carvalhoi* proveniente do ribeirão Grande na bacia do rio Paraíba da Sul (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a) a 62 cromossomos em *Harttia* sp.n, proveniente da bacia do rio Passa-Cinco (Rodrigues, 2010). Os dados de filogenia molecular propõem a espécie *H. kronei* como basal para o gênero (Costa-Silva, 2009). Ancorada a esta análise molecular, os dados citogenéticos apontam para o $2n=58$ cromossomos como possível caráter plesiomórfico putativo para o gênero, uma vez que diferentes populações de *H. kronei* apresentam este número diploide e, existem evidências consistentes de fusões cromossômicas para espécies com $2n$ menor, a exemplo de *H. carvalhoi* e *H. torrenticola* (Blanco *et al.*, 2012a).

As análises citogenéticas ainda demonstraram a ocorrência de sistemas sexuais múltiplos em *Harttia* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a; Blanco *et al.*, em preparação). Centofante *et al.* (2006) e Blanco *et al.* (2012a) caracterizaram populações de *Harttia carvalhoi* do ribeirão Grande na bacia do rio Paraíba do Sul (SP), encontrando número diploide de 52 cromossomos para as fêmeas e 53 cromossomos para os machos, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 . Por sua vez, a espécie *H. punctata* apresentou $2n=57/58$ referente a um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Blanco *et al.*, em preparação). Ainda, Blanco *et al.* (2012b) caracterizaram uma população de *Harttia longipinna*, do rio São Francisco (MG), com $2n=58$ cromossomos e portadora de variação inter intraindividual de até dois cromossomos B. Considerando este contexto, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização da diversidade cariotípica em espécies do gênero *Harttia*, buscando associar os rearranjos cromossômicos aos mecanismos evolutivos e melhor compreender à origem de tal diversidade cromossômica no gênero.

Materiais e Métodos

Exemplares de sete espécies do gênero *Harttia* foram coletados em diferentes bacias hidrográficas brasileiras: *H. kronei* (rio Açungui, bacia do rio Ribeira, município de Campo Largo, estado do Paraná, GPS: 25°22'44"S; 49°39'08"W), *H. longipinna* (calha principal do rio São Francisco, município de Pirapora, estado de Minas Gerais, GPS: 17°21'22,8"S; 44°56'59,5"W), *H. gracilis* (córrego Machadinho, afluente do rio Sapucaí, bacia do rio Sapucaí-Mirin, município de Santo Antônio do Pinhal, estado de São Paulo, GPS: 22°48'31"S; 45°41'21"W), *H. punctata* (rio Itiquira, bacia do Tocantins, município de Formosa, estado de Goiás, GPS: 15°19'25"S; 47°25'26"W), *H. lorincariformis* (rio Paraitinga, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Cunha, estado de São Paulo, GPS: 22°52'22"S; 44°51'0,2"W), *H. torrenticola* (ribeirão das Araras, bacia do rio São Francisco, município de Piumhi, estado de Minas Gerais, GPS: 20°16'15"S; 45°55'39"W) e *H. carvalhoi* (ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Pindamonhangaba, estado de São Paulo, GPS: 22°47'8"S; 45°27'19"W). Todos os espécimes de *Harttia* foram identificados pelo Dr. Osvaldo T. Oyakawa e depositados na coleção do Museu de Zoologia da USP, sob os vouchers MZUSP 109783, MZUSP 106767, MZUSP 111384, MZUSP 111385, MZUSP 111386, MZUSP 109784, MZUSP 109782, respectivamente.

Os animais foram anestesiados com óleo de cravo de acordo com a metodologia descrita por Griffiths (2000). Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, por meio das técnicas descritas por Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993). Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a) (Levan *et al.*, 1964). O bandamento-C seguiu o protocolo descrito por Sumner (1972) com modificações na etapa de coloração (Lui *et al.*, 2012). As regiões organizadoras de nucléolo foram identificadas por impregnação com nitrato de prata segundo método descrito por Howell & Black (1980). As técnicas de

Bandamento C e Ag-NOR foram realizadas utilizando-se das mesmas metáfases anteriormente coradas com Giemsa (análise sequencial).

Três sondas foram utilizadas para hibridização *in situ* fluorescente: uma sonda de DNA ribossomal 18S obtida do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004); uma sonda de rDNA 5S isolada do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti, 1999); e uma sonda da sequência telomérica geral de vertebrados [TTAGGG]_n (Ijdo *et al.*, 1991). A sonda de rDNA 18S foi marcada por *nick translation* com biotina-16-dUTP (Biotin Nick Translation mix – Roche) e a sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Dig Nick Translation mix – Roche). A sonda de sequência [TTAGGG]_n foi marcada por PCR, utilizando digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science).

Todos os processos de hibridização seguiram o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), sob alta estringência – 77% (200 ng 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 consistindo de duas lavagens de 5 minutos. A detecção do sinal foi realizada utilizando streptavidin-alexa fluor 488 (Molecular Probes) para a sonda de rDNA 18S; e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) para as sondas de rDNA 5S e sequência telomérica [TTAGGG]_n. Os cromossomos foram analisados em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) acoplado de um sistema de captura de imagem (Olympus DP72). Para determinar o número diploide, fórmula cariotípica e presença ou ausência de ITS, aproximadamente 30 metáfases foram analisadas. Foi considerado como sinal de hibridização verdadeiro, tanto para os DNAs ribossomais quanto para os ITS (Interstitial Telomeric Sites), os sítios que apresentaram 100 % de repetibilidade.

Resultados

Harttia kronei

Os dezoito exemplares (onze machos e sete fêmeas) de *H. kronei* analisados apresentaram 58 cromossomos (16m+16sm+16st+10a), com número fundamental (NF) igual a 106, sem a presença de um sistema de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 1, Tab. 1). O bandamento C evidenciou uma pequena quantidade de heterocromatina, preferencialmente alocada na posição pericentromérica de poucos cromossomos do complemento (Fig. 2). Destaca-se claramente uma banda evidente na posição intersticial do braço curto do segundo par metacêntrico, coincidente com a NOR (Fig. 1) e região onde foi localizada por FISH a sonda de DNA ribossômico 18S (Fig. 3). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S evidenciou um único sítio desse marcador, presente na posição pericentromérica do braço longo do primeiro par cromossômico submetacêntrico (Fig. 3). Nenhum ITS (Interstitial Telomeric Sites) foi detectado no cariótipo com o emprego das sondas teloméricas (Fig. 4).

Harttia longipinna

Os cinquenta exemplares (30 machos e 20 fêmeas) de *H. longipinna* analisados apresentaram $2n=58$ cromossomos (16m+12sm+16st+14a), com número fundamental (NF) igual a 102, tanto em machos quanto em fêmeas, sem a presença de um sistema de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 1, Tab. 1). Em vinte e três indivíduos (16 machos e sete fêmeas) foi detectada uma variação de até dois cromossomos B. Uma pequena quantidade de heterocromatina foi localizada em posição pericentromérica e terminal de alguns cromossomos do complemento A, com destaque para o par 23 que apresenta dois proeminentes blocos C+, sendo um proximal e um intersticial no braço longo (Fig. 2). A coloração com nitrato de prata evidenciou NORs simples alocadas na região proximal no braço longo do par 23, coincidente com o bloco de heterocromatina (Fig. 1). A localização da sonda de

rDNA 18S por FISH (Fig. 3). confirmou os resultados quanto ao número e localização de NORs, previamente evidenciados pela coloração com o nitrato de prata. A hibridação com sonda de rDNA 5S evidenciou um único par desse marcador, presente na posição pericentromérica do braço curto de um par submetacêntrico 11 (Fig. 3). A FISH com sonda telomérica não evidenciou ITS no cariótipo (Fig. 4).

Harttia gracilis

Os vinte e três exemplares de *H. gracilis* (oito machos e 15 fêmeas) analisados apresentaram número diploide igual a 58 cromossomos (20m+22sm+8st+8a), com número fundamental (NF) igual a 108, tanto em machos quanto em fêmeas, sem a presença de um sistema de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 1, Tab. 1). A heterocromatina apresentou coloração pálida e mostrou-se alocada na região pericentromérica de alguns poucos pares cromossômicos, com destaque para os pares 2 e 26 (Fig. 2). A coloração com nitrato de prata evidenciou uma única NOR ativa na região proximal do braço longo do maior par acrocêntrico, coincidente com o bloco banda C+ (par 26) (Fig. 1), confirmada posteriormente através de FISH com sonda de rDNA 18S (Fig. 3). A hibridização *in situ* com sonda de DNA ribossomal 5S revelou a presença de um único sítio alocado na posição pericentromérica do par cromossômico metacêntrico nº 2 (Fig. 3). Nenhum ITS foi detectado no cariótipo com o emprego das sondas teloméricas (Fig. 4).

Harttia punctata

Os trinta e quatro exemplares de *H. punctata* (18 machos e 14 fêmeas) analisados apresentaram número diploide igual a 58 cromossomos (16m+20sm+12st+10a) para as fêmeas e 57 (16m+21sm+12st+8a) para os machos, ambos com número fundamental (NF) igual a 106 (Fig. 1, Tab. 1). Desta forma, é notável uma heterogametia masculina representada por um cromossomo

submetacêntrico grande (Y) presente exclusivamente no cariótipo dos machos, além de dois cromossomos acrocêntricos sem seus homólogos (X_1 e X_2), correspondentes aos pares 25 e 26 nas fêmeas (Fig. 1). A heterocromatina apresentou-se preferencialmente alocada, em ambos os sexos, na região pericentromérica de alguns cromossomos do complemento (Fig. 2). É pertinente ressaltar três grandes blocos heterocromáticos alocados nos dois maiores pares acrocêntricos em ambos os sexos, sendo que no par cromossômico 25 (X_1) foi encontrado um bloco proximal e um terminal, e no par 26 (X_2) foi evidenciado um grande bloco na porção intersticial. Na porção terminal do braço longo do cromossomo submetacêntrico exclusivo dos machos foi verificado um bloco heterocromático proeminente. A coloração com nitrato de prata evidenciou NORs simples alocadas na porção intersticial do par acrocêntrico 26, cromossomo este que somente um dos homólogos se encontra presente no cariótipo dos machos (Fig. 1).

A hibridização com sonda de rDNA 18S evidenciou a região intersticial do par acrocêntrico 26 (X_2) marcada (Fig. 3). A FISH com sonda de rDNA 5S localizou estes sítios na região terminal do par acrocêntrico 25 (X_1) e na região terminal do braço longo do cromossomo submetacêntrico (Y) exclusivo dos machos (Fig. 3). Tanto nos machos quanto nas fêmeas, os sítios de rDNA 5S e rDNA 18S encontram-se coincidentes com os blocos heterocromáticos. Nenhum ITS foi detectado no cariótipo com o emprego da sonda telomérica (Fig. 4).

Harttia loricariformis

Os quatro exemplares de *H. loricariformis* (dois machos e duas fêmeas) apresentaram número diploide igual a 56 cromossomos (16m+22sm+10st+8a), com número fundamental (NF) igual a 104, tanto em machos quanto em fêmeas, e sem a presença de um sistema de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 1). Uma pequena quantidade de heterocromatina foi evidenciada (Fig. 2), estando

esta alocada preferencialmente na região centrométrica e pericentromérica de alguns pares cromossômicos, com destaque para o maior par acrocêntrico (par 25). A impregnação com nitrato de prata evidenciou um único par portador de NORs ativas no braço curto do par 25 (Fig. 1), coincidente com heterocromatina e a localização da sonda de rDNA 18S (Fig. 3). Com relação ao cístron de rDNA 5S, este apresentou-se alocado na porção terminal do braço longo do par 25 em sintenia ao sítio ribossomal 18S (Fig. 3). A FISH com sonda de sequência $[\text{TTAGGG}]_n$ marcou todos os telômeros, sendo que um ITS foi verificado em um par de cromossomos subtelocêntrico grande (Fig. 4).

Harttia torrenticola

Os treze exemplares (cinco machos e oito fêmeas) de *H. torrenticola* analisados apresentaram 56 cromossomos (16m+10sm+16st+14a), com número fundamental (NF) igual a 98, tanto em machos quanto em fêmeas, sem a presença de um sistema de cromossomos sexuais (Fig. 1, Tab. 1). O bandamento C evidenciou pouca heterocromatina, alocada principalmente na região centromérica e terminal de alguns pares cromossômicos, com exceção de um bloco grande na região proximal e um menor na posição terminal, ambos no par 22 e de um evidente bloco na região pericentromérica do par cromossômico 1 (Fig. 2). A coloração com nitrato de prata evidenciou a presença de NORs simples localizadas na posição intersticial do braço longo do maior par acrocêntrico, coincidente com o bloco heterocromático (par 22) (Fig. 1) e com a hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S (Fig. 3). A FISH com sonda de rDNA 5S mostrou uma única marcação na região pericentromérica de um cromossomo submetacêntrico (Fig. 3). A hibridização com sondas de DNA telomérico destacou a ocorrência de ITS evidentes, localizados no braço curto de um par submetacêntrico pequeno e no braço curto do primeiro par metacêntrico do cariótipo (Fig. 4).

Harttia carvalhoi

Nos vinte e quatro exemplares (treze machos e onze fêmeas) de *H. carvalhoi* analisados foi verificado um número diploide igual a 52 cromossomos (16m+16sm+12st+8a) para fêmeas e 53 (15m+16sm+12st+10a) cromossomos para machos, ambos com número fundamental (NF) igual a 96 (Fig. 1, Tab. 1). Essa diferença no número diploide entre machos e fêmeas foi observada pela presença de dois cromossomos acrocêntricos adicionais nos machos, além da ausência de um dos cromossomos metacêntricos do primeiro par, consistente com o sistema de cromossomos sexuais XX/XY₁Y₂. A heterocromatina foi localizada principalmente na região pericentromérica e terminal dos cromossomos (Fig. 2). Os pares cromossômicos 1 e 9 apresentam conspícuas bandas pericentroméricas. No par 23 foram detectadas três blocos heterocromáticos, um na região centromérica, um pequeno ocupando a região intersticial no braço longo, adjacente à constrição secundária e um na região terminal do referido braço (Fig. 2). A coloração com nitrato de prata e a FISH com sonda de rDNA 18S evidenciaram NORs simples, coincidentes com a constrição secundária e intercalar com o bloco heterocromático (Figs. 2 e 3).

A FISH com sonda de rDNA 5S evidenciou dois pares cromossômicos portadores desses cístrons, sendo o sítio maior localizado na região intersticial no braço longo do par 23, logo abaixo do sítios 18S (marcação sintênica) e um sítio menor localizado no braço curto do par metacêntrico 3 (Fig. 3). FISH com sonda telomérica evidenciou um ITS no primeiro par submetacêntrico, além de um segundo sítio situado no braço curto do maior metacêntrico (cromossomo X) do cariótipo (Fig. 4).

Discussão

As espécies de *Harttia* analisadas até o presente momento apresentam diferenças consideráveis na fórmula cariotípica, número fundamental e, principalmente, no número diploide (Tab. 1), variando de 52 cromossomos, encontrados em fêmeas de *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*,

2012a; presente trabalho), a 62 cromossomos presentes em *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010). Nesta variação numérica destaca-se a presença de cromossomos Bs em *H. longipinna* (Blanco *et al.*, 2012b) e de dois sistemas de cromossomos sexuais: XX/XY₁Y₂ presente em *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a; presente trabalho) e X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y em *H. punctata*. Segundo Artoni & Bertollo (2001), fusões e fissões cêntricas são os principais eventos responsáveis pela diferenciação cariotípica em Loricariidae. Adicionalmente, Bueno *et al.* (2012) ressaltam a importância das translocações e inversões na diversificação cromossômica deste grupo. Desta forma, fica evidente que a variação interespecífica encontrada nas espécies de *Harttia* aqui analisadas, representada pelas diferenças no número diploide, pela variação na fórmula cariotípica número fundamental, ausência/presença de cromossomos sexuais, ausência e ocorrência de cromossomos B é decorrente de extensivos rearranjos cromossômicos na diferenciação cariotípica do gênero.

