INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA DIVISÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – DIGEN

ANÁLISES CROMOSSÔMICAS, CLÁSSICA E MOLECULAR, DE ESPÉCIES DE Farlowella (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, LORICARIINAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL

LEANDRO MARAJÓ DA SILVA

MANAUS - AM 2017 LEANDRO MARAJÓ DA SILVA

ANÁLISES CROMOSSÔMICAS, CLÁSSICA E MOLECULAR, DE ESPÉCIES DE Farlowella (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, LORICARIINAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL



ORIENTADORA: DR^a. ELIANA FELDBERG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS - AM 2017 Marajó, Leandro

Análises cromossômicas, clássica e molecular, de espécies de *Farlowella* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae) da Amazônia central / Leandro Marajó da Silva. --- Manaus: [s.n.], 2017.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2017.

Orientador (a): Eliana Feldberg

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Farlowella. 2. Loricariinae. 3. Citogenética. I. Título.

Sinopse: São apresentados dados cromossômicos de três espécies de *Farlowella* de diferentes localidades: *F.* cf. *amazona* proveniente das adjacências da cidade de Barcelos-AM, F. oxyrryncha do Igarapé do Sítio Agenor e F. schreitmuelleri do Igarapé Jundiá, ambos localizados no Município de Manaus-AM. Foram utilizados marcadores citogenéticos clássicos (coloração convencional, detecção de heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo, Ag-RON) e moleculares (Hibridização in situ fluorescente com sondas de DNAr 5S, DNAr 18S e sequências teloméricas) para inferir sobre os mecanismos de evolução cromossômica de Farlowella. A partir dos dados obtidos sugerimos que rearranjos cromossômicos não Robertsonianos estão envolvidos na evolução cariotípica desse gênero, inclusive na diferenciação de cromossomos sexuais. Ainda, as diferenças interespecíficas e populacionais encontradas podem indicar a presença de complexos de espécies nesse gênero.

Palavras-chave: Heterocromatinização, Sequências repetitivas, Cromossomos sexuais, Rearranjos cromossômicos.



Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Areolino Albuquerque e Lucinéia Marajó, que despojam todo meu carinho, respeito e admiração e aos meus tios, Manoel Costa e Ana Regina Costa, por todo apoio que me deram.



Epígrafe

"Você nunca será quem deve ser se continuar olhando para trás imaginando o que poderia ter sido."

(Chloe Sullivan)

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

v

Financiamento

Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2).

Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com implementação de avanços técnicos. (AUXPE – Pró-Amazônia, CAPES 3297/2013/Processo nº 23038.009446/2013-09).

Agradecimentos

Agradeço a Deus que em seu infinito amor me concedeu a vida e coragem para lutar e correr atrás de meus objetivos, fazendo-me vitorioso mesmo nos momentos de tristeza. Aqui se encerra uma etapa e se inicia uma longa jornada e sei que estarás sempre comigo Senhor. Obrigado Pai.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por ter dado suporte no desenvolvimento do presente trabalho.

À Divisão do Curso de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (DIGEN), na pessoa da Dr^a. Gislene Carvalho-Zilse e Dr^a. Eliana Feldberg (coordenadoras do curso), da Dona Elci Silva (secretária do curso) e do corpo docente, pelo apoio pedagógico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelos recursos financeiros e concessão da bolsa.

À minha orientadora Dr^a. Eliana Feldberg, que fez a diferença neste trabalho, me auxiliando e ensinando com dedicação, amor, paciência e competência. Minha homenagem Àquela que sofre junto a nós em todas as etapas dessa jornada. A Ela que conquistou minha amizade, carinho, respeito e admiração.

Aos meus familiares, o meu muito obrigado, com a mais verdadeira expressão de quem tem a consciência de que chegar até aqui, teria sido muito mais difícil sem seu apoio. Amo vocês.



Ao Laboratório de Genética Animal do INPA, onde realizei todas as técnicas necessárias para a realização do presente trabalho e aos amigos, Leila Ribeiro, Ramon Favarato, Lucas Barros, Marcelle Amorim, Eduardo Eller, Alber Campos, Simone Soares, Fábio Takagui, Isac de Jesus, Carlos Silva, José Sousa e Arlindo Batista que direta ou indiretamente contribuíram com críticas e sugestões para que este trabalho ficasse o mais lindo possível.

Um agradecimento mais que especial aos amigos Patrik Viana e Milena Ferreira, que me ajudaram muito nas coletas e sempre estavam dispostos a colaborar comigo. Sei que estas simples palavras são pequenas para expressar a grande admiração e respeito que sinto por vocês. Obrigado por tudo.

À Dr^a. Lúcia Helena Rapp Py-Daniel, pela ajuda na identificação taxonômica das espécies analisadas no presente estudo.

Aos amigos Rafael Freitas, Breno Azevedo e David Nogueira, que foram pilares em minha vida. Vocês sabem todas as dificuldades que enfrentei nesses últimos meses, e sempre estiveram ali para me dizer "Siga em frente, você tem muito a conquistar". Muito obrigado pelo apoio e por sempre me alegrar nos momentos de tristeza.

A todos os amigos e colegas da turma de mestrado 2015 do DIGEN, obrigado pelos bons momentos que vivenciamos nas disciplinas. Àqueles que continuaram "Boa Sorte na defesa", àqueles que não continuaram um conselho, "Não desistam de seus sonhos".

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste Trabalho.



Resumo

O gênero Farlowella é conhecido como um grupo de bagres neotropicais, de distribuição restrita aos rios da América do Sul, tendo, na bacia amazônica, grupos de espécies endêmicas. Este gênero apresenta como sinapomorfias, o corpo coberto por placas ósseas, um pedúnculo caudal longo e deprimido, focinho proeminente e ausência de nadadeira adiposa e por causa de sua morfologia exótica são vendidos como peixes ornamentais. Mesmo sendo morfologicamente bem caracterizado, a sistemática de Farlowella permanece confusa e controversa, e tem passado por diferentes agrupamentos ao longo de sua história. Assim, o presente estudo objetivou analisar, por meio da citogenética clássica e molecular, espécies de Farlowella que ocorrem na Amazônia Central, a fim de encontrar possíveis marcadores espécie-específicos ou populacionais, que permitam inferir sobre os mecanismos de sua evolução cromossômica. Foram analisados 28 indivíduos de três espécies de Farlowella de diferentes localidades: F. cf. amazona proveniente das adjacências da cidade de Barcelos-AM, F. oxyrryncha do Igarapé do Sítio Agenor e F. schreitmuelleri do Igarapé Jundiá, ambos localizados no Município de Manaus-AM. As três espécies apresentaram 2n=58 cromossomos e número fundamental 110, 112 e 116 braços. Quanto à heterocromatina constitutiva, as três espécies exibiram blocos na região centromérica, bem como algumas marcações biteloméricas e somente F. oxyrryncha e F. schreitmuelleri apresentaram marcações intersticiais. Ainda, o padrão de banda C observado no par 27 de F. oxyrryncha caracteriza um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY. O par cromossômico nucleolar parece ser homeólogo entre as espécies. A sonda de DNAr 5S foi um marcador espécie-específico. A FISH com sonda telomérica detectou sequências teloméricas intersticiais (ITS) em F. oxyrryncha e em F. schreitmuelleri e estas foram coincidentes com heterocromatina. Em F. oxyrryncha a ITS foi polimórfica, sendo observadas quatro variações. A partir dos dados obtidos foi possível sugerir que os rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica desse gênero e na diferenciação de cromossomos sexuais são não Robertsonianos e que as diferenças interespecíficas e populacionais podem sugerir a presença de complexos de espécies nesse gênero.