Na família Loricariidae, 2n=54 é considerado um caráter basal (Artoni & Bertollo, 2001; Ziemniczak *et al.*, 2012). Caracteres moleculares mitocondriais e nucleares, utilizados em análises filogenéticas no gênero *Harttia*, demonstraram que *H. kronei*, ocupa uma posição basal entre as espécies de *Harttia* descritas para a região Sul e Sudeste do Brasil (Costa-Silva, 2009). Análises cromossômicas evidenciaram que *H. kronei* apresenta número diploide de 58 cromossomos, com NF=106. Desta forma, é provável que o número diploide basal para o gênero *Harttia* seja igual a 58 cromossomos. Nesta hipótese, é possível que a partir de um cariótipo hipotético de um loricariinae com 2n=54 cromossomos, eventos de fissões resultariam na formação de um cariótipo basal para *Harttia* contendo 58 cromossomos. A partir deste, eventos de fusão e fissão levariam a diminuição e aumento, respectivamente, do número cromossômico das espécies de *Harttia*, resultando na grande diversidade cromossômica existente. Entretanto, uma segunda hipótese contendo o número diploide basal com 54 cromossomos não pode ser descartada, sendo que desta forma haveria dois ramos distintos: um grupo contendo *Harttia* sp. n., *H. kronei*, *H. longipinna*, *H. punctata*, *H. gracilis*, *H.*

loricariformis, *H. torrenticola* (originados por fissões cromossômicas) e outro com $2n=52/53$ cromossomos (*H. carvalhoi*) originado por fusão. A primeira hipótese é reforçada pela presença de ITS somente em espécies com menor número diploide (*H. carvalhoi*, *H. torrenticola* e *H. loricariformis*) (Fig. 3). Com relação à *Harttia* sp. n (Rodrigues, 2010), eventos de fissão provavelmente conduziram ao aumento do número diploide de 58 para 62 cromossomos.

Entre os Loricariidae, a subfamília Loricariinae é a que apresenta a maior variação no número diploide ($2n=36 - 74$ cromossomos), evidenciando que tanto eventos de fusão cêntrica para a redução numérica, quanto de fissão cêntrica para o aumento do número diploide devem ter ocorrido na diversificação cariotípica do grupo a partir do $2n=54$ cromossomos basal de Loricariidae (Zienniczak *et al.*, 2012). No gênero *Rineloricaria*, a variação do $2n$ é de $36 - 70$ cromossomos, onde inúmeros rearranjos de fusão/fissão e inversões têm propiciado a diferenciação e especiação cariotípica, com manutenção de polimorfismos numéricos estáveis para algumas espécies (Rosa *et al.*, 2012).

O número diploide igual a 58 cromossomos encontrado em *H. kronei* é compartilhado por mais três espécies: *H. longipinna*, *H. gracilis* e *H. punctata*. Essas espécies apresentam distintas fórmulas cariotípicas que resultam em diferentes NFs (Tab.1), ressaltando que inversões pericêntricas e translocações também foram importantes para a diversificação dessas espécies. Em *H. punctata*, foi evidenciado um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, no qual uma inversão pericêntrica, com posterior translocação parcial foi provavelmente o evento que originou esse sistema (Blanco *et al.*, em preparação). Considerando o número diploide basal putativo igual a 58 cromossomos, em *H. loricariformis*, *H. torrenticola* e *H. carvalhoi* as fusões cêntricas foram os rearranjos responsáveis pela redução do $2n$, sendo que as diferenças entre os NFs são decorrentes de inversões pericêntricas (Tab. 1). Assim, é evidente que a diversificação cromossômica nessas espécies é atribuída às fissões e inversões pericêntricas. Com relação à *Harttia* sp. n (Rodrigues, 2010), eventos

de fissão provavelmente levaram a um aumento no número diploide de 58 para 62 cromossomos, sendo que inversões pericêntricas atuaram no aumento do NF (Tab. 1).

O sistema de cromossomos sexuais múltiplos XX/XY_1Y_2 em *H. carvalhoi* foi originado através de uma fissão cêntrica do primeiro par metacêntrico (Blanco *et al.*, 2012a), cromossomo este presente somente no cariótipo de *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*. Segundo Costa-Silva (2009), estas duas espécies formam um clado monofilético. Assim, esse metacêntrico deve ter se originado por uma fusão, evidenciada pelo ITS, antes da diversificação desse grupo. É pertinente ressaltar que os dados citogenéticos aqui apresentados, juntamente com os dados moleculares (Costa-Silva, 2009), revelam que esta condição seja derivada dentro do gênero *Harttia*. Em contrapartida, o sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ presente em *H. punctata* deve ter se originado possivelmente por uma translocação entre um fragmento do cromossomo X_1 com um fragmento do X_2 , originando o Neo-Y. Desta forma, fica evidente que apesar desses sistemas apresentarem origens independentes, rearranjos do tipo fissão/fusão e translocação/inversão foram igualmente importantes e atuantes na diferenciação cariotípica dessas duas espécies de *Harttia*, portadoras de distintos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos.

A presença de pouca heterocromatina parece ser uma característica intrínseca das espécies de *Harttia* (Fig. 2). Regiões heterocromáticas são reconhecidas como “*hot spots*” para rearranjos cromossômicos (Wichman *et al.*, 1991). Entre as espécies de *Harttia* analisadas, foram observados blocos heterocromáticos encontrados preferencialmente na região pericentromérica e terminal de alguns cromossomos. Possivelmente, a presença de DNAs repetitivos nas regiões heterocromáticas nos cromossomos de *Harttia* tem atuado na diversificação dos genomas, contribuindo para a ocorrência dos rearranjos e sua fixação em populações isoladas em cabeceiras ou em trechos específicos de rios, a exemplo do que ocorre em outras espécies de peixes neotropicais. Os dados cromossômicos referentes à citogenética clássica (Giemsa, bandamento C e Ag-NOR) e molecular (FISH com sondas de rDNA

5S e 18S) obtidos no presente trabalho tanto para *H. carvalhoi* quanto para *H. loricariformis* corroboram com os já descritos por Centofante *et al.* (2006) e Kavalco *et al.* (2004a; 2005), respectivamente.

Um único par de cromossomos portadores das NORs é considerada uma característica basal entre os Loricariidae (Artoni & Bertollo, 2001; Alves *et al.*, 2005; Kavalco *et al.*, 2005). A coloração com nitrato de prata e a localização dos sítios de rDNA 18S por hibridização *in situ* fluorescente evidenciaram NORs simples em quase todas as espécies de *Harttia* (Fig. 1, Fig. 3). Esta situação demonstra ser uma característica possivelmente primitiva dentro do gênero. Apesar da manutenção no número de sítios de 18S, há variação na posição e no tipo de cromossomo portador destes cístrons entre as espécies. *Harttia longipinna*, *H. gracilis*, *H. punctata*, *H. torrenticola* e *H. carvalhoi* apresentam o rDNA 18S em região proximal sempre no primeiro par acrocêntrico do cariótipo, característica que pode ser considerada conservada para esse grupo de espécies. Exceções desta posição podem ser observadas em três espécies: em *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2012a) e *Harttia* sp. n (Rodrigues, 2010), onde as NORs foram observadas no braço curto de cromossomos metacêntricos; e, em *H. loricariformis* em que estas foram observadas no braço longo do primeiro par acrocêntrico. Tais variações possivelmente são decorrentes de inversões pericêntricas.

O mapeamento físico dos sítios de rDNA 5S revelaram que este apresenta-se muito variável em posição e conservado em número, estando presente em diferentes cromossomos, nas distintas espécies analisadas (Fig. 3). Entretanto, algumas similaridades podem ser observadas. *H. carvalhoi*, *H. torrenticola* e *H. gracilis* apresentaram o cístron de rDNA 5S alocados em cromossomos metacêntricos correspondentes. Essa similaridade está em congruência com os resultados obtidos por Costa-Silva (2009), pois os mesmos autores, utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, mostraram que *H. gracilis* enraíza um clado no qual o grupo monofilético compreendido por *H. carvalhoi* e *H. torrenticola* está inserido. Entretanto, em *H. carvalhoi* é encontrado outro cromossomo

portador desse sítio (maior par acrocêntrico), sendo que esta é a única espécie a apresentar sítios múltiplos de rDNA 5S (Fig. 3). Desta forma, é possível inferir que a presença de somente um sítio da menor subunidade ribossomal é uma característica basal em *Harttia*.

Apesar de todas as diferenças anteriormente citadas, algumas homeologias são claramente observadas, dentre as quais o cromossomo portador das NORs (primeiro par acrocêntrico) é a mais pertinente (Figs. 1 e 3). É notável uma conspícua variação com relação ao tamanho desse cromossomo quando comparado aos outros dos respectivos cariótipos, além da presença diferencial de blocos heterocromáticos (Fig. 2). Este cromossomo encontra-se presente na maioria das espécies analisadas, excetuando-se *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010) e *H. kronei*, nas quais as NORs estão alocadas em cromossomos metacêntricos. Outra característica pertinente é a condição sintênica entre os genes ribossomais 5S e 18S encontrada neste primeiro par acrocêntrico em *H. carvalhoi* e *H. loricariformis*. A condição sintênica desses sítios de rDNA pode ser considerada como provável condição primitiva em Loricariidae (Ziemniczak *et al.*, 2012), desta forma é possível que esta condição em *Harttia* represente efetivamente um caráter basal ou simplesmente seja um subproduto dos rearranjos que levaram a diversificação desse cromossomo.

Essa grande diversidade cromossômica do gênero *Harttia* é acompanhada por uma evidente definição dos caracteres morfológicos, onde as espécies são bem definidas, diferentemente de outras espécies como, por exemplo, *Astyanax sabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991), *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000) e *Synbranchus marmoratus* (Foresti *et al.*, 1992), nas quais os caracteres morfológicos não acompanham as mudanças cromossômicas. Por fim, essa variação na macroestrutura cromossômica, seja ela representada por variações no número diploide, fórmula cariotípica, ou número e posições dos genes ribossomais 5S e 18S, são fortes evidências de uma diversificação cariotípica aliada a uma evidente diferenciação morfológica/biogeográfica.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa pela identificação dos exemplares, aos técnicos de coleta Pedro Luis Gallo e Luis Henrique da Silva. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

Referências

- 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.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the Kariotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134:201-210.
- 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.
- Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S.; Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research** 8, 603–613. doi: 10.1023/A:1009233907558.

- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; Almeida, M.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (em preparação a). Origem do sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de *Harttia punctata* (siluriformes, loricariidae): pintura cromossômica e genes ribossomais 5s e 18s.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Traldi, J.B.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2012a). The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/X_1Y_2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** On line.
- Blanco, DR.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Traldi, J.B.; Moreira-Filho, O. (2012b). Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First report of B chromosomes in the genus. **Zoological science**. 29(9): 604-609.
- Buckup, P.A. (1999). **Sistemática e biogeografia de peixes de riachos**. In: Caramaschi, E.P.; Mazzoni, R.; Peres-Neto, P.R. (eds). Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis. Rios de janeiro: PPGEV-UFRJ, 6:91-138.
- 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 an XX/X_1Y_2 sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet. Genome Res.** 112:320-324.
- Costa-Silva GJ: **Análise filogenética entre gêneros da subfamília loricariinae (Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*, baseada em caracteres moleculares**. MSc dissertation (in Portuguese) Botucatu, Brazil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (2009).
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Tien, O.S. (1992). Cytogenetic studies in fishes of the genus *Synbranchus* (Pisces, Siluriformes, Synbranchidae). **Naturalia**. 17:128-138.

- 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.
- 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.
- 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)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res.**19:4780.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2004a). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenetics and Genome Research** 106:107-110.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2004b). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Heredity** 141:237-242.
- 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.
- Langeani, F.; Oyakawa, O.T.; Montoya-Burgos, J.I. (2001). New species of *Harttia* (Loricariidae, Loricariinae) from the Rio São Francisco Basin. **Copéia** 1: 136-142.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.

- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry** Early Online: 1-6.
- Mirada Ribeiro, P. (1908). Peixes do Ribeira, resultado da excursão do Sr. Ricardo Kone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Komos** 5:1-5.
- Miranda Ribeiro, P. (1939). Sobre o gênero *Harttia* Steindachner (Peixes: Loricariidae). Boletim Biológico (nova série) 4:11-13.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Rev. Bras. Genet.** 14: 331-357.
- Oyakawa, O.T. (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner 1876 da região Sudeste do Brasil e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comum. Mus. Ciênc. PUCRS**, série zool., Porto Alegre, 6:3-27.
- Rapp Py-Daniel, L.H.; Oliveira, E.C. (2001). Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyol. Explor. Freshwat** 12(1):79-96.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83:2934-2938.
- Rodrigues, R.M. (2010) **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. 2018p.
- 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.

- Steindachner, F. (1876). Die Süßwasserfische des Südöstlichen Brasilien (III). **Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien.** 74:559-694.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 75:304-306.
- 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): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology.** Doi:10.1080/11250003.2012.676677

Anexos

Tabela1. Dados cromossômicos das espécies de *Harttia* analisadas até o presente momento.

Espécies	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Supranumerário	Sist. Sexual	Ref
<i>H. kronei</i>	58	106	16m + 16sm + 16st + 10a	-	-	1, 5, 8
<i>H. longipinna</i>	58	102	16m + 12sm + 16st + 14a	0 - 2	-	6, 8
<i>H. gracilis</i>	58	108	20m + 22sm + 8st + 8a	-	-	8
<i>H. punctata</i>	58 (F)	106	16m + 20sm + 12st + 10a	-	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ / X ₁ X ₂ Y	7, 8
	57 (M)	106	16m + 21sm + 12st + 8a	-		
<i>H. loricariformis</i>	56	104	16m + 22sm + 10st + 8a	-		2, 8
<i>H. torrenticola</i>	56	98	16m + 10sm + 16st + 14a	-		5, 8
<i>H. carvalhoi</i>	53 (F)	96	16m + 16sm + 12st + 8a	-	XX / XY ₁ Y ₂	3, 5, 8
	52 (M)	96	15m + 16sm + 12st + 10a	-		
<i>Harttia</i> sp. n.	62	114	13m + 23sm + 16st + 10a	-		4

2n=Número diploide; **NF**=Número Fundamental; **Ref**=Referência; **M**=Macho, **F**=Fêmea; **1-** Alves *et al.* (2003); **2-** Kavalco *et al.* (2005); **3-** Centofante *et al.*(2006); **4-** Rodrigues (2010); **5-** Blanco *et al.*, (2012a); **6-** Blanco *et al.* (2012b); **7-** Blanco *et al.* (em preparação); **8-** Presente trabalho.

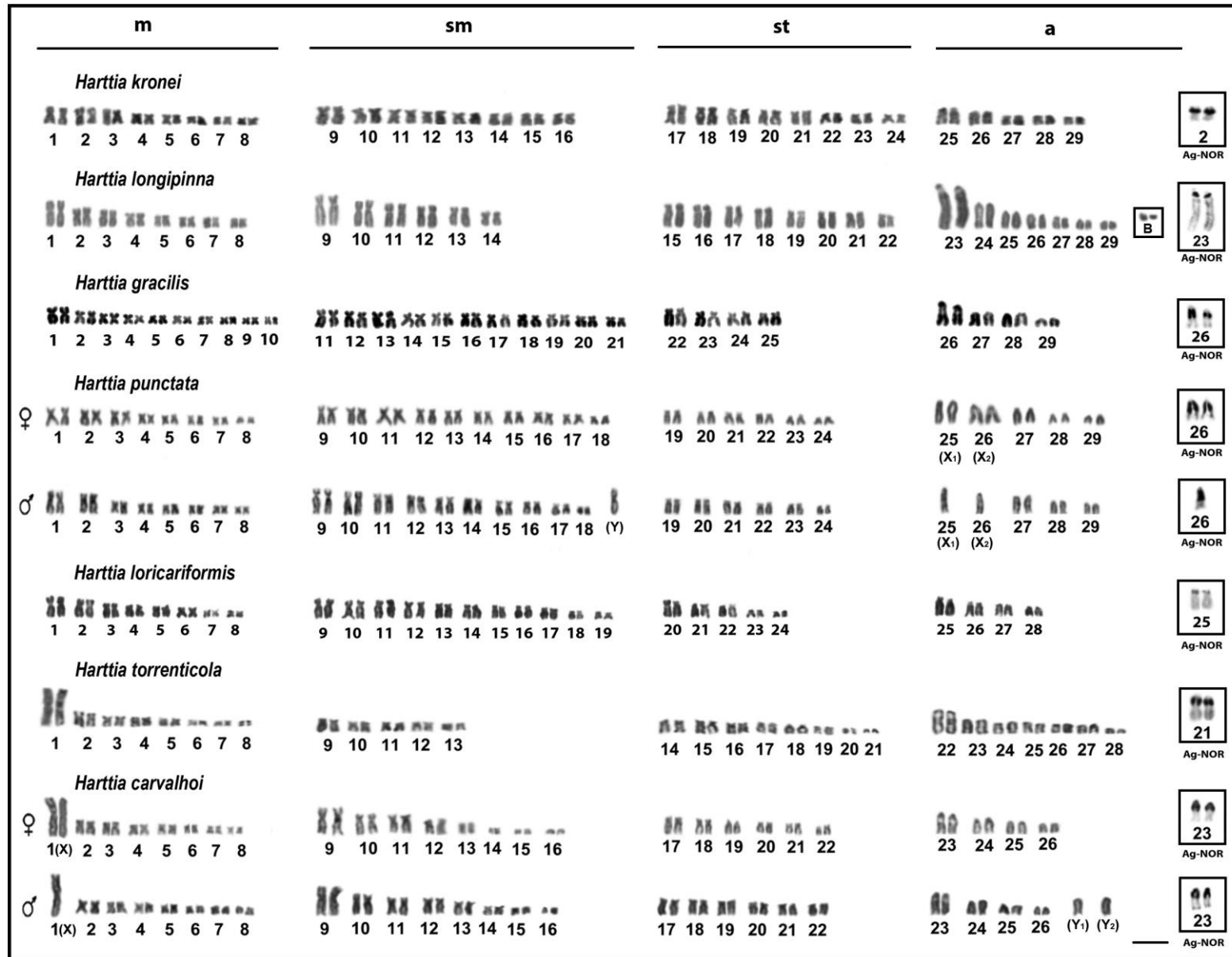


Figura1. Cariótipos das espécies de *Harttia* submetidos à coloração convencional. Ag-NORs em destaque. Barra = 10µm.

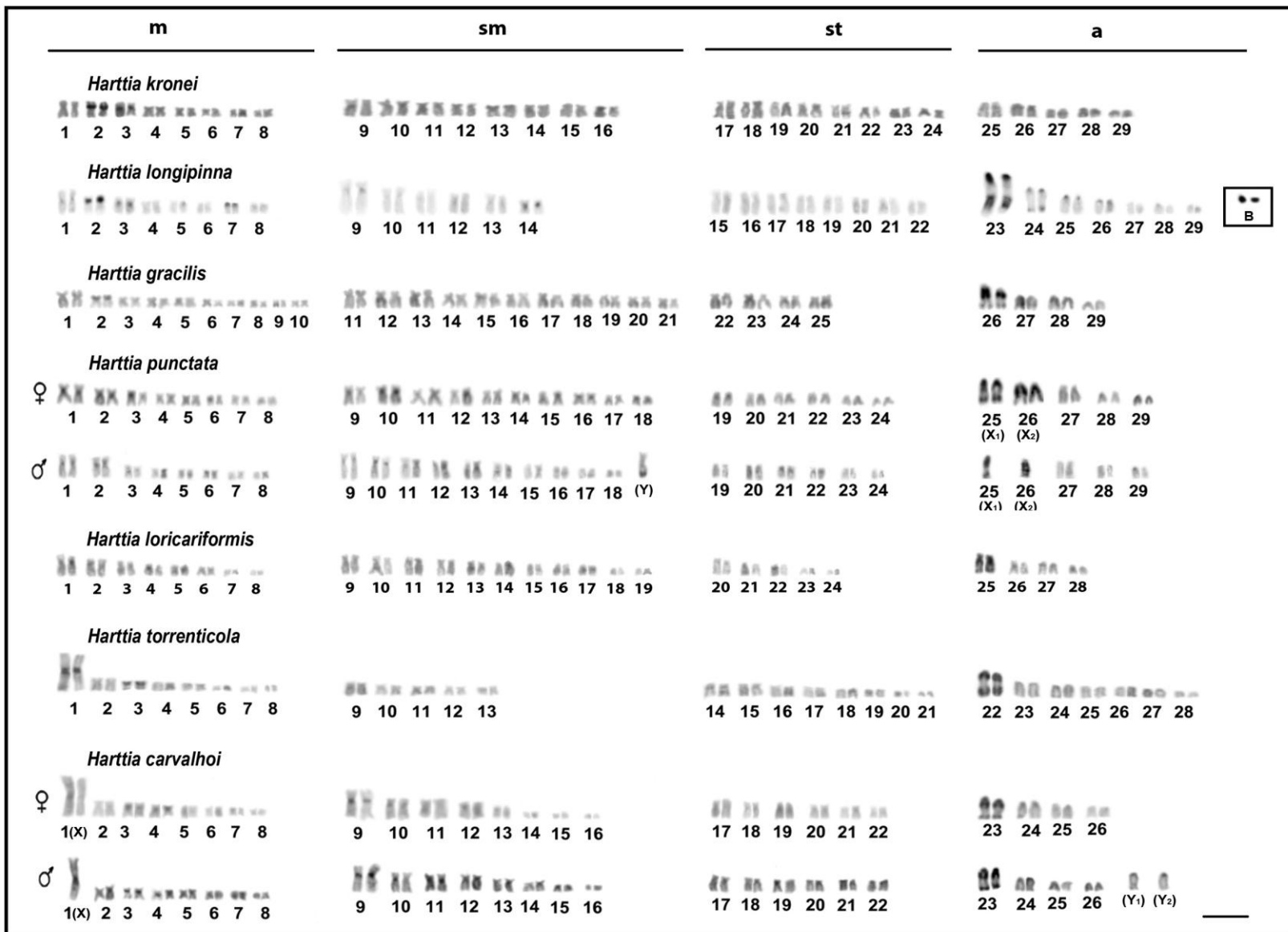


Figura 2. Cariótipos das espécies de *Harttia* submetidos ao bandamento C. Barra = 10µm.

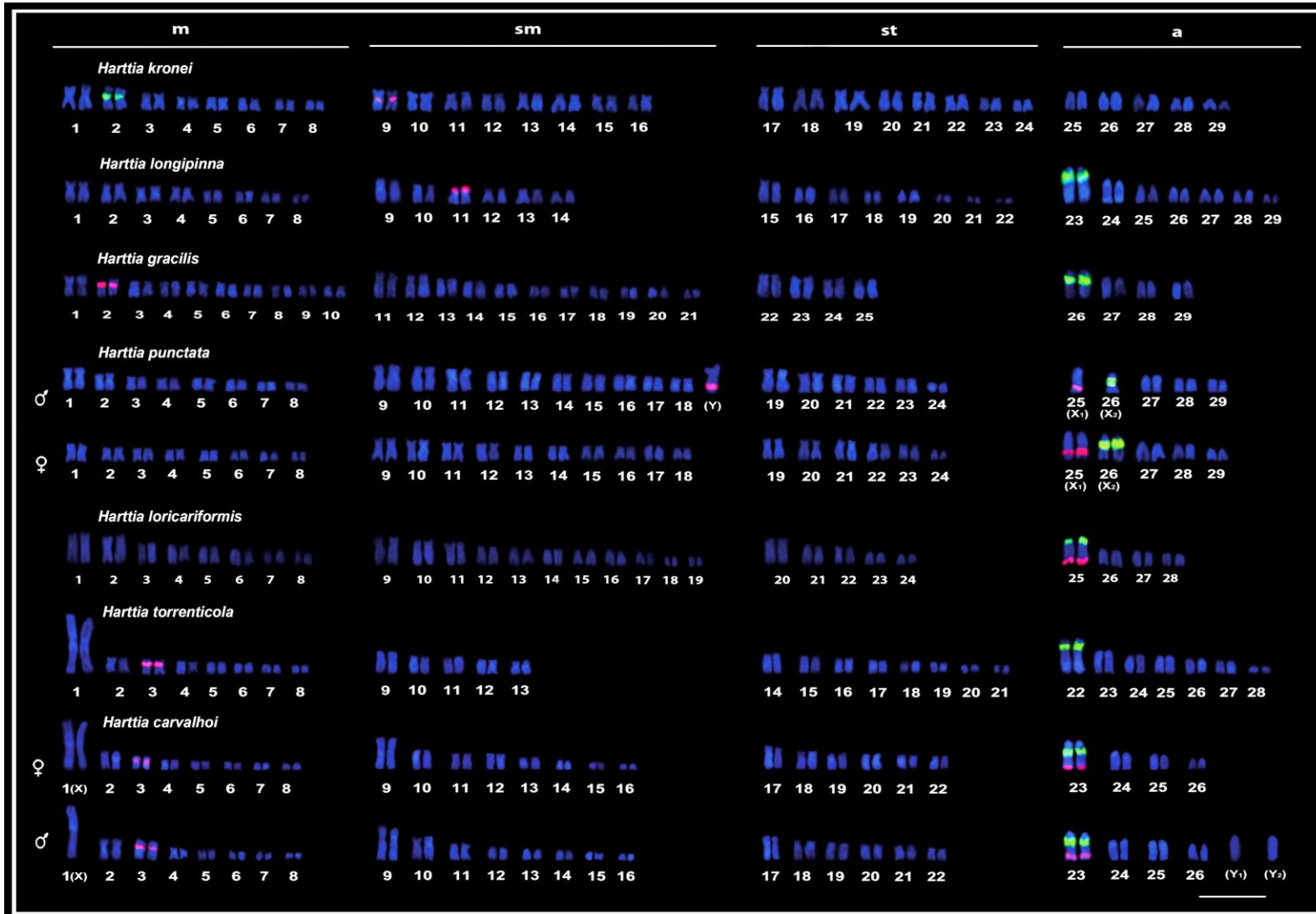
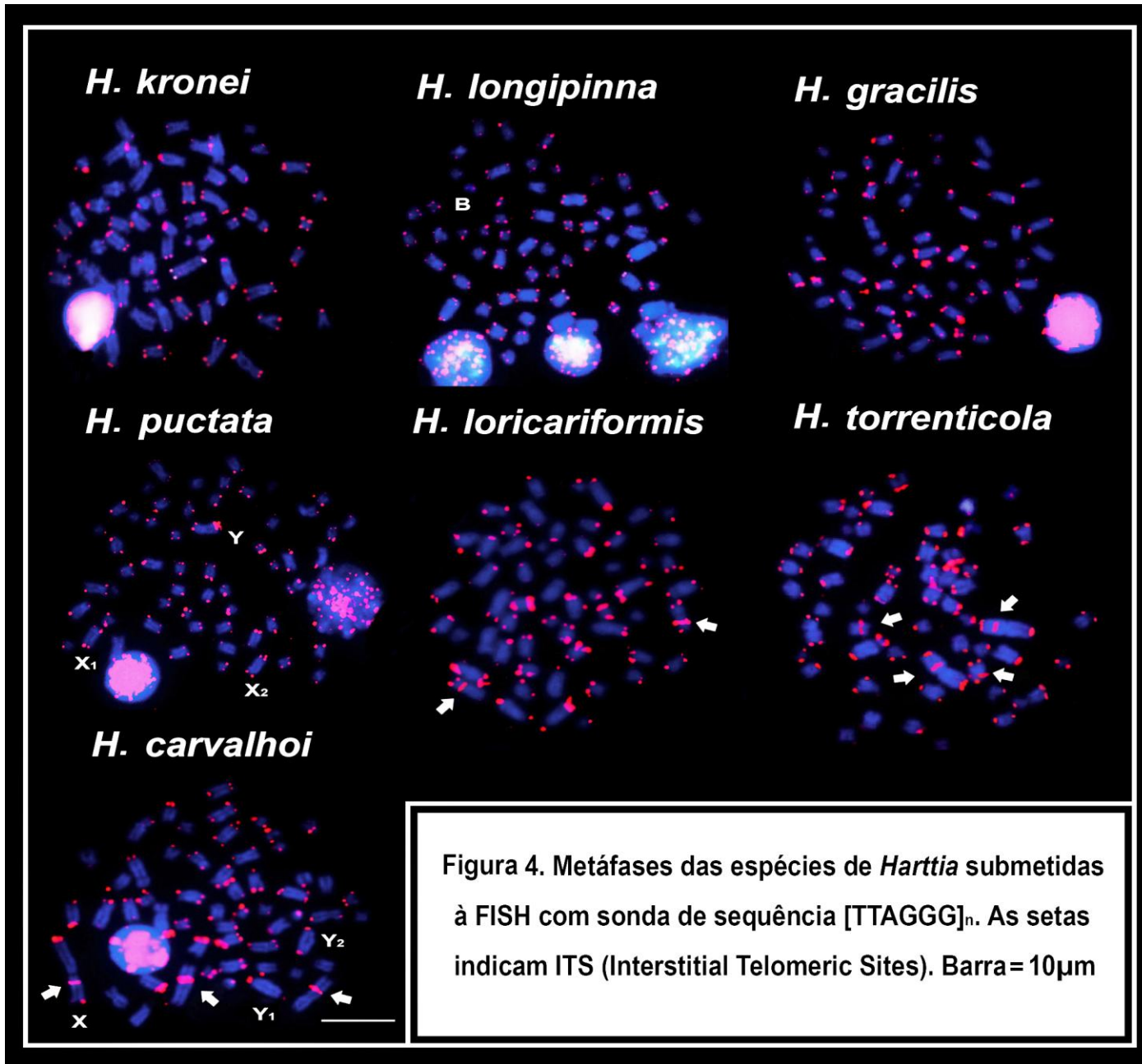


Figura 3. Cariótipos das espécies de *Harttia* submetidas à Double-FISH com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA18S (sinal verde). Barra = 10µm.



Capítulo V

**Extensivo acúmulo de retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em 7 espécies de *Harttia*
(Siluriformes, Loricariidae)**

Palavras Chave: elementos transponíveis; Loricariinae, regulação gênica

Resumo

Os elementos repetitivos são classificados em codificadores em *tandem*, não codificadores em *tandem* e elementos repetitivos dispersos. Dentre os elementos repetitivos dispersos, os elementos transponíveis (TEs) são classificados de acordo com suas características estruturais e mecanismos de transposição em: classe I – possuidores de molécula de RNA como intermediário de transposição; e classe II – moléculas de DNA como intermediários. Os Retroelementos (RTEs) têm sido atualmente analisados em peixes através de métodos de mapeamento cromossômico físico, providenciando um melhor entendimento da estrutura e organização desta classe de DNA repetitivo no genoma deste grupo e, muitas vezes correlacionados a rearranjos cromossômicos. Loricariidae é uma família de peixes composta por 834 espécies válidas com ampla diferenciação cromossômica. Neste grupo, a subfamília Loricariinae apresenta um grande número de espécies e ampla diversidade cromossômica, a exemplo do gênero *Harttia*. Considerando a importância dos elementos repetitivos para a evolução cromossômica e a sua eficácia como marcadores cromossômicos, este trabalho realizou o mapeamento físico por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em sete espécies do gênero *Harttia* com objetivo de avaliar a identidade e a dinâmica destes RTEs nos genomas dessas espécies de loricariídeos. Os resultados mostraram um intenso acúmulo dos RTEs *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e distribuição dispersa em regiões heterocromáticas e eucromáticas nos genomas das espécies aqui estudadas. Estes resultados foram relacionados a um possível papel na regulação gênica dos RTEs presentes nas regiões eucromáticas e, que este acúmulo de cópias nos genomas pode não estar relacionado com a grande diversidade cariotípica encontrada no gênero *Harttia*.

Introdução

Os elementos transponíveis são agrupados em duas grandes classes baseadas em sua organização estrutural e mecanismo de transcrição. 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 Elements) e LINEs (Long Interspersed 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).

Durante muito tempo, sequências repetitivas foram consideradas DNA lixo (junk DNA), DNA egoísta (selfish DNA) ou DNA parasítico (parasitic DNA) (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980; Nowak, 1994) devido à ausência de funcionalidade no genoma. Com o crescente volume de informações, tais sequências tiveram seu papel ampliado na evolução estrutural e funcional do genoma (Shapiro & Von Sternberg, 2005; Biémont & Vieira, 2006) e envolvimento em rearranjos cromossômicos, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002) e com atuação na regulação gênica (Marino-Ramirez *et al.*, 2005; Muotri *et al.*, 2007; Polavarapu *et al.*, 2008).