Palavras-chave: Rearranjos cromossômicos, Sequências repetitivas, Cromossomos sexuais, Heterocromatinização.



Abstract

The genus Farlowella is known as a group of Neotropical catfish, with a restricted distribution to the rivers of South America, having in the Amazon basin groups of endemic species. This genus presents as synapomorphies, the body covered by bony plates, a long and depressed caudal peduncle, prominent snout and absence of adipose fin, and because of its exotic morphology are sold as ornamental fish. Even though it is morphologically well characterized, Farlowella's systematics remains confused and controversial, and have gone through different groupings throughout its history. Thus, the present study aimed to characterize, through classical and molecular cytogenetic analyzes, Farlowella species that occur in Central Amazonia, in order to find possible species-specific markers or population-based markers that allow inferring on the mechanisms of its chromosome evolution. We analyzed 28 individuals of three Farlowella species from different localities: F. cf. amazona from the vicinity of the city of Barcelos-AM, F. oxyrryncha of the Igarapé of Agenor Site and F. schreitmuelleri of Igarapé Jundiá, both located in the Municipality of Manaus-AM. The three species presented 2n = 58 chromosomes and fundamental number 110, 112 and 116 arms. As for constitutive heterochromatin, the three species exhibited blocks in the centromeric region and adjacencies, as well as some bitelomeric markers and only F. oxyrryncha and F. schreitmuelleri showed interstitial markings. Furthermore, the C-band pattern observed in the F. oxyrryncha pair 27 appears to characterize a sex chromosome system of type XX/XY. The nucleolar chromosomal pair appears to be homeologous between species. The 5S rDNA probe was a species-specific marker. FISH with telomeric probe detected interstitial telomeric sequences (ITS) in F. oxyrryncha and F. schreitmuelleri and these were matched with heterochromatin. In F. oxyrryncha ITSs was polymorphic, with four variations observed. From the data obtained it was possible to suggest that the chromosomal rearrangements involved in the karyotype evolution of this genus and in the differentiation of sex chromosomes are non Robertsonian rearrangements, and that interspecific and population differences may suggest the presence of species complexes in this genus.

Keywords: Chromosomal rearrangements, Repetitive sequences, Sex chromosomes, Heterochromatinization.



Sumário

1. INTRO	DUÇÃO	1
1.1. Asp	pectos gerais da Ictiofauna Neotropical	1
1.2. Orc	lem Siluriformes	2
1.3. A F	amília Loricariidae	3
1.3.1.	Subfamília Loricariinae	5
1.3.2.	Gênero Farlowella	6
1.4. Est	udos citogenéticos	9
1.4.1.	Importância da citogenética de peixes	9
1.4.2.	Citogenética molecular	10
1.4.3.	Citogenética de Loricariinae	11
2. OBJET	IVOS	14
2.1. Ge	ral	14
2.2. Esp	pecíficos	14
3. MATER	RIAL E MÉTODOS	15
3.1. Ma	terial	15
3.2. Me	todologia de Citogenética Clássica	17
3.2.1.	Obtenção dos Cromossomos Mitóticos	17
3.2.2.	Análise Cromossômica	17
3.2.3.	Detecção da Heterocromatina Constitutiva	18
3.2.4.	Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo	18
3.3. Me	todologia de Citogenética Molecular	18
3.3.1.	Extração de DNA	18
3.3.2.	Preparação das sondas de DNA ribossômico 18S e 5S	19
3.3.3.	Preparação da sonda telomérica	20
3.3.4.	Marcação das sondas	20
3.3.5.	FISH - Hibridização in situ fluorescente (com duas sondas)	20
3.4. Ana	álise Cariotípica	22
4. RESUL	TADOS	23
4.1. <i>Fa</i> i	lowella cf. amazona	23
4.2. Fai	lowella oxyrryncha	25
4.3. <i>Fa</i> i	lowella schreitmuelleri	27
		X

5. DISCUSSÃO	31
5.1. Diversidade cariotípica em Loricariinae, com ênfase no gênero Farlowella.	31
5.2. Distribuição das regiões heterocromáticas em espécies de Farlowella	40
5.3. Estudo de sequências teloméricas em três espécies de Farlowella	44
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	49



Lista de Figuras



Figura 9. Variações de ITSs observadas no par acrocêntrico 27 de *F. oxyrryncha*. (a) e (b) variações observadas nas fêmeas; (c) e (d) variações observadas nos machos. Xa e Xb = polimorfismo observado no cromossomo X. Y= não polimórfico............46



1. Introdução

1.1. Aspectos gerais da Ictiofauna Neotropical

A região Neotropical compreende uma área que se estende desde o sul do México, perfazendo o sul da Flórida, Califórnia, ilhas do caribe, até o sul da Argentina. Esta região se diferencia das demais regiões do planeta, por apresentar biomas complexos e extremamente diversos, como por exemplo, a Amazônia, o Cerrado, os Pampas, o Pantanal, a Patagônia entre outros. A mesma é caracterizada por possuir extensas áreas florestais, formações abertas e/ou desérticas e por extensos fluxos hídricos, fatores biogeográficos que favorecem o surgimento de áreas de endemismo, o que consequentemente ocasiona uma maior abundância e riqueza biológica nessa região (Hubert e Renno 2006; D'Horta *et al.* 2008).

Em se tratando de abundância e riqueza biológica, a ictiofauna neotropical possui maior diversidade de espécies que qualquer ictiofauna de outra região do planeta, que se justifica pelo fato dessa região apresentar as maiores bacias hidrográficas do mundo. Em escala mundial, estima-se que existem cerca de 33,5 mil espécies de peixes conhecidas, das quais 8.000 pertencem à região Neotropical (Vari e Malabarba 1998). Porém, devido à complexa rede de rios, lagos e igarapés de suas bacias hidrográficas, o conhecimento da ictiofauna neotropical ainda é limitado e incompleto (Lowe-McConnell 1999; Eschmeyer e Fong 2015).

Dentro desse contexto, a Amazônia destaca-se por possuir a maior bacia hidrográfica do mundo, ocupando desde sua nascente nos Andes Peruanos até a sua foz no Oceano Atlântico, uma área de aproximadamente 7.000.000 km². O ecossistema hídrico da bacia amazônica é dividido em sete ambientes principais: leito dos grandes rios, lagos, igapós/várzea, igarapés, corredeiras, praias e vegetação flutuante. Esses ambientes em conjunto, constituem cerca de 15% a 16% de todo o volume de água doce superficial do planeta (Milliman e Meade 1983; Santos e Ferreira 1999; MMA 2006).

Para a bacia amazônica, já foram catalogadas cerca de 1.300 espécies de peixes (Lowe-McConnell 1999), porém os levantamentos ictiícos ainda são incompletos e as estimativas alcançam um total de 5.000 espécies (Santos e

1

Ferreira 1999). A riqueza e abundância de peixes para esta região estão distribuídas principalmente nas ordens: Characiformes (43%), Siluriformes (39%), Gymnotiformes (3%) e poucos representantes das outras 14 ordens neotropicais (15%) (Lowe-McConnell 1999; Agostinho *et al.* 2007).