Em peixes, os elementos com melhor caracterização pertencem ao grupo *Rex* (RTEs não-LTRs caracterizados pela primeira vez no genoma do peixe *Xiphophorus*). Membros da família *Rex* são encontrados abundantemente com diferentes padrões de organização, mostrando-se ativos durante a evolução de diferentes linhagens de peixes (Malik *et al.*, 1999; Volf *et al.*, 1999, 2000, 2001a, 2001b; Ferreira *et al.*, 2011a). Dentre esses membros, destacam-se os retrotransposons *Rex1* e *Rex3* que codificam, além da transcriptase reversa, uma endonuclease apurinica-apirimidinica (Feng *et al.*,

1996), e o *Rex6*, primeiro retrotransposon com endonuclease de restrição identificado em vertebrados (Volf *et al.*, 2001c). Elementos *Rex* mostram organização diferenciada entre as espécies estudadas, podendo estar organizadas em regiões heterocromáticas ou dispersas pelo genoma (Ferreira *et al.*, 2011b).

Em ciclídeos, Valente *et al.* (2011) realizaram o mapeamento cromossômico dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em 8 espécies e, 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* (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 á distribuição desses retroelementos em Loricariidae, Ferreira *et al.* (2011b), ao realizar o mapeamento físico por FISH de *Rex1* e *Rex3* em *Parotocinclus maculicaudas*, *Pseudotocinclus tietensis* e *Hisonotus leucofrenatus*, 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). *Harttia* é um gênero da subfamília Loricariinae que apresenta aproximadamente 23 espécies, sendo que 17 estão presentes em diferentes bacias brasileiras. Destas, somente 5 apresentam dados citogenéticos, sendo *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003, Blanco *et al.*, 2012a), *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2005), *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006), *Harttia* sp. n (Rodrigues, 2010) e *H. longipinna* (Blanco *et al.*, 2012b). Apesar do pequeno número de espécies investigadas por metodologias citogenéticas, o gênero *Harttia* apresenta uma grande diversidade cariotípica, com número diploide variando de 62 cromossomos em *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010) a 52 cromossomos em fêmea de *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006); além de sistemas de cromossomos sexuais múltiplos do tipo

XX/XY₁Y₂ descrito para *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a) e X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y descrito para *H. punctata* (Blanco *et al.*, em preparação); e a presença de cromossomo B em *H. longipinna* (Blanco *et al.*, 2012b). Diante deste aspecto, este trabalho realizou mapeamento físico por FISH dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em sete espécies do gênero *Harttia*, bem como a caracterização das sequências, buscando relacionar os dados encontrados com os inúmeros rearranjos cromossômicos observados no gênero.

Materiais e Métodos

Espécies analisadas e preparações cromossômicas

Foram analisadas sete espécies do gênero *Harttia* coletados em diferentes bacias hidrográficas brasileiras: *H. kronei* (rio Açungui, bacia do rio Ribeira, município de Campo Largo, estado do Paraná, GPS: 25°22'44"S; 49°39'08"W), *H. longipinna* (calha principal do rio São Francisco, município de Pirapora, estado de Minas Gerais, GPS: 17°21'22,8"S; 44°56'59,5"W), *H. gracilis* (córrego Machadinho, afluente do rio Sapucaí, bacia do rio Sapucaí-Mirin, município de Santo Antônio do Pinhal, estado de São Paulo, GPS: 22°48'31"S; 45°41'21"W), *H. punctata* (rio Itiquira, bacia do Tocantins, município de Formosa, estado de Goiás, GPS: 15°19'25"S; 47°25'26"W), *H. loricariformis* (rio Paraitinga, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Cunha, estado de São Paulo, GPS: 22°52'22"S; 44°51'0,2"W), *H. torrenticola* (ribeirão das Araras, bacia do rio São Francisco, município de Piumhi, estado de Minas gerais, GPS: 20°16'15"S; 45°55'39"W) e *H. carvalhoi* (ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Pindamonhangaba, estado de São Paulo, GPS: 22°47'8"S; 45°27'19"W). Os cromossomos metafásicos foram obtidos de porções do rim anterior, seguindo os protocolos descritos por Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993).

Extração do DNA e isolamento dos retroelementos

A extração do DNA genômico foi realizada de *H. kronei* segundo o método de tampão salino (Aljanabi & Martinez, 1997). Os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram amplificados por PCR utilizando-se dos 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; 2001a).

As reações foram realizadas para um volume final de 25 µl, contendo 100-200 ng de DNA genômico, 0.2 µM de cada primer, 0.16 mM de dNTPs, 0.5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1.5 mM 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 %, quantificados em aparelho de 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.

Sequenciamento e análise das sequências

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. kronei* foi realizada com o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (Hall, 1999). A similaridade com sequências depositadas no banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>) foi realizada através da ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Hibridização *in situ* fluorescente

Todos os processos de hibridizações seguiram o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), sobre alta condição de estringência de 77 % (200 ng 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

Isolamento dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*

As sequências parciais dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* isolados de *H. kronei* apresentaram 546 pb, 433 pb e 534 pb, respectivamente (Fig. 1). O resultado do sequenciamento de DNA destes elementos quando comparados àqueles depositados no banco de dados do GeneBank (NCBI) revelou similaridade com os respectivos elementos de outras espécies sendo que o RTE *Rex1* apresentou similaridade média de 65 %, *Rex3* obteve similaridade de até 90 % e, *Rex6* cerca de 70% similaridade com este elemento de outras espécies.

Mapeamento físico dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* por FISH

Para todas as espécies analisadas, os elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* apresentaram-se presentes na maioria dos cromossomos, tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas (Fig. 2, 3).

O mapeamento físico dos elementos *Rex* para *H. kronei* evidenciou que o elemento *Rex3* é mais abundante e mais disperso, quando comparado com os elementos *Rex1* e *Rex6*, que apresentaram uma maior concentração em blocos mais proeminentes dispersos pelo genoma (Fig. 2). Em *H. longipinna*, é possível observar um maior acúmulo do elemento *Rex1*, seguido dos elementos *Rex3* e *Rex6*. É notável a ausência de sinal de hibridização dos elementos *Rex* em alguns blocos cromossômicos heterocromáticos terminais, além de um conspícuo bloco no maior acrocêntrico (cromossomos este portador das NORs) e nos cromossomos supranumerários (Fig.2). Para *H. gracillis* o mapeamento físico dos elementos *Rex* evidenciou que esses RTEs encontram-se muito dispersos por todos os cromossomos, não sendo evidenciado um maior acúmulo preferencial em algum par cromossômico (Fig. 2).

As hibridizações dos elementos *Rex* em *H. punctata* evidenciaram um maior acúmulo de *Rex3* e *Rex6*, quando comparado com *Rex1*. É pertinente ressaltar a ausência de sinal de hibridização dos RTEs *Rex3* e *Rex6* nos cromossomos X_1 e X_2 do sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Fig. 2). Em *H. loricariformis* foi observado um maior acúmulo do elemento *Rex6*, seguido dos elementos *Rex3* e *Rex1*, sendo este último o menos abundante (Fig. 3). Em *H. torrenticola* foi verificado um maior acúmulo do elemento *Rex1*, seguido dos elementos *Rex6* e *Rex3*, sendo este último o menos abundante. É notável a ausência dos elementos *Rex* no bloco heterocromático proeminente localizado no maior par metacêntrico e na região centromérica heterocromática do maior pra metacêntrico (Fig. 3). Por fim, em *H. carvalhoi* não foi observada a presença de sinal dos retroelementos *Rex* na região correspondente às NORs. É pertinente ressaltar que na região centromérica do primeiro par metacêntrico (cromossomo

X), contrariamente ao encontrado em *H. torrenticola*, todos os elementos *Rex* foram evidenciados (Fig. 3).

Discussão

Uma análise comparativa dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* isolados de *Harttia* no presente trabalho revela uma relativa similaridade com os respectivos elementos de outras espécies depositadas no banco de dados do GeneBank (NCBI), sendo *Rex1* de *Harttia kronei* 67% similar com sequência parcial de *Rex1* de *Otocinclus flexilis*; *Rex3* de *Harttia* 90% similar com sequência parcial de *Rex3* de *Pseudotocinclus tietensis* e *Rex6* de *Harttia* 70% similar com *Rex6* de *Cichla kelberi*. É pertinente ressaltar que os elementos *Rex1* e *Rex3* de *Harttia* apresentam uma alta similaridade com as respectivas sequências de Hypoptopomatinae, isoladas por Ferreira *et al.* (2011b). Esta alta similaridade encontrada entre esses elementos sugere que estes elementos sejam compartilhados em Loricariidae.

Os elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* são repetições terminais curtas que tem demonstrado serem ativas na evolução de diversos grupos de peixes, podendo estes serem organizados cromossomicamente 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 um padrão disperso para as três sequências. Esse mesmo padrão de dispersão encontrado para *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* para todas as espécies aqui analisadas sugerem que essas sequências possam estar evoluindo em conjunto ou através de um mesmo mecanismo. Ferreira *et al.*(2011b) encontraram um caso similar ao investigar a localização de *Rex1* e *Rex3* em três espécies da subfamília Hypoptopomatinae. Entretanto, a quantidade de *Rex* encontrado no genoma das espécies do presente trabalho é muito superior ao encontrado por estes autores. Desta forma, os dados disponíveis sugerem

que esse padrão disperso para os elementos *Rex* possa ser uma característica das espécies de Loricariidae.

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 características das espécies pertencentes a esta família de peixes (Fig. 2, 3). No gênero *Harttia* é possível ainda visualizar o intenso acúmulo destes RTEs quando comparados a outras espécies de peixes neotropicais, principalmente em regiões eucromáticas. Este acúmulo em regiões eucromáticas, aliado aos dados de similaridade que mostram que estes RTEs já começaram a perder sua identidade de retrotransposição sugere um papel regulatório na expressão gênica, como descrito para outros DNAs repetitivos em eucariotos (Marino-Ramirez *et al.*, 2005; Muotri *et al.*, 2007; Polavarapu *et al.*, 2008).

Em *H. longipinna* há um conspícuo bloco heterocromático alocado no maior para acrocêntrico no qual não foi detectada a presença de nenhum dos retroelementos testados, assim como nos cromossomos supranumerários desta mesma espécie (Fig. 2). A ausência dos elementos *Rex* nos cromossomos B de *H. longipinna* descarta o papel destes RTEs na origem destes cromossomos acessórios. Ainda, é possível inferir a provável origem destes cromossomos B a partir deste par acrocêntrico. Essa hipótese está baseada no fato (i) destes RTEs serem compartilhados por todos os Loricariidae analisados (Ferreira *et al.*, 2011b), portanto a invasão no genoma de *Harttia* é anterior ao surgimento do clado e; (ii) ser o único par cromossômico livre da invasão dos elementos *Rex* nesta espécie. O não acúmulo dos elementos *Rex* em regiões heterocromáticas específicas não é exclusividade de *H. longipinna*. Em *H. torrenticola* é evidente um proeminente bloco heterocromático

alocado na posição terminal do braço longo do maior par acrocêntrico, no qual não foi detectada a presença dos elementos *Rex* testados. Casos similares, porém menos representativos, são encontrados nas demais espécies de *Harttia* aqui estudadas. Essa heterocromatina compartimentalizada, que possivelmente impossibilita o acúmulo dos elementos *Rex*, presente em diferentes espécies do gênero *Harttia*, sugere que uma evolução em concerto possa ter ocorrido durante o processo de diversificação dessas espécies. Por outro lado, Blanco *et al.* (em preparação) demonstraram que esta heterocromatina pode estar envolvida com alguns dos rearranjos cromossômicos do tipo inversão e fusão cromossômica que ocorreram na diferenciação cariotípica do gênero *Harttia*. Neste caso, os RTEs *Rex* não estariam auxiliando nestes rearranjos cromossômicos.

Costa-Silva (2009) utilizando marcadores moleculares nucleares e mitocondriais demonstrou uma grande proximidade entre *H. carvalhoi* e *H. torrenticola*, a ponto dessas espécies representarem um clado monofilético. Blanco *et al.* (2012a), utilizando-se de marcadores cromossômicos, reforçam a proximidade entre as duas espécies e atribuem a fissão cêntrica do maior par metacêntrico, por este compartilhado somente entre as duas espécies, como o evento responsável pela origem do sistema de cromossomos sexuais XX/XY₁Y₂ presente em *H. carvalhoi*. As FISHs revelaram um acúmulo dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* na região heterocromática pericentromérica do maior par metacêntrico em *H. carvalhoi* (cromossomo X) e ausência desses elementos no maior par acrocêntrico de *H. torrenticola* (par 1) (Fig. 3). Os TEs já foram considerados *hot spots* para rearranjos cromossômicos (Valente *et al.*, 2011). Diante desta observação, a presença desses retroelementos na região pericentromérica do cromossomo X de *H. carvalhoi* pode ter auxiliado na fissão que culminou com a formação dos cromossomos Y₁ e Y₂; no entanto, não pode ser descartada a invasão destes RTEs após o surgimento do sistema de cromossomos sexuais múltiplo.

Por sua vez, a espécie *H. punctata* apresenta o sistema de cromossomos sexuais X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y e pouca ou nenhuma cópia dos elementos *Rex* na região proximal dos cromossomos

acrocêntricos X_1 e X_2 . Blanco *et al.* (em preparação) demonstraram que a região proximal dos cromossomos acrocêntricos X_1 e X_2 propiciaram o rearranjo cromossômico que desencadeou a origem deste sistema sexual nesta espécie. Assim, é evidente a não atuação dos elementos *Rex* neste rearranjo, o qual foi propiciado por um tipo particular de sequência não relacionada aos elementos *Rex*, porém, compartilhada pelos cromossomos X_1 e X_2 .

A co-localização dos elementos *Rex* com genes ribossomais têm sido descrita para diversos grupos (Einckbush, 2002). Acredita-se que haja um nicho especializado característico dos genes ribossomais que permite a sobrevivência de uma série de elementos móveis (Zhang *et al.*, 2008), estes podendo influenciar na regulação da síntese de rRNA, devido à possibilidade de eventos de recombinação, ou ainda, simplesmente pelo sucesso do seu papel parasitário (Einckbush & Einckbuch, 2007). Para as espécies do gênero *Harttia* analisadas não foi observado acúmulo de elementos *Rex* ao sítio de rDNA maior, evidenciando que não há um papel funcional destes elementos para o rDNA 45S de *Harttia*, e que provavelmente estes RTEs não estão envolvidos com as inversões e transposições do par cromossômico portador das NORs neste gênero, como demonstrado por Blanco *et al.* (em preparação).

As espécies de *Harttia*, aqui estudadas apresentam um maior acúmulo dos elementos *Rex* quando comparada com as espécies de Hypoptopomatinae (Ferreira *et al.*, 2011b). Em todas as hibridizações realizadas no presente trabalho foi utilizada, para todos os elementos *Rex* e para todas as espécies, alta condição de estringência (aproximadamente 77 %). Considerando que Ferreira *et al.* (2011b) utilizaram uma alta estringência em seus ensaios de hibridização para as espécies de Hypoptopomatinae, a maior intensidade de sinal fluorescente encontrado nas espécies de *Harttia* do presente trabalho revela que os elementos *Rex* são mais abundantes nos genomas das espécies aqui estudadas, quando comparada com outros loricariídeos, porém, esta abundância de cópias ainda não tem função conhecida.

Os elementos *Rex*, que estão presentes no genoma de diferentes espécies de peixes, têm sofrido alguns processos de transposição, alguns dos quais identificados como sendo eventos recentes (Ferreira *et al.*, 2011a). O padrão disperso encontrado dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* para as espécies analisadas no presente trabalho também foi encontrado em grupos que apresentam uma grande diversidade cromossômica como, por exemplo, em *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2010). Para as espécies de Hypoptopomatinae (Loricariidae) *Hysonotus leucofrenatus*, *Pseudotocinclus tietensis* e *Paratocinclus maculicauda*, Ferreira *et al.* (2011b) encontraram um padrão alocado em pequenos blocos distribuídos por todos os cromossomos. Em contrapartida, em 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, como encontrado por 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. Ainda, Raskina *et al.* (2008) consideraram que os retroelementos, devido a sua mobilidade no genoma, apresentam uma significativa influência na evolução cromossômica por estarem frequentemente associados a rearranjos cromossômicos. No entanto, a distribuição dispersa dos retroelementos *Rex* aliada a abundância de tais elementos no genoma das espécies aqui estudadas, principalmente em regiões eucromáticas, pode não estar relacionada com a grande diversidade cariotípica encontrada por Blanco *et al.* (em preparação) no gênero *Harttia*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa pela identificação dos exemplares, aos técnicos de coleta Pedro Luis Gallo e Luis Henrique da Silva. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

Referência

- Aljanabi SM, Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic. Acids. Res.** 25:4692–4693.
- Alves AL, Oliveira C, Foresti F (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia** 56: 57-63.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology.** 215(3):403-410.
- Armbruster JW (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.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics** 2: 103-120.