De fato, a ictiofauna do Neotrópico é uma das mais ricas do planeta, porém a perpetuação de populações naturais, muitas vezes restritas a ambientes específicos, vem sendo ameaçada principalmente pela introdução de espécies exóticas, pela construção de barragens e pela poluição dos seus ambientes aquáticos (Agostinho *et al.* 2007). Visando a proteção da diversidade ictiíca da região, fazem-se necessários estudos acerca dos processos evolutivos, genéticos e ecológicos das populações, aumentando o conhecimento taxonômico desse grupo de vertebrados, a fim de que essas informações contribuam para programas de conservação e manejo das espécies.

1.2. Ordem Siluriformes

Pertencente à superordem Ostariophysi, Siluriformes representa a sexta maior ordem dentre todos os vertebrados e a terceira dentre as 63 ordens de peixes, ficando atrás apenas de Characiformes e Cypriniformes (Lundberg 1975; Nelson *et al.* 2016). Com cerca 3.680 espécies válidas, classificadas em 492 gêneros e alocadas em 39 famílias, os peixes desta ordem representam aproximadamente 5,5% de todos os vertebrados viventes e 10,8% de toda a ictiofauna do planeta (Armbruster 2011; Eschmeyer e Fong 2015).

Os peixes desta ordem podem ser facilmente identificados por possuírem o corpo revestido por uma pele espessa (o que lhes confere a denominação de peixes de couro) ou coberto, total ou parcialmente, por placas ósseas (calictídeos, doradídeos e loricariídeos); possuem até quatro pares de barbilhões sensitivos; nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e da dorsal modificado em um acúleo forte e pungente, o qual, muitas vezes produz toxina associada à glândula de veneno, usada para defesa e nadadeira adiposa, geralmente bem desenvolvida (Alexander 1965; Britski *et al.* 1999; Nelson *et al.* 2016). Assumindo tamanhos, formas e cores variáveis os siluriformes podem medir desde 1,7 centímetros em *Hoplomyzon papillatus* (Friel 2003) a 5 metros em *Silurus glanis* (Nelson *et al.* 2016).



Com relação aos aspectos ecológicos, a grande maioria dos Siluriformes possui hábitos sedentários, entretanto algumas espécies de pimelodídeos chegam a migrar uma distância superior a 4.000 km (Britski 1981; Leite et al. 2007); utilizam os barbilhões sensitivos para a localização, não dependendo criticamente da visão. Esta característica possibilitou а adaptação destes peixes а hábitos predominantemente crepusculares ou noturnos, habitando diversos tipos de sistemas aquáticos, como rios, lagos, riachos e até mesmo águas subterrâneas e normalmente, se encontram associados a substratos, tais como, macrófitas aquáticas, fragmentos lenhosos submersos, dentre outros (Lundberg e Friel 2003; Muriel-Cunha 2008); são onívoros, mas existem representantes herbívoros, planctófagos e carnívoros e duas subfamílias com hábitos alimentares especializados: os Vandeliíneos que se alimentam de sangue e os Estegofilíneos, chamados de "comedores de escamas" (Machado e Sazima 1983; Nelson et al. 2016).

O monofiletismo da Ordem Siluriformes é corroborado, tanto em nível morfológico (de Pinna 1993; 1998; Britto 2002; Diogo 2003) quanto em nível molecular, com base na análise de genes nucleares e mitocondriais (Hardman 2005; Sullivan *et al.* 2006). Entretanto, as relações monofiléticas entre suas famílias ainda é controversa. Recentemente, os bagres foram divididos em duas superfamílias: Loricarioidei e Siluroidei, e uma família: Diplomystidae. A superfamília Loricarioidei é exclusiva da região Neotropical e é formada por seis famílias: Astroblepidae, Callichthyidae, Nematogenyidae, Scoloplacidae, Trichomycteridae e Loricariidae. Estudos de relações filogenéticas com base em dados morfológicos demostraram que Loricariidae é a mais derivada (de Pinna 1998; Britto 2002; Sullivan *et al.* 2006).

1.3. A Família Loricariidae

Atualmente este grupo está dividido em seis subfamílias: Lithogeneinae (Eigenmann 1909) (1gênero: 3 espécies), Delturinae (Reis *et al.* 2006) (2 gêneros: 7 espécies), Hypoptopomatinae (Eigenmann e Eigenmann 1890) (21 gêneros: 147 espécies), Neoplecostominae (Regan 1904) (5 gêneros: 54 espécies), Hypostominae (Kner 1853) (42 gêneros: 456 espécies), Loricariinae (Bonaparte 1831) (34 gêneros: 239 espécies) e o *incertae sedis Nannoplecostomus* com apenas uma espécie, totalizando assim cerca de 106 gêneros com aproximadamente 907 espécies, sendo, portanto a mais numerosa dentre as 39 famílias de Siluriformes e a quinta



família mais rica de peixes (Reis et al. 2003; 2006; Armbruster 2004; Ferraris 2007; Ribeiro et al. 2012; Eschmeyer e Fong 2015). Entretanto, esta classificação vem passando por várias mudanças ao longo do tempo. Diversas filogenias, tanto moleculares como morfológicas foram propostas para tentar entender as relações de subfamílias. parentesco entre as Nomes como Argiinae, Astroblepinae, Plecostominae, Chaetostominae, Hemipsilichthiinae, Upsilodinae, Ancistrinae e Otothyrinae já foram considerados como subfamílias de Loricariidae. Porém, Loricariinae sempre se manteve como uma subfamília de Loricariidae, mostrando-se como um grupo monofilético bem definido (Regan 1904; Gosline 1947; Isbrücker 1980; Howes 1983; Schaefer 1987; Montoya-Burgos et al. 1998; Montoya-Burgos 2001; Reis et al. 2003; 2006; Armbruster 2004; Pereira 2005; Chiachio et al. 2008; Cramer et al. 2008; 2011; Roxo et al. 2012).

Os representantes dessa família são peixes exclusivos de água doce e estão distribuídos pela região Neotropical, estendendo-se desde a Costa Rica e Panamá até o sul da Argentina (Nelson *et al.* 2016). São bagres de pequeno a médio porte, com espécies que variam de 2,22 centímetros como *Nannoplecostomus eleonorae* (Ribeiro *et al.* 2012) a mais de 100 centímetros, quando adultos, como espécies dos gêneros *Panaque, Acanthicus e Pterygoplichthys* (Schaefer 1986). Devido à sua variedade de formas e cores, os loricariídeos são apreciados no mercado aquarista tanto como ornamentais, quanto como "limpadores" de aquário, por serem detritívoros (Ferraz 1999; Zuanon 1999). Além disso, são apreciados na culinária das populações amazônidas (Batista *et al.* 1998).

A maioria das espécies de loricariídeos é de hábito noturno e três espécies de *Ancistrus* possuem habitat subterrâneo (Trajano 2001; Weber 2003). A boca em forma de ventosa permite esses peixes aderirem-se ao substrato, mesmo em águas correntes particularmente rápidas. Apresentam uma variedade de formas de maxilas e dentes que são adaptados para o tipo de recurso alimentar que estes peixes exploram dentro do *pool* de detritos e algumas espécies são xilófagas (Nelson *et al.* 1999; Covain e Fisch-Muller 2007). Possuem dimorfismo sexual e cuidado parental (Sabaj *et al.* 1999). Alguns cascudos possuem modificações no aparelho digestivo, que funcionam por vezes como órgão respiratório acessório, permitindo a esses peixes respirar ar e ficar fora d'água por um determinado período de tempo (Armbruster 1998).



Devido a sua morfologia altamente especializada, a família Loricariidae, descrita em 1815 por Rafinesque, tem sido reconhecida como um agrupamento monofilético (de Pinna 1998). No entanto, a classificação dos gêneros nas subfamílias não tem sido estável, as relações evolutivas e históricas interespecíficas e os mecanismos pelos quais elas diversificaram continuam a ser mal compreendidos, principalmente em nível de subfamília (Howes 1983; Schaefer 1987; Armbruster 2004).

1.3.1. Subfamília Loricariinae

Loricariinae, com aproximadamente 239 espécies alocadas em 34 gêneros, representa cerca de 30% das espécies de Loricariidae, é a segunda subfamília mais numerosa dentro desta família (Eschmeyer e Fong 2015). Seus representantes são popularmente conhecidos como "acarís-cachimbo" e "cascudos-chinelo", estão distribuídos desde as drenagens do rio da Prata, ao sul, até os rios costeiros do Caribe, ao norte. A grande maioria das espécies desse grupo é de pequeno a médio porte, variando de 4,9 centímetros como *Hartiella crassicauda* a 52,0 centímetros em *Spatuloricaria euacanthagenys* (Ferraris 2003).

Os Loricariíneos são de grande interesse econômico, pois, a grande maioria de suas espécies é comercializada como ornamentais (Ferraris 2003; Reis *et al.* 2003). Esta subfamília apresenta como sinapomorfias, um pedúnculo caudal longo e deprimido, placas laterais do corpo carenadas, formando duas quilhas longitudinais convergentes, focinho proeminente e ausência de nadadeira adiposa. Outra característica relevante para a caracterização dos loricariíneos é o dimorfismo sexual, expresso na hipertrofia de odontódeos, diferenças nos filamentos do lábio e nas estruturas dos dentes (Eigenmann e Eigenmann 1890; Covain e Fisch Muller 2007). Estes peixes não são grandes migradores, possuem hábitos sedentários e habitam preferencialmente o substrato orgânico e inorgânico de ambientes lóticos (corredeiras, rios, riachos) e ambientes lênticos (lagoas, lagos) com pouca profundidade. Sua alimentação inclui principalmente, algas, restos de vegetação e invertebrados aquáticos (Covain *et al.* 2008; Rapp Py-Daniel e Ohara 2014).

O estudo das relações de parentesco entre os gêneros de Loricariinae teve início com as análises morfológicas feitas por Isbrücker (1979). Este autor propôs a divisão dos loricariíneos em quatro tribos e oito subtribos: 1) Acestridiini, 2) Farlowellini, 3) Harttiini com as subtribos Harttiina e Metaloricarina e 4) Loricariini

5

Planiloricariina, Reganellina, com as subtribos Loricariina, Rineloricariina, Loricariichthyina e Hemiodontichthyina. Estudos posteriores também baseados em análises morfológicas incluíram a tribo Acestridiini dentro subfamília da Hypoptopomatinae e Farlowellini como subtribo de Harttiini (Schaefer 1991; Rapp Py-Daniel 1997, respectivamente). Covain e Fisch-Muller (2007) confirmaram parcialmente a divisão da subfamília em duas tribos, a Harttiini e a Loricariini com quatro grupos morfológicos: grupo Pseudohemiodon, grupo Loricaria, grupo Rineloricaria e grupo Loricariichthys. Uma filogenia baseada em dados moleculares (genes mitocondriais 12S e 16S) confirmou a divisão da subfamília Loricariinae em duas Linhagens, a Harttiini incluindo o único gênero Harttia e a Loricariini que foi dividida em duas subtribos Loricariina e Farlowellina (Covain et al. 2008).

Mesmo que os membros desta subfamília sejam morfologicamente bem caracterizados, a sistemática de Loricariinae permanece confusa e controversa, principalmente em relação a muitos de seus gêneros. Dos 34 gêneros descritos para a subfamília, 15 são monotípicos (*Aposturisoma, Dentectus, Reganela, Ricola*, etc.) e os gêneros com maior número de espécies e que apresentam maiores discordâncias na literatura são *Loricaria* (17 espécies), *Loricariichthys* (18 espécies), *Harttia* (23 espécies), *Farlowella* (29 espécies) e *Rineloricaria* (63 espécies). Destes, somente *Farlowella* e *Loricaria* passaram por revisões taxonômicas (Isbrücker 1981; Retzer e Page 1996; Covain 2011). *Farlowella* é o segundo gênero mais especioso da subfamília Loricariinae, atualmente com 29 espécies válidas (Tabela 1), incluindo as espécies mais recentes: *F. gianetii* e *F. mitoupibo* (Ballen *et al.* 2016a, b).

1.3.2. Gênero Farlowella

As espécies desse gênero são amplamente distribuídas nos rios da América do Sul (Amazonas, Orinoco, Paraná, Essequibo e rios litorâneos das Guianas); são espécies de pequeno porte, variando entre 10 a 26,5 centímetros (Ferraris 2003); possuem o corpo alongado, extremamente delgado, com focinho ósseo e filamentos caudais proeminentes, e por causa de sua forma e aparência amadeirada, são facilmente confundidos com galhos de árvores, daí serem chamados de "bagres-vara" ou "Peixes-galho" e devido à sua morfologia exótica são vendidos como peixes ornamentais (Berra 2001; Covain e Fisch-Muller 2007).

Os peixes-galho normalmente habitam águas de fluxo lento, ficando imóveis em substratos submersos, onde se camuflam. Esses peixes apresentam dieta

6

alimentar detritívora, característica importante na cadeia alimentar, pois participam do processo de remineralização em águas tropicais (Covain e Fisch-Muller 2007; García-Alzate *et al.* 2012). São de distribuição gregária e são sensíveis a alterações da disponibilidade de algas, sendo bons bioindicadores de qualidade da água (Sabino e Andrade 2003). Os indivíduos de *Farlowella* possuem dimorfismo sexual, que nos machos é caracterizado pela hipertrofia dos odontódeos no focinho ou cabeça e há também a existência de cuidado parental, na qual os machos protegem os ovos contra predadores (Covain e Fisch-Muller 2007).

A sistemática de *Farlowella* ainda não é bem resolvida e tem passado por diferentes agrupamentos ao longo de sua história. Este gênero foi inicialmente descrito como *Acestra* (Kner 1853), porém, este nome era pré-ocupado em Insecta, então *Acestra* foi substituído por *Farlowella* (Eigenmann e Eigenmann 1889). *Farlowella* foi categorizada por Isbrücker (1979) como uma tribo monogenérica dentro de Loricariinae, a tribo Farlowellini (37 espécies). Em 1983, Isbrücker e colaboradores, com base em dados morfológicos, incluíram o gênero *Aposturisoma* dentro de Farlowellini, formando assim um grupo monofilético.

Retzer e Page (1996) revisaram o gênero *Farlowella* e após análise de caracteres morfológicos afirmaram o monofiletismo do mesmo. Das 37 espécies analisadas (*sensu* Isbrücker 1979), os autores reconheceram 19 espécies como sendo válidas, 17 como sendo sinônimos e descreveram 6 novas espécies, compreendendo assim 25 espécies que foram organizadas em seis grupos de espécies: *acus, amazona, curtirostra, knerii, mariaelenae, nattereri* e um grupo de espécies de relação incerta (Tabela 1).