- Biémont C, Vieira C (2006). Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature** 443: 521-524.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni, RF, Traldi JB, Martiez JF, Moreira-Filho O. (em preparação b). Diversidade cariotípica e tendências evolutivas no gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae).
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Traldi JB, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2012a). The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** On line.
- Blanco DR, Vicari MR, Artoni RF, Traldi JB, Moreira-Filho O (2012b). Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First report of B chromosomes in the genus. **Zoological science**. 29(9): 604-609.
- Bouneau L, Fisher C, Ozouf-Costaz C, Froschauer A, Jaillon O, Coutanceau JP, Körting C, Weissenbach J, Bernot A, Volff JN (2003). An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Res** 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, Higué D, Langin T, eds. (1998) **Dynamics and Evolution of Transposable Elements**. Austin/London: Landes Bioscience/Chapman & Hall, 1-197.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2006). Cytogenetic characterization and description of na XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research** 12: 320-324.
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC (2010). Differentiation of the XY sex chromosomes in *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sex Dev** 4: 176–185.

- Cramer CA, Bonatto SL, Reis RE (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, Roest Crolius H (2002). Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 1636–1641.
- Doolittle WF, Sapienza C (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature** 284: 601-603.
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007). Finally orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175: 477-485.
- Eickbush TH (2002). R2 and related site-specific non-long terminal repeat retrotransposons. In *Mobile DNA II*. Edited by: Craig NL, Craigie R, Gellart M, Lambowitz AM Washington: Am Society of Microbiol 813-835.
- Eschmeyer WN, Fong JD (2012). **Species of Fishes by family/subfamily**. Versão online datada de 10/05/2012. <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>
- Feng Q, Moran JV, Kazazian Jr HH, Boeke JD (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. **Cell** 87: 905-916.
- Ferreira DC, 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 DC, Oliveira C, Foresti F (2011b). Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetics and Genome Research** 132: 64-70.

- Fischer C, Bouneau L, Coutenceau JP, Weissenbach J, Volf JN, 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 LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘in vitro’ short treatment with colchicine. **Experientia** 49: 810-813.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, 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
- Hall, TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.
- Hartl DL, Lozovsaya E, Lawrence JG (1992) Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. **Genetica** 86:47-53.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity** 94:180-186.
- Kidwell MG, LISCH D (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 7704-7711.
- Kidwell MG, Lisch DR (2001). Perspectives: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution** 55:1-24.
- Kidwell MG (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica** 115: 49-63.
- Langeani F, Oyakawa OT, Montoya-Burgos JI (2001). New species of *Harttia* (Loricariidae, Loricariinae) from the Rio São Francisco Basin. **Copéia** 1: 136-142.

- Malik HS, Burke WD, Eickbush, TH (1999). The age and evolution of Non-LTR retrotransposable elements. **Mol Biol Evol** 16: 793-805.
- Marino-Ramirez L, Lewis KC, Landsman D, Jordan IK (2005). Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. **Cytogenet Genome Res** 110: 333–341.
- Mirada Ribeiro P (1908). Peixes do Ribeira, resultado da excursão do Sr. Ricardo Kone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Komos** 5:1-5.
- Miranda Ribeiro P (1939). Sobre o gênero *Harttia* Steindachner (Peixes: Loricariidae). Boletim Biológico (nova série) 4:11-13.
- Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, Gage FH (2007). The necessary junk: new functions for transposable elements. **Hum Mol Genet** 16 (Spec No. 2): R159–R167.
- Nowak R (1994). Mining treasures from “junk DNA”. **Science** .263: 608-610.
- Oliveira C, Wang Y, Bryden LJ, Wriugh JM (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.
- Orgel LE, Crick FH (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature** 284: 604-607.
- Oyakawa OT (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner 1876 da região Sudeste do Brasil e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comum. Mus. Ciênc. PUCRS**, série zool., Porto Alegre, 6:3-27.
- 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 Sci** 16: 51–57.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83:2934-2938.

- Polavarapu N, Marino-Ramirez L, Landsman D, McDonald JF, Jordan IK (2008). Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA. **BMC Genomics** 9:226.
- Rapp Py-Daniel LH, Oliveira EC (2001). Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyol. Explor. Freshwat** 12(1):79-96.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetics and Genome Research** 120: 351-357.
- Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zool. J. Linnean Soc.**, 147:227-299.
- Rodrigues RM (2010) **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em species de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspective evolutiva**. MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. 2018p.
- Shapiro JA, Vonsternberg R (2005). Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biol Rev** 80: 1-24
- Steindachner F (1876). Die Süßwasserfische des Südöstlichen Brasilien (III). **Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien.** 74:559-694.
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC, 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. **Cytogenet Genome Research** 125:224-34.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, poletto AB, Fantinatti BEA, 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 JN, Körting C, Sweeney k, Schartl M (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Mol Biol Evol** 16: 1427-1438

Volff JN, Körting C, Schartl M (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Mol Biol Evol** 17: 1673-1684.

Volff JN, Hornung U, Schartl M (2001a). Fish retroposons related to the *Penelope* element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. **Mol Genet Genomics** 265: 711-720

Volff JN, Korting C, Froschauer A, Sweeney K, Schartl M (2001b). Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **J Mol Evol** 52: 351-360.

Volff JN, Körting C, Meyer A, Schartl M (2001c). Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. **Mol Biol Evol** 18: 427-431.

Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH. (2008) Role of recombination in the longterm retention of transposable elements in rRNA gene loci. **Genetics** 180: 1617-1626

Anexos

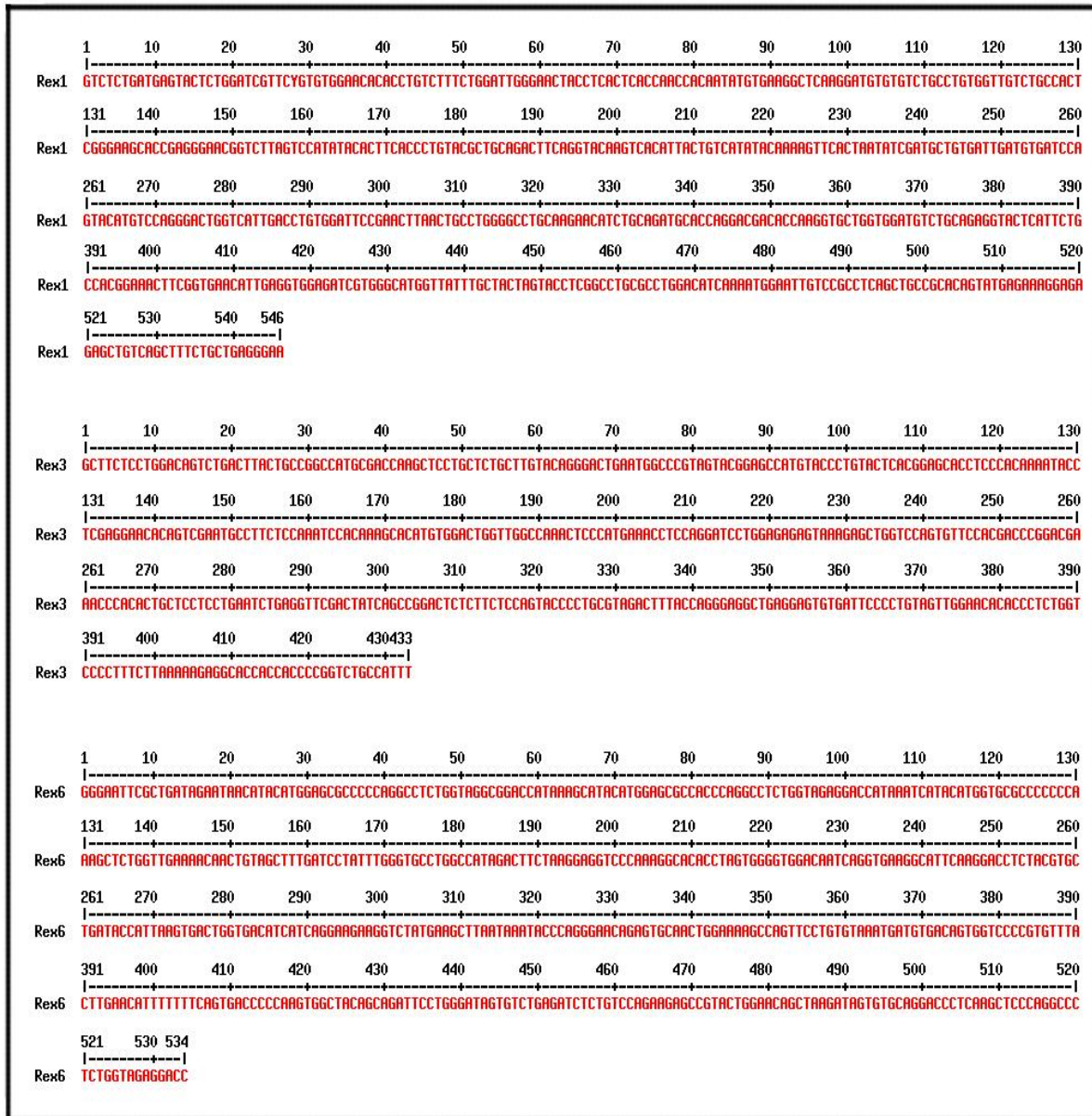


Figura 1. Sequências dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* isolados de *Harttia kroniei*.

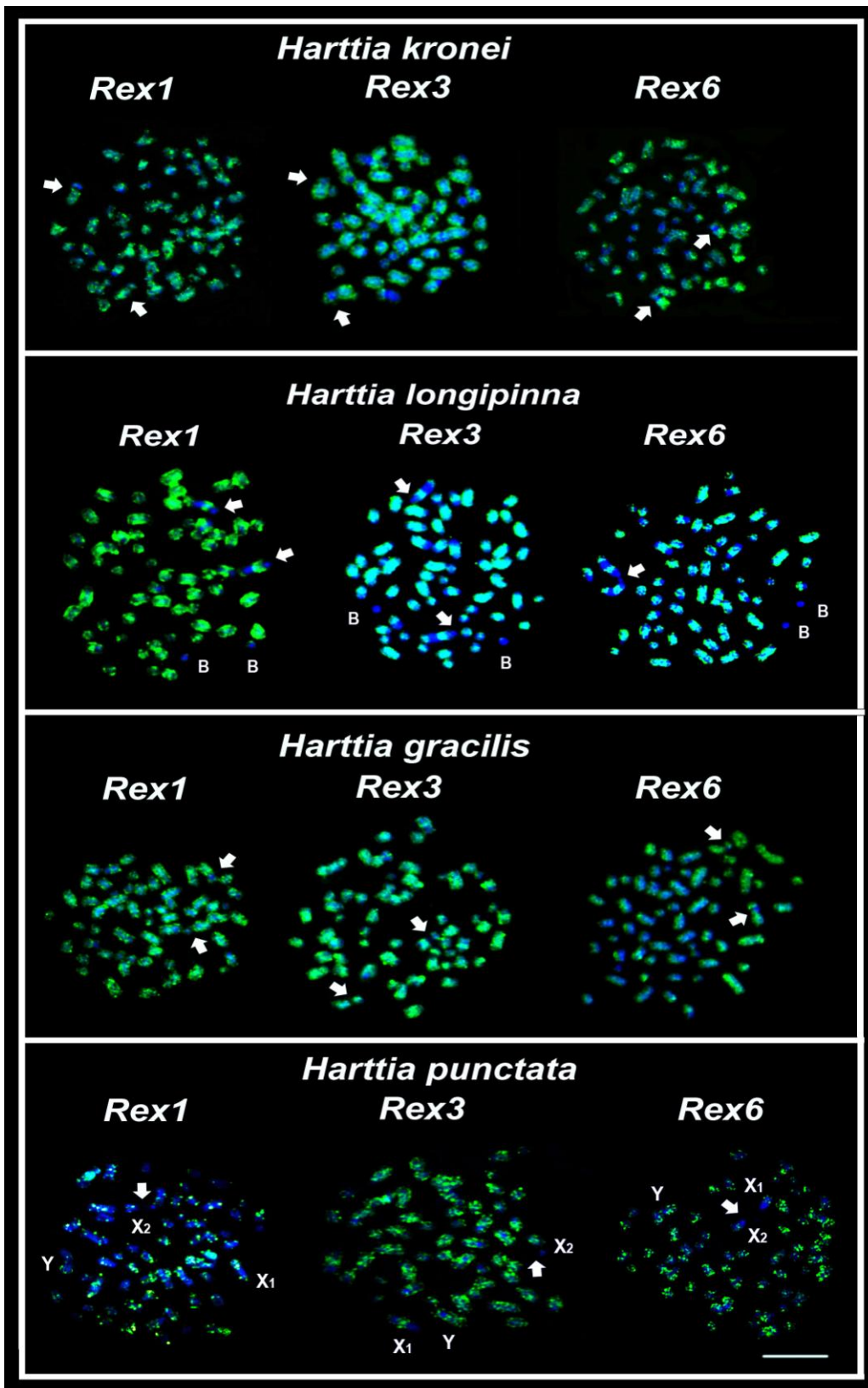


Figura 2. Metáfases das espécies do gênero *Harttia* submetidas à hibridização *in situ* com sondas de retroelementos *Rex*. Setas indicam blocos heterocromáticos. Barra = 10µm.

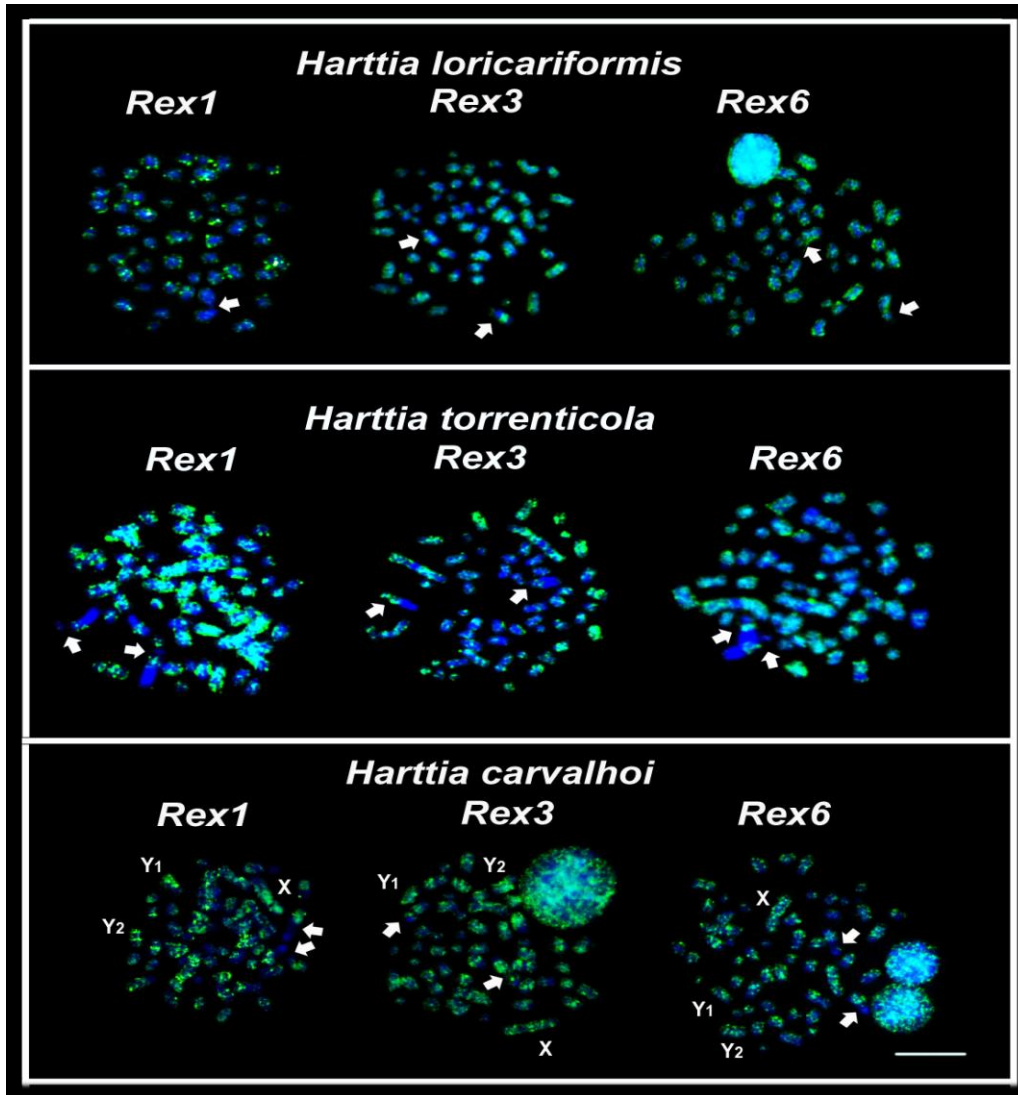


Figura 3. Metáfases das espécies do gênero *Harttia* submetidas à hibridização *in situ* com sondas de retroelementos *Rex*. Setas indicam blocos heterocromáticos. Barra = 10µm.

Capítulo VI

Correlação entre aspectos biológicos e diversidade cromossômica em algumas espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariinae)

Palavras Chaves: Evolução cromossômica, Biologia reprodutiva, Comportamento,

Artigo em preparação

Resumo

O gênero *Harttia* foi criado em 1976 por Steindachner, para abrigar *H. loricariformis*. Neste gênero, da subfamília Loricariinae, encontra-se os peixes popularmente conhecidos como cascudos e acaris, que são caracterizados por apresentar pedúnculo caudal achatado, nadadeira adiposa e quilha lateral ausentes, além de grandes placas ósseas ao redor da papila anal. Existem 23 espécies descritas para o gênero *Harttia*, entretanto poucos dados biológicos são conhecidos. Assim, este trabalho buscou, tanto por análises laboratoriais como por observações em campo, correlacionar estes aspectos biológicos com dados citogenéticos a fim de auxiliar na interpretação da diversidade cromossômica encontrada no gênero. As peculiaridades morfológicas e biológicas observadas, bem como o tipo de isolamento geográfico caracterizado para essas espécies, possivelmente apresentam uma relevância fundamental na evolução cromossômica e ecológica para este grupo de peixes.

Introdução

Segundo Ferraris (2007) a família Loricariidae é a segunda mais especiosa entre os peixes neotropicais. Recentemente, Eschmeyer & Fricke (2012) descreveram 834 espécies reconhecidas em Loricariidae, alocadas em cerca de 100 gêneros. Reis *et al.* (2006) levando em consideração os estudos realizados por Armbruster (2004) sugeriram que Loricariidae é dividida em seis subfamílias: Lithogeninae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Delturinae e Hypostominae.

Apesar de Loricariidae representar uma das famílias de peixes neotropicais com maior número de espécies, poucos trabalhos, até o momento, que abordam aspectos biológicos foram desenvolvidos (Barbieri; 1995; Vazzoler, 1996; Menezes *et al.*, 1998; Nakatani *et al.*, 2001). Nakatani *et al.* (2001) em estudo sobre o ciclo reprodutivo, com enfoque na identificação e desenvolvimento de larvas e ovos de

alguns Loricariídeos, relatam que algumas espécies, como *Rhinelepis strigosa* por exemplo, (i) constroem ninhos em buracos no fundo / barrancos dos rios para desovar, (ii) apresentam fecundação interna, (iii) mantêm os ovos aderidos ao lábio inferior e (iv) não apresentam cuidado parental pós-eclosão. Segundo Vazzoler (1996), o diâmetro médio dos ovócitos maduros desta espécie é de 1,34 mm. O ciclo reprodutivo em *Loricariichthys platymetopon* estende-se de outubro a março (período de primavera – verão na região Neotropical), a desova é parcelada, sazonal e prolongada para a cheia. A fecundação é externa, não realizam migrações e apresentam cuidado parental (Nakatani *et al.*, 2001). O diâmetro médio dos ovócitos maduros desta espécie é de 3,20mm (Vazzoler, 1996). O único estudo, até o momento, que aborda alguns aspectos da biologia reprodutiva de *Harttia* foi desenvolvido por Menezes *et al.* (1998), para *H. loricariformes*, provenientes da bacia do rio Paraíba na região sudeste do Brasil.

Steindachner (1876) descreveu o gênero *Harttia* com base na forma do corpo achatado e alongado, quilha lateral do tronco e nadadeira adiposa ausentes, pedúnculo caudal curto, olhos situados na porção dorso-lateral da cabeça, nadadeira caudal emarginada e grandes placas ósseas circundando a papila anal, para abrigar a espécie *Harttia loricariformis* (Oyakawa, 1993). Em algumas das espécies é observado um evidente dimorfismo sexual nos machos adultos, representado por odontóides no focinho e nas nadadeiras peitorais (Fig. 2a, d, e). A boca é ventral em forma de disco, apresentando lábios grossos e papilas bem desenvolvidas (Fig. 2c), os dentes são pequenos e bifurcados, encontram-se dispostos em uma única série em cada uma das maxilas (Fig. 2c, f). Considerando os caracteres morfológicos acima listados, as espécies de *Harttia* apresentam-se bem definida no âmbito taxonômico.

Existem vinte e três espécies conhecidas do gênero *Harttia*. Destas, dezessete são encontradas em território brasileiro, distribuídas em distintas bacias hidrográficas: *H. carvalhoi* (Miranda Ribeiro, 1939); *H. depressa* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. dissidens* (Rapp Py-Daniel & Oliveira,

2001); *H. duriventris* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. garavelhoi* (Oyakawa, 1993); *H. gracilis* (Oyakawa, 1993); *H. kronei* (Miranda Ribeiro, 1908); *H. leiopleura* (Oyakawa, 1993); *H. longipinna* (Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001); *H. loricariformis* (Steindachner, 1877); *H. novalimensis* (Oyakawa, 1993); *H. punctata* (Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001); *H. rhombocephala* (Miranda Ribeiro, 1939); *H. torrenticola* (Oyakawa, 1993); *H. trombetensis* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001); *H. uatumensis* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001) e *Harttia* sp. n., sendo onze delas descritas para rios da região Sudeste, cinco para região Norte e uma para região Centro-Oeste. Das 19 espécies de *Harttia*, somente oito apresentam dados citogenéticos: *H. kronei* (Alves *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2012a), *H. loricariformis* (Kavalco *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, em preparação b), *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a), *Harttia* sp. n. (Rodrigues, 2010), *H. longipinna* (Blanco *et al.*, 2012b), *H. torrenticola* (Blanco *et al.*, 2012), *H. punctata* (Blanco *et al.*, em preparação a) e *H. gracilis* (Blanco *et al.*, em preparação b)

Estudos realizados por metodologias de citogenética clássica e molecular em oito espécies do gênero *Harttia*, evidenciam uma grande diversidade na macroestrutura cromossômica em espécies de *Harttia*, representada tanto pela estrutura cariotípica quanto pelo número diplóide (Blanco *et al.*, em preparação b). As espécies deste gênero tem apresentado uma variação de $2n=52$ cromossomos em *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a) a $2n=62$ cromossomos em *Harttia* sp. (Rodrigues, 2010). Para *H. carvalhoi* foi descrito $2n=52$ cromossomos para fêmeas e $2n=53$ cromossomos para machos, apresentando uma heterogametia masculina caracterizada por um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a). Blanco *et al.* (em preparação a) encontraram em *H. punctata*, número diplóide de 57 cromossomos para machos e 58 cromossomos para as fêmeas, caracterizando assim um sistema de cromossomos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Em uma população de *H. longipinna* foi verificado $2n=58$ cromossomos para machos e fêmeas, além da presença micro-cromossomos de B. (Blanco *et al.*, 2012b).

Considerando essa grande diversidade cromossômica interespecífica, aliada a escassez de dados referentes à biologia das espécies do gênero *Harttia*, objetivou-se correlacionar os resultados citogenéticos com características biológicas das espécies, na tentativa de melhor compreender a diversificação cromossômica constatada neste grupo de peixes.

Material e Métodos

As coletas das espécies de *Harttia* foram realizadas durante o período de setembro a abril de 2009 a 2012, em diferentes rios e riachos, localizados em cinco distintas bacias hidrográficas das regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. (Fig. 1) Foram escolhidos trechos de 100 metros dos rios e riachos, que apresentavam corredeiras com leito pedregoso, trechos arenosos e remansos. Em alguns destes trechos, pequenas cachoeiras também estavam presentes. Nesses ambientes, foram realizadas medidas de oxigênio dissolvido na água utilizando-se um oxímetro YSI-55. Os exemplares foram capturados com o auxílio de tarrafas, arrastões e puçás. Posteriormente, os mesmos foram transportados vivos, devidamente acondicionados em sacos plásticos, para o laboratório de Biodiversidade Molecular e Cromossômica de Peixes da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

Para a realização deste estudo, foram analisados 484 exemplares de sete espécies do gênero *Harttia*, sendo: 22 exemplares (10 fêmeas e 12 machos) de *H. kronei* (Miranda Ribeiro, 1908) provenientes rio Açungui, bacia do rio Ribeira, município de Campo Largo, estado do Paraná, GPS: 25°22'44"S; 49°39'08"W; 73 exemplares (29 fêmeas e 44 machos) de *H. longipinna* (Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001) provenientes da calha principal do rio São Francisco, município de Pirapora, Estado de Minas Gerais, GPS: 17°21'22,8"S; 44°56'59,5"W; 65 exemplares (44 fêmeas e 21 machos) de *H. gracilis* (Oyakawa, 1993) provenientes do córrego Machadinho, afluente do rio

Sapucaí, bacia do rio Sapucaí-Mirin, município de Santo Antônio do Pinhal, estado de São Paulo, GPS: 22°48'31"S; 45°41'21"W; 243 exemplares (134 fêmeas e 109 machos) de *H. punctata* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001) provenientes do rio Itiquira, bacia do Tocantis, município de Formosa, estado de Goiás, GPS: 15°19'25"S; 47°25'26"W; 05 exemplares (2 fêmeas e 3 machos) de *H. loricariformes*, (Steindachner, 1876) provenientes do rio Paraitinga, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Cunha, estado de São Paulo, GPS: 22°52'22"S; 44°51'0,2"W; 53 exemplares (31 fêmeas e 22 machos) de *H. torrenticola*, (Oyakawa, 1993) provenientes do ribeirão das Araras, bacia do rio São Francisco, município de Piumhi, estado de Minas gerais, GPS: 20°16'15"S; 45°55'39"W e 23 exemplares (10 fêmeas e 13 machos) de *H. carvalhoi* (Miranda Ribeiro, 1939) provenientes do ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, município de Pindamonhangaba, estado de São Paulo, GPS: 22°47'8"S; 45°27'19"W (Fig.1).

Para cada um dos 484 exemplares das sete espécies foram efetuadas medidas do comprimento total com auxílio de paquímetro. Para as análises de sexagem, as gônadas foram visualizadas macroscopicamente e sobre lupa. Nos casos onde as gônadas estavam pouco desenvolvidas foram efetuadas análises ao microscópio. Em 20 fêmeas de *H. gracilis*, *H. punctata* e *H. torrenticola*, que apresentavam as gônadas bem desenvolvidas, foi efetuada a contagem/medida dos ovócitos maduros.

Resultados / Discussão

Embora as espécies de *Harttia* analisadas tenham sido coletadas em distintos rios/bacias hidrográficas, estas foram encontradas em ambientes muito similares, compostos por fortes corredeiras e fundo rochoso. A preferência por este tipo de ambiente já foi relatada anteriormente para outras espécies de *Harttia* (Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001; Provenzano *et al.*, 2005). Nos leitos arenosos e remansos dos rios e riachos, nenhum exemplar foi capturado.

Nos locais de coleta, as medidas de oxigênio dissolvido na água variaram entre 6,0-6,7 mg/L; com temperatura de aproximadamente 20°C, demonstrando assim, a grande exigência de aeração por parte destas espécies. Desta forma, as espécies de *Harttia* diferem de outros loricarídeos pois algumas espécies do gênero *Hypostomus* apresentam respiração aérea facultativa (Kramer & Granham, 1976), utilizando-se do trato gastro-intestinal ricamente vascularizado como órgão acessório para aumentar as trocas gasosas e, conseqüentemente, a eficiência respiratória (Johansen, 1970). Em conseqüência, algumas espécies de *Hypostomus* conseguem explorar habitats com pouca oxigenação da região Neotropical, onde a temperatura da água pode ultrapassar 30 °C.

Foi verificada uma maior porcentagem de fêmeas em *H. gracilis*, *H. punctata* e *H. torrenticola*, (67,7%; 55% e 58,8%, respectivamente) quando comparado com as demais espécies. Inversamente, em *H. carvalhoi*, *H. kronei*, *H. longipinna*, e *H. loricariformes*, foi encontrada uma maior porcentagem de machos (56,5%; 54,5%; 60,3% e 60%, respectivamente).

A contagem dos ovócitos maduros demonstrou que a média por fêmea é de 35 para *H. gracilis*, 36 para *H. punctata* e 38 para *H. torrenticola* (Tab. 1). Os ovócitos maduros das espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho apresentaram um diâmetro de 4.0 mm, grande quantidade de vitelo e coloração alaranjada (Fig. 3a e 3b), sendo consideravelmente maiores quando comparados aos de outros peixes neotropicais, ocupando assim, quase a totalidade da cavidade abdominal das fêmeas (Fig. 3b). Desta forma, em decorrência do grande volume de ovócitos e do pequeno porte das espécies de *Harttia*, os ovócitos maduros são poucos numerosos.

O único estudo a respeito do ciclo reprodutivo em *Harttia* foi realizado por Menezes *et al.* (1998), no qual os autores verificaram que, em *H. loricariformes*, o período reprodutivo estende-se de setembro a fevereiro, com predominância de setembro e outubro, além de desova parcelada. Este mesmo período reprodutivo foi também verificado para todas as espécies de *Harttia* ora analisadas no

presente trabalho, coincidindo com a ocorrência de temperaturas elevadas e maior precipitação. Foi observado para *H. gracilis*, *H. punctata* e *H. torrenticola* que a desova é do tipo parcelada.

A medida do comprimento total demonstrou que *H. torrenticola* apresentou exemplares de menor tamanho, enquanto que em *H. loricariformis* foram encontrados os maiores exemplares (Tab.1). Para todas as espécies estudadas os machos atingem um tamanho relativamente maior que as fêmeas (Tab.1). Na maioria dos machos adultos de *H. carvalhoi*, *H. longipinna* e *H. torrenticola* foram observados odontóideos localizados na borda do focinho e das nadadeiras peitorais, correspondendo a um dimorfismo sexual secundário e facultativo (Fig. 2d, e), observação esta também já relatada para outras espécies de *Harttia* (Oyakama, 1993; Rapp Py-Daniel, Oliveira, 2001).

Nas observações de campo pode-se verificar que o corpo achatado e as demais características corpóreas das espécies de *Harttia* lhes conferem uma excelente *performance* para explorar recursos ambientais específicos. Os espécimes foram encontrados principalmente entre pequenas cavidades de troncos ou embaixo de rochas submersas, em regiões de fortes corredeiras. Utilizam das nadadeiras como apoio, dos grandes lábios como uma ventosa para se fixarem nas rochas e dos pequenos dentes, para raspar os perifíton, (Fig. 2c, f). Segundo Esteves & Aranha (1999) os peixes pertencentes à família Loricariidae possuem um comportamento baseado na tática de pastejo, raspando o perifíton grudado sob as rochas submersas. Este mesmo comportamento alimentar foi verificado para as espécies de *Harttia*.

Nos peixes, a posição dos olhos reflete importantes condições comportamentais, como por exemplo a posição de alimentação na coluna d'água (Wikramanayke, 1990). Considerando que as espécies de *Harttia* vivem aderidas aos substratos, aliada ao fato de terem hábitos preferencialmente noturnos e não serem boas nadadoras, a posição dorso-lateral dos olhos (Fig. 2a, b) facilita a detecção de predadores. Ao se sentirem ameaçadas deslocam-se rapidamente em pulsos, percorrendo pequenos trechos dos rios e riachos à procura de abrigo entre as frestas das rochas ou aderidas no teto de locais

formadas por grandes placas rochosas submersas. Desta forma, a posição dos olhos facilita sua estratégia de vigília e tática de fuga, dificultando sua predação por espécies piscívoras, bem como sua captura por apetrechos de pesca.