Rapp Py-Daniel (1997) redefine a tribo Farlowellini como subtribo dentro da tribo Harttiini. Nessa nova configuração, a subtribo Farlowellina forma um clado monofilético com os gêneros *Farlowella, Aposturisoma* e *Sturisoma*, sendo que, *Sturisoma* é irmão de um subclado formado por *Farlowella* e *Aposturisoma*, confirmando a afinidade entre esses dois gêneros. Montoya-Burgos *et al.* (1998), com base em marcadores mitocondriais, propuseram a primeira filogenia molecular para a família Loricariidae, na qual o autor confirma a posição de Farlowellini dentro de Harttiini e a relação estreita entre os gêneros *Farlowella* e *Sturisoma*.



Tabela 1. Lista de nomes válidos para as espécies de *Farlowella*, organizados em grupo de espécies. *Espécies que ocorrem na Amazônia Central.

Grupo Farlowella mariaelenae		
Farlowella mariaelenae	Martín Salazar 1964	
Grupo <i>Farlowella curtirostra</i>		
Farlowella curtirostra	Myers 1942	
Farlowella taphorni	Retzer e Page 1997	
Grupo <i>Farlowella knerii</i>		
Farlowella knerii	(Steindachner 1882)	
Farlowella schreitmuelleri*	Ahl 1937	
Grupo <i>Farlowella amazona</i>		
Farlowella amazona*	(Günther 1864)	
Farlowella henriquei	Miranda Ribeiro 1918	
Farlowella platorynchus*	Retzer e Page 1997	
Farlowella rugosa	Boeseman 1971	
Grupo <i>Farlowella acus</i>		
Farlowella acus	(Kner 1853)	
Farlowella colombiensis	Retzer e Page 1997	
Farlowella martini	Fernández-Yépez 1972	
Farlowella venezuelensis	Martín Salazar 1964	
Farlowella vittata	Myers 1942	
Farlowella yarigui	Ballen e Mojica 2014	
Farlowella mitoupibo	Ballen <i>et al</i> . 2016b	
Grupo <i>Farlowella nattereri</i>		
Farlowella nattereri*	Steindachner 1910	
Farlowella hasemani*	Eigenmann e Vance 1917	
Farlowella isbruckeri	Retzer e Page 1997	
Farlowella jauruensis	Eigenmann e Vance 1917	
Farlowella odontotumulus	Retzer e Page 1997	
Farlowella altocorpus	Retzer 2006	
Farlowella gianetii	Ballen <i>et al</i> . 2016a	
Espécies de relação incerta		
Farlowella oxyrryncha*	(Kner 1853)	
Farlowella gracilis	Regan 1904	
Farlowella smithi	Fowler 1913	
Farlowella hahni	Meinken 1937	
Farlowella reticulata	Boeseman 1971	
Farlowella paraguayensis	Retzer e Page 1997	

Covain e Fisch-Müller (2007), com base em morfologia externa, propõem uma nova filogenia para Loricariinae. *Farlowella* se mantem em Harttiini, porém, posicionado na base da árvore junto com *Metaloricaria*. Na filogenia molecular proposta para Loricariinae (Covain *et al.* 2008), *Farlowella* é inserido, junto com *Sturisoma, Sturisomatichthys e Lamontichthys*, na subtribo Farlowellina, dentro de Loricariini. Em Farlowellina dois subclados foram descritos: *Farlowella–Sturisoma* e *Farlowella–Sturisomatichthys*, demonstrando uma parafilia de *Farlowella*.



Embora controversa a posição de *Farlowella* dentro de Loricariinae, análises filogenéticas morfológicas e moleculares o colocam como grupo-irmão de *Sturisoma*. Este relacionamento é suportado pelo dimorfismo sexual e estratégias de reprodução, que são semelhantes em ambos os gêneros. Assim, para entender o relacionamento e a história evolutiva desses gêneros, estudos acerca dos mesmos ainda são necessários.

1.4. Estudos citogenéticos

1.4.1. Importância da citogenética de peixes

Estudos acerca da variabilidade genética e da evolução dos vertebrados vêm se intensificando nos últimos anos, tendo como um dos principais objetos de estudo os peixes, por ser uma das classes, dentre os vertebrados, mais diversa (Nelson *et al.* 2016). Como parte de tais estudos destaca-se o ramo da citogenética, que foca o estudo dos cromossomos (Guerra 1988). Estudos citogenéticos clássicos e moleculares vêm contribuindo para a compreensão da Taxonomia (Citotaxonomia), Sistemática (Citosistemática) e Evolução (cromossômica) dos peixes neotropicais desde a década de setenta (Almeida-Toledo 1998).

O número de cromossomos, as fórmulas cromossômicas, a localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva são características cariotípicas, que são consideradas caracteres importantes no entendimento da história evolutiva de grupos relacionados, e, também são importantes na identificação de espécies crípticas e/ou de taxonomia problemática (Almeida-Toledo 1998).

Arai (2011) catalogou 3.425 espécies de peixes com cariótipos descritos. O número diploide neste grupo variou de 2n=20 cromossomos em *Pterolebias longipinnis* (Scheel 1972) a 2n=134 cromossomos em *Corydoras aeneus* (Turner *et al.* 1992). Outras especificidades já foram observadas para os peixes neotropicais somente com análises cariotípicas, tais como: polimorfismos estruturais (rearranjos), numéricos (euploidias e aneuploidias) e cromossomos sexuais (Almeida-Toledo 1998; Garcia 2005). Sendo assim, a diversidade citogenética observada nesse grupo, até o momento, justifica o aumento das pesquisas envolvendo estes animais (Affonso 2000).



As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) são regiões cromossômicas que contém os genes responsáveis pela codificação do RNA ribossomal. A variação dessa região em peixes (RONs simples e múltiplas, RONs heteromórficas, RONs associadas à heterocromatina constitutiva e RONs ativas em cromossomos sexuais) tem sido utilizada como um marcador para tentar entender os processos que levaram à diferenciação de populações e espécies estreitamente relacionadas (Almeida-Toledo e Foresti 1985).

A Heterocromatina Constitutiva corresponde a regiões dos cromossomos altamente repetitivas, que se mantêm condensadas durante todo o ciclo celular e é tida por alguns autores como um estado reprimido ou inativo da cromatina. Tal região é encontrada preferencialmente em blocos centroméricos, teloméricos ou intersticiais. Heterocromatina associada às RONs e braços cromossômicos ou cromossomos inteiros totalmente heterocromáticos são algumas alterações do padrão da heterocromatina constitutiva encontradas em peixes. Alguns autores sugerem que essas alterações podem estar refletindo processos de diferenciação de populações e/ou espécies, ou na origem e evolução de cromossomos sexuais (Guerra 1988; Andreata 1991).

1.4.2. Citogenética molecular

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica que tem sido utilizada com frequência em citogenética. A FISH consiste na incorporação de uma sonda, composta por sequências específicas de nucleotídeos marcados com fluorescência, aos cromossomos mitóticos em análise. Várias sondas são utilizadas, e as de uso mais comum em peixes são as sondas de DNA repetitivo (Martins *et al.* 2004; Guerra 2012).