A ocupação espacial e distribuição de peixes ao longo de um rio são frequentemente influenciadas por fatores abióticos e bióticos, como profundidade, correnteza, disponibilidade de alimento, tipo de substrato, entre outros (Schlosser, 1982). Menezes *et al.* (1998), estudando aspectos da biologia reprodutiva de *H. loricariformes*, verificaram que a maior ocorrência desta espécie refletia diretamente o tipo de ambiente ocupado. Em observações de campo foi constatado que, tanto na calha principal dos rios São Francisco e Paraitinga, assim como nos ribeirões Grande, Araras e Itiquira a distribuição de *H. longipinna*, *H. loricariformes*, *H. carvalhoi* e *H. punctata*, respectivamente, se restringia a micro-habitats específicos.

Diferentemente do encontrado para os grandes peixes migradores que se deslocam por toda porção da bacia hidrográfica, ou até mesmo o sugerido por Blanco *et al.*, (2010), para *Hoplias malabaricus* que colonizam grandes áreas através da dispersão passiva. As espécies do gênero *Harttia*, estudadas no presente trabalho, não apresentaram hábitos migratórios formando, assim, pequenos isolados populacionais limitados a alguns trechos de rios e riachos, nos quais as características específicas desses habitats suprem todas as necessidades destas espécies. Devido a seu *design* morfológico (Fig. 2b), as espécies de *Harttia* apresentam uma grande *performance* na utilização dos recursos disponíveis nestes micro-habitats específicos. Entretanto, estas mesmas características dificultam a ocupação de outros trechos de rios ou riachos que não apresentem tais condições. Assim, as populações de *Harttia* ficam semi-isoladas nestes micro-habitats, reduzindo sua dispersão e conseqüentemente, limitando o fluxo gênico. Tal fato é corroborado pelo alto grau de endemismo encontrado para as espécies deste gênero.

Com relação ao âmbito citogenético, uma extensa diversidade cariotípica foi constatada. O número diplóide, até o presente momento, para espécies deste gênero varia de 52 cromossomos, encontrado em fêmea de *H. carvalhoi* (Centofante *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2012a) a 62 cromossomos encontrado em *Harttia* sp.n. (Rodrigues, 2010). Em *H. carvalhoi* foi descrito $2n=52$ cromossomos para fêmea e $2n=53$ cromossomos para os machos, caracterizando, assim, um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY_1Y_2 (Centofante *et al.*, 2006) (Fig. 4) que, segundo (Blanco *et al.*, 2012a), originou-se de uma fissão associada ao maior par metacêntrico, representado pelo cromossomo X de *H. carvalhoi*. Por sua vez, *H. punctata*, proveniente de afluentes do rio Itiquira, bacia do rio Tocantins, Blanco *et al.* (em preparação a) encontraram $2n=57$ cromossomos para os machos e $2n=58$ cromossomos para as fêmeas, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Fig. 4) originado, possivelmente, através de uma inversão pericêntrica seguida de uma translocação entre os cromossomos X_1 e X_2 (portadores dos sítios de rDNA 5S e 18S, respectivamente) originando o submentacêntrico neo-Y (Fig. 4). Blanco *et al.* (2012b) encontraram em uma população de *H. longipinna*, proveniente da calha principal do rio São Francisco, a presença de micro-cromossomos B foi constatada, em aproximadamente 46% dos exemplares analisados, que apresentavam uma variação intra-individual de 0 – 2 cromossomos B (Fig. 4).

A maior frequência de polimorfismos cromossômicos encontrada em ambientes considerados “ótimos” para uma população é devido ao fato de, nessas condições, a pressão de seleção ser mais branda. Segundo Camacho (2000) a frequência de cromossomos B em uma população está diretamente vinculada às condições ambientais ideais. Esta foi a justificativa utilizada para explicar a alta frequência de cromossomos B de uma população de *A. scabripinnis* encontrada em altitude elevada no município de Campos do Jordão, SP (Néo *et al.*, 2000). Dessa forma, a grande interação entre as espécies de *Harttia* e seus respectivos micro-habitats poderia estar relacionada à presença de micro-cromossomos B presente na população de *H. longipinna*.

É pertinente ressaltar que algumas espécies de *Harttia* que apresentaram o mesmo número diplóide, apresentam conspícuas diferenças em suas fórmulas cariotípicas (Fig. 4). Desta forma, fica evidente que rearranjos do tipo inversões/translocações, além das fusões/fissões, foram fundamentais na origem dessa evidente diversidade cariotípica encontrada nas espécies de *Harttia* (Blanco *et al.*, em preparação b). Entretanto, a variação cromossômica encontrada nas espécies de *Harttia* não se restringe somente à macroestrutura cariotípica. Segundo (Blanco *et al.*, em preparação b) a variação em relação à posição e quantidade de heterocromatina além dos sítios de rDNA 5S e 18S, demonstraram que estes marcadores espécie-específicos são excelentes ferramentas para estudos de ordem taxonômica e evolutiva para espécies deste gênero (Fig. 4)

O fato das populações de *Harttia* encontrarem-se fragmentadas, ou até mesmo isoladas em trechos específicos de rios e riachos, com interrupção do fluxo gênico possivelmente contribuiu para a fixação de rearranjos cromossômicos nestas populações originando, assim, essa conspícua diversidade (Fig. 4).

Segundo Mayr (1969) a especiação por alopatria, que implica em uma divergência gênica acumulativa decorrente de isolamento geográfico, seria o principal modelo pelo qual as alterações cromossômicas se fixariam, originando novas espécies. Os resultados citogenéticos obtidos para as espécies de *Harttia*, aliado à distribuição geográfica específica e aos aspectos biológicos aqui apresentados, sugerem que a especiação deste grupo possa ter ocorrido por eventos de alopatria. Fica evidente que as diferenças morfológicas encontradas entre as espécies de *Harttia* acompanharam a diferenciação cromossômica constatada entre as espécies deste gênero. Tal situação difere do encontrado para os “complexos de espécies” *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000) e *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo 1991), onde há uma evidente diversidade cromossômica e uma manutenção dos caracteres morfológicos.

A fragmentação, ou até mesmo o isolamento, das populações de *Harttia*, explicaria o endemismo característico das espécies desse gênero. As peculiaridades morfológicas e biológicas desses apresentam uma relevância evolutiva e ecológica fundamental para este grupo de peixes. O isolamento geográfico, aliado à extrema exigência por micro-habitats específicos, faz com que as espécies de *Harttia* tornem-se mais suscetíveis às alterações naturais e/ou ações antrópicas. Segundo Bressan *et al.* (2009), *H. loricariformes* e *H. gracilis* são consideradas *táxons* vulneráveis e enfrentam reais riscos de extinção em algumas regiões do Sudeste do Brasil. Entretanto, a situação de *H. rombophela* (Miranda Ribeiro 1939) é mais drástica, sendo que esta espécie é endêmica do rio Farias, o qual pertence ao sistema da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro - Brasil, é considerada pelos ictiologistas como praticamente extinta. Os dados ora apresentados demonstram a necessidade de estudos com outros grupos de peixes que associem dados citogenéticos e biológicos a fim de uma melhor compreensão dos processos de diversificação / evolução cromossômica, possibilitando assim promover ações conservacionistas com a finalidade de preservar a grande diversidade ictiológica encontrada na região Neotropical.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos Luis Henrique da Silva e Pedro Luis Gallo pelo esforço de coleta. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material biológico. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

Referências

- 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.
- 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.
- Barbieri, G. (1995) Biologia do cascudo, *Rineloricaria latirostris* Boulenger, 1899 (Siluriformes, Loricariidae) do rio Passa-Cinco, Ipêuna/São Paulo: idade e crescimento. **Revta. Brasil. Biol.** 55(3):467-470.
- Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S.; Moreira-Filho, O. (2000) A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chrom. Res.** 8:603-613.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; Almeida, M.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (em preparação a). Origem do sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de *Harttia punctata* (siluriformes, loricariidae): pintura cromossômica e genes ribossomais 5s e 18s.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Traldi JB, Martiez JF, Moreira-Filho O. (em preparação b). Diversidade cariotípica e tendências evolutivas no gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae).
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Traldi, J.B.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2012a). The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY_1Y_2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** On line.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Traldi, J.B.; Moreira-Filho, O. (2012b). Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First report of B chromosomes in the genus. **Zoological science.** 29(9): 604-609.

- Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Bertollo, L.A.C.; Diniz, D.; Moreira-Filho, O. (2010). Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias*. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 20: 1-8.
- Bressan, P.G.; Kierulff, M.C.M.; Sugieda, A.M. eds (2009) **Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo: Vertebrados**. Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente.
- Camacho, J.P.M.; Sharbel, T.F.; Beukeboom, L.W. (2000). B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol Sci* 55: 163-178.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2006). Cytogenetic characterization and description of an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet. Genome Res.** 112:320-324.
- Eschmeyer, W. N. & R. Fricke. 2012. Catalog of Fishes, electronic version (30 Feb 2012). <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- Esteves, K.E.; Aranha, J.M. (1999). **Ecologia trófica de peixes de riachos**. In: E. P. Caramaschi, R. Mazzoni & P. R. Peres-Neto (eds.), *Ecologia de peixes de riachos*. Série Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 6^ovol., pp. 157-182.
- Ferraris Jr., C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa** 1418:1-628Johansen, 1970.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2004). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Heredity** 141:237-242.
- Kramer, D.L.; Granham, J.B. (1976). Synchronous air breathing, a social component of respiration in fishes. **Copeia** 1976(4): 689-697.
- Mayr, E. **Species, speciation and chromosomes**. In; Bernirschke, K. (ed.) **Comparative mammalian cytogenetics**. Berlin, Springer-Verlag, 1969, p.1-7.

- Menezes, M.S.; Aranha, J.M.R.; Caramaschi, E.P. (1998) Occurrence and aspects of reproductive biology of *Harttia loricariformis* (Loricariidae) in the lowe Paraíba do Sul river (Rio de Janeiro, Brazil). **Acta Biol. Par.** Curitiba, 27(1,2,3,4):15-26
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes): A species complex. **Rev. Brasil. Genet.** 14(2)331-357.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Bialezki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. (2001). **Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação.** EDUEM, xviii, 378p:Il.
- Néo, D.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2000). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** 108: 211-215.
- Oyakawa, O.T. (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner 1876 da região Sudeste do Brasil e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comum. Mus. Ciênc. PUCRS**, série zool., Porto Alegre, 6:3-27.
- Provenazano, F.R.; Machado-Allison, A.; Chemoff, B.; Willink, P.; Petry, P. (2005). *Harttia merevari*, a new species of catfish (Siluriformis, Loricariidae) from Venezuela. **Neotropical Ichthyology** 3(4): 519-524.
- Rapp Py-Daniel, L.H.; Oliveira, E.C. (2001). Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyol. Explor. Freshwat** 12(1):79-96.
- 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*. **Zool. J. Linnean Soc.**, 147:227-299.
- Rodrigues, R.M. (2010) **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em species de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspective evolutiva.** MSc dissertation, (In portuguese). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil. 2018p.

- Schlösser, I.J. (1982) Fish community structure and function along the gradients in headwater stream. **Ecol. Monog.** 52:395-414.
- Steindachner, F. (1876). Die Süßwasserfische des Südöstlichen Brasilien (III). **Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien.** 74:559-694.
- Vazzoler, A.E.A.M. (1996) **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM; São Paulo:SBI,169p.,Il.
- Wikramanayake, D.E. (1990). Ecomorphology and biogeography of a tropical stream fish assemblage: Evolution of assemblage structure. **Ecology** 71(5): 1756-1764.

Anexos

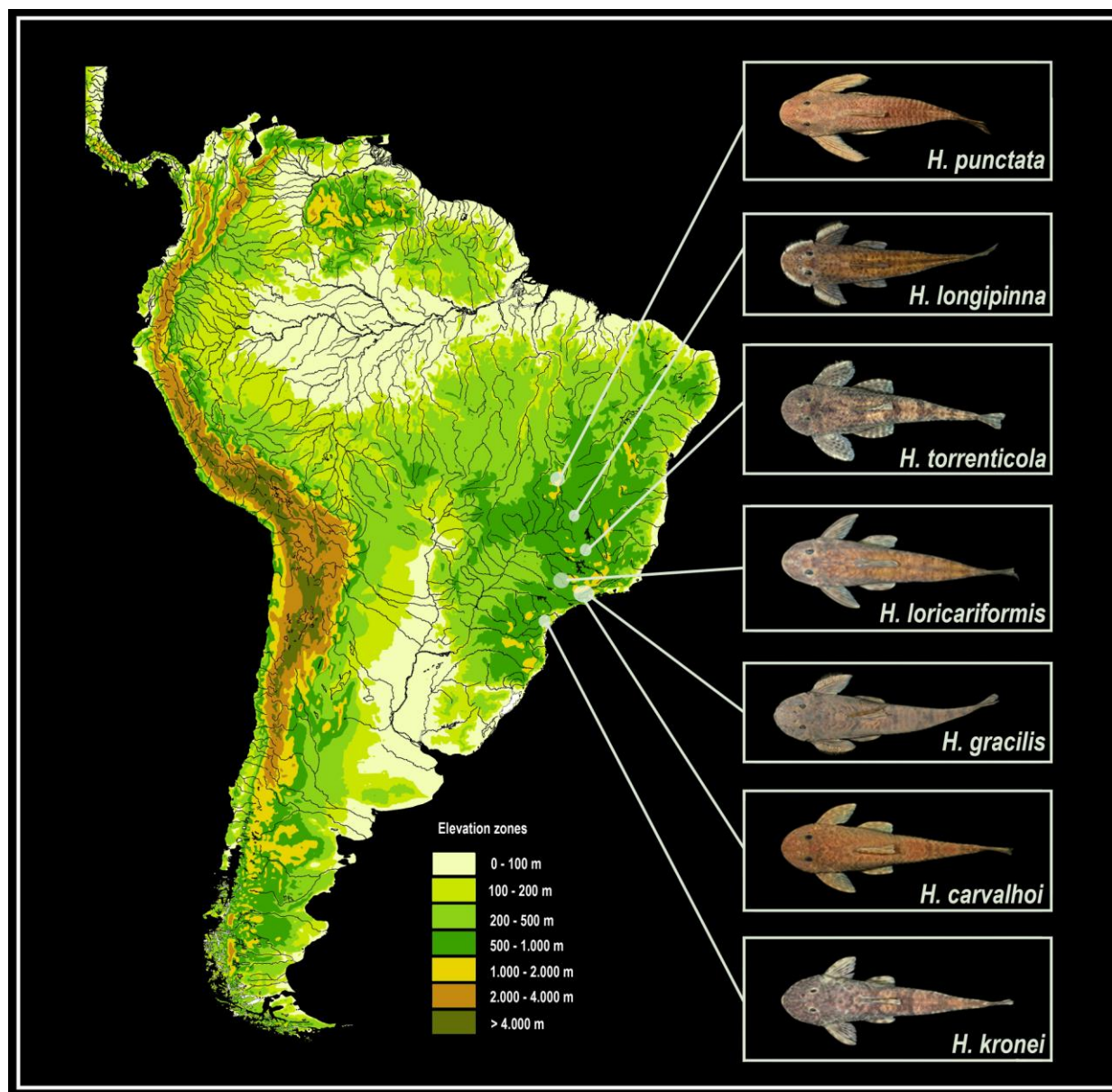


Figura 1- Distribuição geográfica das espécies de *Harttia* analisadas no presente trabalho.