DNAs repetitivos são sequências de DNA de tamanhos variados, organizadas em tandem, dispersas ou repetidas milhares de vezes no genoma, podendo ter ou não função codificadora. Estudos acerca dessas sequências têm sido de grande relevância para a compreensão da evolução genômica de determinadas espécies, pois elas nos remetem a dados mais consistentes sobre a diversificação de cromossomos sexuais, origem de cromossomos Bs, bem como na detecção de homeologias cromossômicas existentes entre espécies relacionadas (Griffiths *et al.* 2008; Vicari *et al.* 2010; Blanco 2012).



As famílias multigênicas são sequências de DNA repetitivo que codificam moléculas importantes como os RNAs ribossômicos (Martins *et al.* 2004). Os DNAs ribossômicos 18S e 5S, mapeados por hibridização *in situ* fluorescente, têm sido amplamente usados como marcadores citogenéticos em peixes neotropicais, por contribuírem na elucidação de problemáticas taxonômicas, biogeográficas e filogenéticas (Bellafronte *et al.* 2005; Teixeira *et al.* 2009; Vicari *et al.* 2010; Ferreira *et al.* 2016).

Os telômeros são sequências de DNA repetitivo conservadas em eucariotos, localizadas principalmente na região terminal dos cromossomos, cuja finalidade é manter a integridade e estabilidade dos cromossomos. O mapeamento físico dessas sequências, por FISH, vem se mostrando um importante marcador citogenético, pois podem ou não detectar rearranjos cromossômicos recentes em peixes (Slijepcevic 1998; Blanco *et al.* 2013).

1.4.3. Citogenética de Loricariinae

Os estudos citogenéticos voltados para a subfamília Loricariinae tiveram início com Post em 1965, com análise de células haploides do gênero *Loricaria*. Desde então, apenas 40 das 239 espécies desta subfamília tiveram seu cariótipo descrito. Embora escassos, os dados citogenéticos indicam que Loricariinae é heterogênea e diversificada cromossomicamente (Artoni e Bertollo 2001; Arai 2011).

Uma grande variação do número diploide é observada para Loricariinae, tanto em nível intergenérico com 2n=36 cromossomos em *Rineloricaria* a 2n=74 cromossomos em *Sturisoma*, quanto em nível interespecífico com 2n=36 cromossomos em *Rineloricaria latirostris* a 2n=70 cromossomos em *R. strigilata, R. quadrensis e R. nigricauda* (Giuliano-Caetano 1998; Artoni e Bertollo 2001; Rodrigues 2010; Venturelli 2014). A fórmula cariotípica também é variável em Loricariinae. Giuliano-Caetano (1998) encontrou em *Rineloricaria latirostris*, de diferentes localidades, 2n=44 cromossomos, porém com fórmulas cariotípicas diferentes, com predominância de cromossomos subtelocêntrico/acrocêntricos.

Polimorfismos numéricos e estruturais foram observados em espécies de Loricariinae. Heteromorfismo em cromossomos homólogos como observado em *Loricariichthys anus*; sistema de cromossomo sexual do tipo simples ZZ/ZW em *Loricariichthys platymetopon* e do tipo múltiplo XX/XY₁Y₂ foi encontrado em *Harttia*



carvalhoi. A ocorrência de cromossomos supranumerários (Bs) foi observada em *Loricaria* e *Rineloricaria* (Scavone e Júlio Jr. 1995; Centofante *et al.* 2006; Maia *et al.* 2010).

As regiões organizadoras de nucléolo para os gêneros de Loricariinae estão localizadas, com maior frequência, na posição terminal dos braços curtos de um único par cromossômico, sendo sugerido como uma característica plesiomórfica para Siluriformes. Entretanto, em *Harttia*, as RONs foram localizadas em posição intersticial e algumas espécies de *Loricaria* e *Rineloricaria* apresentaram RONs múltiplas em posição intersticial e/ou terminal (Kavalco *et al.* 2005; Centofante *et al.* 2006; Blanco 2012).

A localização da heterocromatina constitutiva tem indicado diferentes padrões de distribuição em Loricariinae, principalmente para o gênero *Rineloricaria*, onde se observa padrão com poucos blocos heterocromáticos e padrão com blocos mais conspícuos e geralmente associados às RONs, distribuídos em vários pares de cromossomos (Giuliano-Caetano 1998; Venturelli 2014).

O mapeamento do DNAr 18S e 5S, por FISH, foi realizado em apenas 26 espécies de seis gêneros de Loricariinae, sendo *Rineloricaria* e *Harttia* os mais estudados. Os sinais com a aplicação da sonda DNAr 18S localizam-se, na maioria dos casos, na região terminal de um único par cromossômico. Entretanto, as espécies de *Harttia*, *Loricariichthys anus* e *Rineloricaria latirostris* apresentaram marcações simples, mas em posição intersticial. Já, *Loricaria cataphracta* e *R. lanceolata* apresentaram sítios simples e múltiplos nas posições terminais e/ou intersticiais dos pares cromossômicos (Rodrigues 2010; Blanco 2012; Rosa *et al.* 2012; Venturelli 2014).

A distribuição dos cístrons de DNAr 5S em algumas espécies de Loricariinae tem se mostrado muito diversa e, em alguns casos, em sintenia com os sítios de DNAr 18S. Tais características são diferentes dos demais grupos de peixes, que apresentam DNAr 5S localizado em dois pares de cromossomos e para os quais a não-sintenia parece ser um caráter basal (Martins e Galetti Jr. 2001; Wasko *et al* 2001; Almeida-Toledo *et al.* 2002). Kavalco *et al.* (2004a) localizaram em *Harttia loricariformis* marcações simples de DNAr 5S na posição terminal de um par cromossômico e em sintenia com os sítios de DNAr 18S. Venturelli (2014) analisou diferentes espécies de *Rineloricaria* e localizou marcações simples e múltiplas (até

12

16 sítios) na posição terminal de cromossomos subtelocêntrico/acrocêntricos. Sítios simples e múltiplos de DNAr 5S na posição intersticial dos cromossomos também foram observados em espécies de Loricariíneos (Centofante *et al.* 2006; Rodrigues 2010; Blanco 2012; Takagui *et al.* 2014).

Os dados obtidos pelo mapeamento das regiões teloméricas indicam a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) em espécies de Loricariinae. Blanco *et al.* (2013) encontraram quatro ITS em *Harttia torrenticola* e três ITS em *H. carvalhoi.* Porto *et al.* (2014b) observaram a presença de quatro ITS em diferentes cariomorfos de *Rineloricaria lanceolata.* Com base nestes resultados, os autores sugeriram que rearranjos do tipo fusão e fissão estiveram envolvidos na redução do número de cromossomos e na origem de cromossomos sexuais diferenciados.

Das 29 espécies descritas para o gênero *Farlowella*, somente *F. amazona*, de diferentes localidades, foi caracterizada citogeneticamente. Número diploide de 2n=58 cromossomos foi observado para todos os indivíduos de todos os locais analisados, número considerado apomórfico, uma vez que 2n=54 é o considerado basal para os loricariíneos. Entretanto, a fórmula cariotípica, localização da RON e a distribuição da heterocromatina variaram, sugerindo que rearranjos cromossômicos estão presentes na diferenciação específica deste gênero (Artoni e Bertollo 2001; Gindri 2009; Fernandes *et al.* 2012; 2015).

Análises de dados morfológicos e moleculares em espécies de *Farlowella* têm demonstrado confusão quanto à classificação taxonômica e sistemática desse gênero. Nesse contexto, a proposta do presente trabalho foi de uma caracterização citogenética clássica e molecular de espécies deste gênero, que ocorrem na bacia amazônica central.



2. Objetivos

2.1. Geral

Caracterizar citogeneticamente espécies de *Farlowella* que ocorrem na Amazônia Central e inferir sobre os mecanismos de evolução cromossômica do mesmo.

2.2. Específicos

- Determinar o número diploide e fórmula cariotípica, bem como o padrão de regiões organizadoras do nucléolo e da heterocromatina constitutiva de espécies do gênero *Farlowella* e se possível de diferentes localidades.
- ✓ Mapear sequências repetitivas de DNA ribossômico 18S e 5S a fim de encontrar possíveis marcadores espécie-específicos ou populacional para espécies de *Farlowella*.
- Mapear as regiões teloméricas dos cromossomos a fim de detectar possíveis rearranjos.
- ✓ Verificar se há variações citogenéticas intra e interespecíficas.



3. Material e Métodos

3.1. Material

Neste estudo, 28 exemplares de três espécies do gênero *Farlowella* foram analisados, citogeneticamente: *F*. cf. *amazona* (Figura 1a), *F*. *oxyrryncha* (Figura 1b) e *F*. *schreitmuelleri* (Figura 1c) e (Tabela 2).

Os indivíduos foram coletados com o uso de redes de arrasto e rapichés (autorização de coleta foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Licença permanente nº. 28095-1) e transportados vivos, em recipientes com sistema de aeração, para o Laboratório de Genética Animal do INPA, onde foi realizada a obtenção das suspensões celulares e de tecido muscular. Os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais pelo número do protocolo 079/2015-CEUA/INPA. Os animais foram eutanasiados, seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013).

(coordonadae googrameae). m		,.				
Espásio	Sexo)		Coordonadas	
Especie	Μ	F	?	LOCAI	Coordenadas	
Farlowella cf. amazona (Grupo amazona)	-	-	5	Barcelos, rio Negro	0°56'04.8''S 62°58'01.6''W	
Farlowella oxyrryncha (Gr. relação incerta)	6	3	-	Igarapé Sítio Agenor	2°45'01.9''S 60°01'42.1''W	
Farlowella schreitmuelleri (Grupo knerii)	7	1	6	Igarapé Jundiá	2°19'43.8"S 60°04'40.4"W	

Tabela 2. Espécies de *Farlowella* analisadas, número de indivíduos por sexo e local de coleta (coordenadas geográficas). **M** = macho; **F** = fêmea; **?** = sexo não identificado.

Os peixes foram numerados, seguindo caderno de registro do Laboratório de Genética Animal do INPA, posteriormente fixados em formol comercial 10% por 48 horas, lavados em água corrente por 12 horas e guardados em álcool 70% para posterior tombamento na coleção de Peixes do INPA. Para a confirmação do status de *Farlowella*, todos os indivíduos coletados foram verificados pela Dra. Lucia Helena Rapp Py-Daniel, especialista em Taxonomia e Sistemática de Peixes.





Figura 1. Espécies de *Farlowella* estudadas no presente trabalho. (a) vista dorsal, lateral e ventral de *F*. cf. *amazona*; (b) vista dorsal, lateral e ventral de *F*. *oxyrryncha*; (c) vista dorsal, lateral e ventral de *F*. *schreitmuelleri*.



3.2. Metodologia de Citogenética Clássica

3.2.1. Obtenção dos Cromossomos Mitóticos

Para estimular o aumento de células em divisão foi feita a indução de mitoses conforme técnica descrita por Oliveira *et al.* (1988), com algumas adaptações. Foi injetado, na cavidade abdominal, um lisado bacteriano - Broncho-Vaxom[®] (0,2g de lisado bacteriano + 2mL de água) na proporção de 1mL/100g de peso animal por 48 horas. Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizado o protocolo de Gold *et al.* (1990).

Após o período de estimulação, o animal foi eutanasiado com eugenol na proporção de 5mL para 12L de água. Foram retiradas porções do rim e transferidas para uma cubeta de vidro contendo de 2 a 10 mL de meio RPMI. Em seguida, o rim foi dissociado com uma seringa hipodérmica de vidro. Foram adicionadas de 3 a 4 gotas de Colchicina 0,0125%, ressuspendendo com movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma solução celular homogênea e foi deixada em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a solução celular foi transferida para um tubo do tipo Falcon, ressuspendida e centrifugada por 10 minutos a 900 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10mL de solução hipotônica de KCI 0,075M e incubado em estufa a 37 °C por 40 minutos. Terminado o período de hipotonização foi adicionado 1mL de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético glacial), a solução foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi diluído em 8mL de fixador Carnoy, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. Este passo se repetiu por mais 2 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1,5mL de fixador. A suspensão celular foi homogeneizada e acondicionada em tubos do tipo Ependorff em freezer a -20 °C.

3.2.2. Análise Cromossômica

Para a análise cromossômica foram gotejadas de duas a três gotas da suspensão celular sobre uma lâmina de vidro limpa e coberta por uma lâmina d'água a uma temperatura de 60 °C. Logo em seguida a lâmina foi corada com Giemsa 10% em tampão fosfato (pH=6,8) por 10 minutos.



3.2.3. Detecção da Heterocromatina Constitutiva

Para determinar o padrão de heterocromatina constitutiva (banda C) foi utilizada a metodologia descrita por Sumner (1972), que consistiu em tratar as lâminas, contendo a suspensão celular, em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, a 37 °C, durante 2 minutos e depois lavada com água destilada. Em seguida, a lâmina foi incubada em solução de hidróxido de Bário (Ba(OH)₂.8H₂O) a 5%, recém preparada e filtrada, a 42 °C, durante 50 segundos e para interromper a ação do hidróxido de bário, a lâmina foi lavada brevemente em ácido clorídrico 0,2N e depois lavada com água destilada. Em seguida, a lâmina foi incubada em solução salina 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trisódico 0,06M em pH 6,8), a 60 °C, durante 40 minutos e foi lavada com água destilada. Depois de seca, a lâmina foi corada com lodeto de propídeo (1µl de iodeto + 20µl de Vectashield[®]) e coberta com uma lamínula para espalhar o iodeto.

3.2.4. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo

Para determinar o padrão da região organizadora de nucléolo (RON) foi utilizado o protocolo de Howell e Black (1980), que consistiu em colocar sobre uma lâmina, contendo a preparação cromossômica, três gotas de solução de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1mL para cada 100mL de solução); sobre cada gota de gelatina foram colocadas duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%. As soluções foram misturadas delicadamente e cobertas com uma lamínula. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 60 °C por 5 a 7 minutos ou o tempo necessário para que a lâmina adquirisse uma coloração amarelada ou marrom escura. A lamínula foi retirada com um jato de água destilada e a lâmina lavada e deixada secar ao ar.