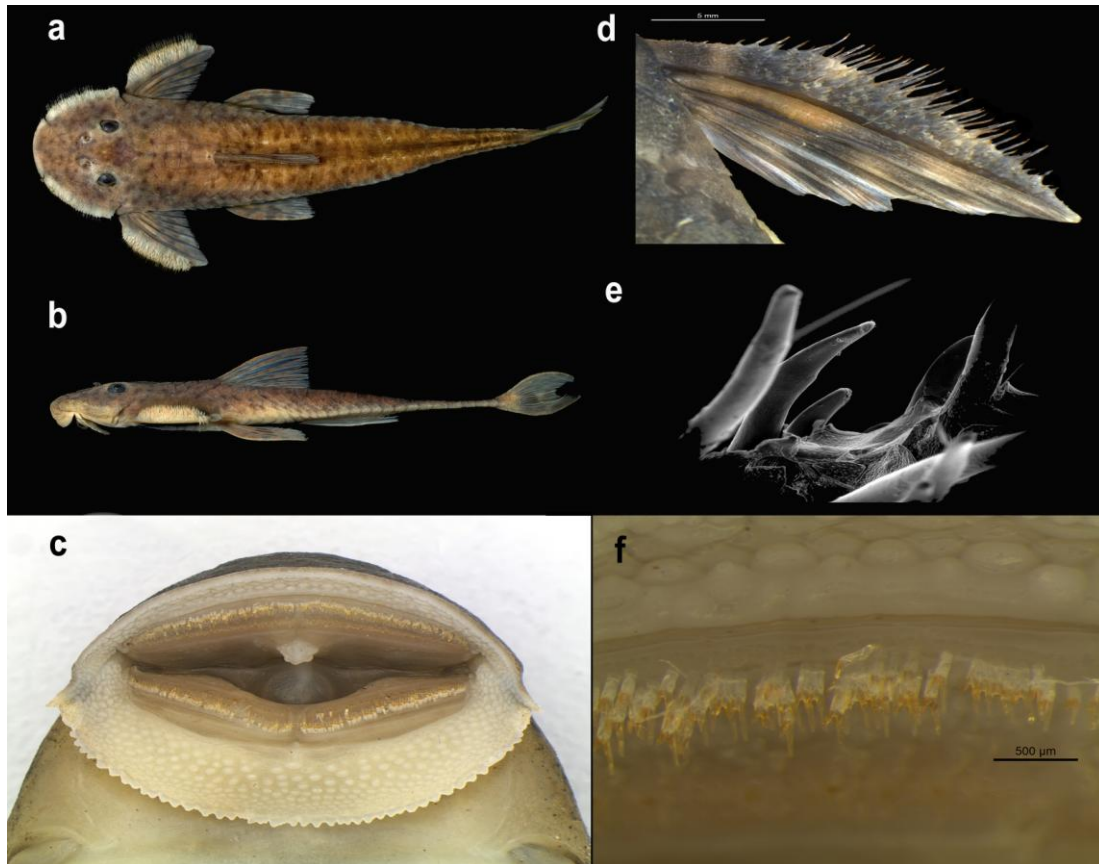


Figura 2. Vista dorsal (a) e lateral (b) de *H. longipinna*. Aparelho bucal de *H. carvalhoi* (c). Nadadeira peitoral de macho de *Harttia* com ênfase nos odontóides (d). Detalhe dessas estruturas sob microscopia eletrônica de varredura (e). Destaque para disposição dos dentes bifurcados (f).

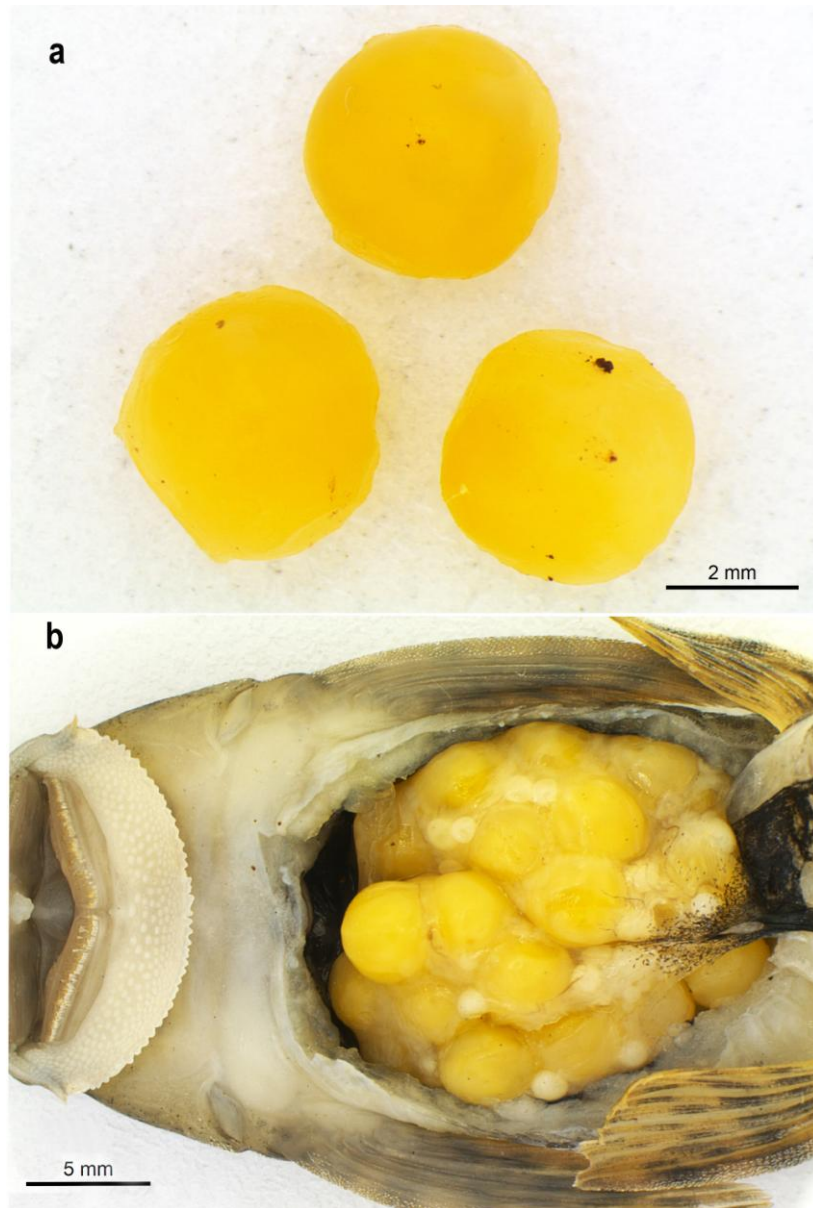


Figura3. Fêmea de *Harttia* apresentando gônadas maduras. (a) Destaque para os ovócitos maduros e (b) para a cavidade abdominal contendo os mesmos.

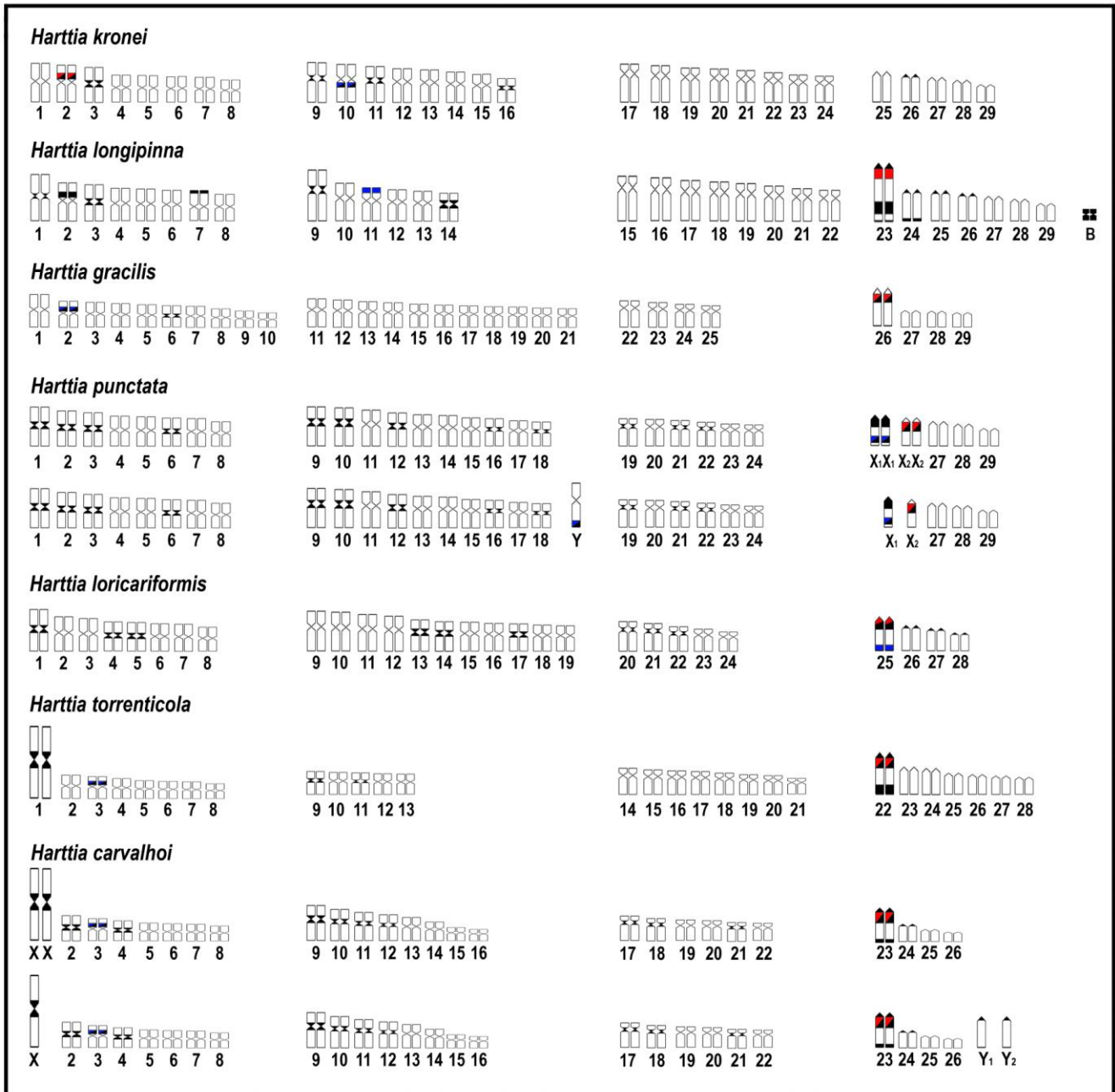


Figura4. Cariograma das espécies de *Harttia*. Heterocromatina = preto; rDNA5S = azul; rDNA18S = vermelho.

Tabela 1. Maior comprimento total encontrado em machos e fêmeas das espécies analisadas no presente trabalho, assim como a média (χ) dos ovócitos maduros de algumas espécies.

Espécie	Maior Fêmea	Maior Macho	χ Ovócitos
<i>H. kronei</i>	7,8 cm	8,2 cm	-
<i>H. longipinna</i>	12,1 cm	13,1 cm	-
<i>H. gracilis</i>	11,1 cm	11,2 cm	35
<i>H. punctata</i>	13,4 cm	16 cm	36
<i>H. loricariformis</i>	12,1 cm	18,9 cm	-
<i>H. torrenticola</i>	7,1 cm	7,2 cm	38
<i>H. carvalhoi</i>	7,5 cm	8,7 cm	-

Considerações Finais

O gênero *Harttia* foi criado por Steindachner, no ano de 1876, para abrigar os cascudos que apresentavam corpo alongado com pedúnculo caudal achatado, nadadeira adiposa e quilha lateral do tronco ausentes, nadadeira caudal emarginada e grandes placas ósseas circundando a papila anal. Neste gênero encontram-se aproximadamente 23 espécies, sendo que 17 estão presentes em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Apesar do pequeno número de espécies investigadas sob a luz de metodologias de citogenética clássica e molecular, o gênero *Harttia* apresenta uma conspícua diversidade cariotípica, com uma considerável variação no número diploide, além da presença de distintos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos e cromossomos B.

Com relação aos cromossomos supranumerários, estes foram encontrados em *H. longipinna*, na forma de micro-cromossomos. Além de apresentarem uma variação numérica intra-individual de 0 a 2, os micro-cromossomos B encontrados em *H. longipinna* são totalmente heterocromáticos. As hibridizações com retroelementos *Rex* evidenciou uma ausência de acúmulo desses retroelementos nos cromossomos B, assim como em um proeminente bloco C+ presente no braço longo do maior par acrocêntrico indicando, assim, que possivelmente estes cromossomos supranumerários possam ter se originado desse segmento heterocromático.

Dois sistemas de cromossomos sexuais múltiplos são encontrados, até o presente momento, em espécies do gênero *Harttia*, sendo XX/XY₁Y₂ em *H. carvalhoi* e X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y em *H. punctata*. O sistema encontrado em *H. carvalhoi* originou-se, possivelmente, de uma fissão do primeiro par metacêntrico (X), originando dois cromossomos acrocêntricos (Y₁ e Y₂) exclusivos dos machos. Esse grande cromossomo metacêntrico é encontrado também em *H. torrenticola*. Os dados cromossômicos, assim como dados moleculares, revelam uma grande proximidade entre estas espécies. Tal fato, aliado ao ITS (*Interstitial Telomeric Site*) encontrado no metacêntrico grande de ambas as espécies, reforça a

hipótese de que este cromossomo foi originado por um evento de fusão ocorrido antes da diversificação desse grupo monofilético. A presença de elementos *Rex* na região centromérica do metacêntrico grande somente em *H. carvalhoi* indica que esse acúmulo possivelmente possibilitou a ocorrência desse evento e, por consequência, a formação desse raro sistema de cromossomos sexuais múltiplos.

Em contrapartida, o sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ encontrado em *H. punctata* originou-se, possivelmente, em decorrência de um evento de translocação entre o primeiro (X_1) e o segundo (X_2) par acrocêntricos portadores, respectivamente, dos sítios de rDNA 5S e 18S. As hibridizações com sondas de rDNA 5S e 18S, além de sondas obtidas a partir de microdissecção total dos cromossomos X_1 e X_2 possibilitaram hipotetizar sobre a origem desse sistema de cromossomos sexuais a partir de translocações parciais entre 2 pares acrocêntricos do cariótipo, acompanhando de deleções parciais, originando o neo-cromossomo Y, presente nesse sistema.

A diversidade cromossômica encontrada nas espécies de *Harttia* não se restringe à detecção de sistemas de cromossomos sexuais múltiplos e cromossomos supranumerários, mas sim abrange desde distribuição diferencial de diversas sequências repetitivas até a detecção de diferentes números diploides e números fundamentais entre as espécies. Esta variação numérica ressalta a importância de rearranjos do tipo fusão/fissão e translocação/inversão na diversidade cromossômica encontrada no gênero.

Costa-Silva (2009) utilizando marcadores mitocondriais e nucleares, em uma análise filogenética entre diversas espécies de *Harttia*, demonstrou que *H. kronei* apresenta uma posição mais basal entre as espécies descritas para o Sul e Sudeste do Brasil. Considerando que *Harttia* sp. n. apresenta $2n=62$ cromossomos, dois caminhos de diferenciação cariotípica podem ser observados em *Harttia*: (i) redução do $2n$ através da fusão cêntrica entre espécies com $2n$ menor do que 58 cromossomos e (ii) aumento do $2n$ atribuído à fissão Robertsoniana em *Harttia* sp. n.

O mapeamento físico dos retrolementos *Rex* revelou que estes se encontram altamente dispersos, tanto em regiões heterocromáticas, quanto eucromáticas. Os elementos transponíveis, devido a sua mobilidade no genoma, apresentam uma significativa influência na evolução cromossômica por estarem frequentemente associados a rearranjos cromossômicos. No entanto, para as espécies do gênero *Harttia*, o acúmulo das sequências *Rex* não pode ser correlacionada aos rearranjos cromossômicos. É provável que estas sequências possam ter uma atividade na regulação gênica, uma vez terem sido localizadas em grande quantidade em regiões eucromáticas.

As espécies de *Harttia* habitam, preferencialmente, trechos específicos de rios e riachos e, por apresentarem limitada capacidade de dispersão, formam pequenos isolados populacionais, com reduzido fluxo gênico. Essa distribuição geográfica peculiar aliada à abundância/distribuição dispersa de retroelementos, ao fato das espécies de *Harttia* apresentarem caracteres taxonômicos bem definidos e à grande diversidade cromossômica, ressalta o gênero *Harttia* como excelente modelo para estudos de ordem evolutiva.

Assim, os aspectos biológicos (comportamento e taxonomia) , bem como o tipo de isolamento geográfico caracterizado para as espécies de *Harttia*, possivelmente tem uma relevância fundamental na evolução cromossômica deste grupo de peixes.