3.3. Metodologia de Citogenética Molecular

3.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir do tecido muscular de *Farlowella* cf. *amazona*, utilizando o protocolo de extração de DNA – Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Aproximadamente 20mg de tecido muscular foi macerado, com auxílio de tesoura, dentro de um tubo estéril de 1,5mL do tipo Ependorff. Foram adicionados 300µL de EDTA/Nuclei Lysis Solution (este mix foi preparado usando 60µL de EDTA



+ 250μL de Nuclei Lysis Solution e colocado em geladeira por 10 minutos, até ficar turvo) e 10μL de Proteinase K (10ng/μL). O conteúdo do tubo foi homogeneizado e deixado a 55 °C por cerca de 2 horas ou até o tecido ser totalmente dissolvido. Em seguida, foram adicionados 5μL de RNAse, misturado cuidadosamente, por inversão, por alguns minutos e deixado em estufa a 37 °C durante 30 minutos (este passo é opcional). Em seguida, foram adicionados 100μL de Protein Precipitation Solution, vortexado até a solução ficar espumante (aproximadamente 20 segundos) e colocado em freezer por 5 minutos. Posteriormente, o tubo foi colocado em centrifuga a 13000 rpm durante 8 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o *pellet* descartado.

Então foram adicionados 300µL de isopropanol gelado, homogeneizado por inversão e centrifugado a 13000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado, com o auxílio de uma pipeta, e foram adicionados 300µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 13000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o *pellet* foi colocado para secar a 37 °C por 15 minutos. Por fim, foram adicionados 50µL de DNA Rehydrate Solution e armazenado em freezer.

Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi quantificado por comparação com marcador de concentração conhecida, em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% e corado com GelRed Acid Gel Stain Biotium (1:500). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador *Easy Doc 100* (BioAgency). As quantificações foram feitas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.3.2. Preparação das sondas de DNA ribossômico 18S e 5S

A amplificação do DNAr 18S e 5S dos indivíduos amostrados foi realizada a partir do DNA celular total, previamente isolado, sendo a amplificação realizada através da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction,* Saiki *et al.* 1988), utilizando os *primers* 18S F(5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3') e R(5'-CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010) e os *primers* 5S F(5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3') e R(5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC-3') (Martins e Galetti Jr. 1999).



Cada reação de PCR teve um volume final de 25 µl, contendo 1 µl de DNA molde [100ng], 1µl do *primer* F, 1µl do *primer* R, 12,5µl Go Taq e 9,5µl de água destilada. Os ciclos de amplificação para o DNAr 18S e 5S foram de 1 ciclo de 2 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, 1minuto e 30 segundos a 72 °C e 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C. Em seguida, o produto final da PCR foi quantificado e armazenado em freezer a -20 °C.

3.3.3. Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para a detecção de sequências teloméricas foi amplificada via PCR. Foram usados os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.* 1991) com os seguintes parâmetros: 1µl do *primer* F, 1µl do *primer* R, 12,5µl de Go Taq e 9,5µl de água destilada com um volume final de 24µl.

Os ciclos de amplificação para a obtenção da sonda telomérica foram de 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C; 12 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 45 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C e 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C e 30 segundos a 60 °C. Em seguida, o produto final da PCR foi quantificado e armazenado em freezer a -20 °C.

3.3.4. Marcação das sondas

As Sondas foram marcadas seguindo o método de Nick Translation, utilizando o Kit Dig-Nick™ Translation Mix para a marcação das sondas em vermelho e o Kit Biotin-Nick™ Translation Mix para a marcação das sondas em verde.

Foram colocados em um tubo do tipo eppendorf de 0,2 ml: 5µl de DNA obtido na PCR, 4µl de mix do kit e 11µl de água destilada (volumes para 8 lâminas com DNA a 300ng). Foi incubada em termociclador a 16 °C por 45 minutos, 65 °C por 10 minutos e posteriormente a sonda marcada foi armazenada em freezer -20 °C.

3.3.5. FISH - Hibridização in situ fluorescente (com duas sondas)

Para a detecção das sondas (18S, 5S e telomérica) foi realizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações.

Preparação das lâminas:

As lâminas contendo a suspensão celular foram lavadas durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente e posteriormente desidratadas em série alcoólica de etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada.



<u>Fixação</u>:

As lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1x/50nM de cloreto de magnésio durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas durante 5 minutos em PBS 1x em temperatura ambiente, novamente desidratada em série alcoólica de etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada e deixadas secar ao ar.

Pré-hibridização:

O material contido na lâmina foi desnaturado em formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos, desidratado em série alcoólica de etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada e deixadas secar ao ar.

Solução de hibridização:

Em um tubo do tipo eppendorf foram adicionados 50µl de formamida 100%, 20µl de sulfato de dextrano 50%, 10µl de 20xSSC, 5µl de sonda 1 Roche, 5µl de sonda 2 Roche e 10µl de água destilada (volume total para 2 lâminas). A sonda foi desnaturada em banho seco a 99 °C por 10 minutos e transferida imediatamente ao gelo.

Hibridização:

Sobre uma lamínula limpa foram colocados 40µl da solução de hibridização e inverteu-se a lâmina seca sobre a lamínula e deixadas com o material voltado para baixo em câmara úmida a 37 °C *overnight* (14 horas).

Lavagens:

Após o período de hibridização, as lâminas foram lavadas em formamida 15 % a 42ºC durante 10minutos e posteriormente lavadas em solução de Tween 0,5 % durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Detecção do Sinal:

Para a detecção do sinal as lâminas foram incubadas em tampão NFDM por 15 minutos e lavadas duas vezes (5 minutos cada) em solução de Tween 0,5 % em temperatura ambiente.



Amplificação do Sinal:

Sobre uma lamínula foram colocados 100µl do mix de amplificação (20µL de anti-digoxigenina e 100µL de estreptavidina/NFDM (2 µL de estreptavidina + 998 µL de NFDM). Inverteu-se a lâmina sobre a lamínula e incubadas em câmara úmida e escura a 37 °C durante 60 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes (5 minutos cada) em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente e desidratadas em série alcoólica de etanol gelado (70%, 85% e 100%), por 5 minutos cada e deixadas secar ao ar.

Montagem das lâminas:

Sobre cada lâmina foi colocado 20µl de uma solução contendo 1µl de DAPI diluído em 20µl de Vectashield[®], coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro.

3.4. Análise Cariotípica

As metáfases foram fotografadas em microscópio óptico com câmera digital e os cariótipos foram montados, utilizando o programa Adobe Photoshop CS3, onde os cromossomos metafásicos mitóticos foram recortados, emparelhados, medidos no programa ImageJ e colocados em ordem decrescente de tamanho, separados por grupos. A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a posição do centrômero segundo Levan *et al.* (1964) e classificados com base no índice de relação de braços (RB= comprimento do braço maior/comprimento do braço menor), podendo ser metacêntricos (RB= 1,0-1,7), submetacêntricos (RB= 1,71-3,0), subtelocêntricos (RB= 3,01-7,0) e acrocêntricos (RB= 7,00). Na determinação do número de braços (NF) foram considerados os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como tendo dois braços e os acrocêntricos como tendo apenas um braço.



4. Resultados

As três espécies do gênero *Farlowella* apresentaram número diploide de 58 cromossomos, porém as fórmulas cariotípicas, o número fundamental, a distribuição da heterocromatina e a localização da RONs e dos cístrons de DNA ribossômico 18S e 5S foram espécie-específicos.

4.1. Farlowella cf. amazona

Os espécimes de *Farlowella* cf. *amazona* têm o cariótipo formado por 14m+30sm+14st e número fundamental (NF) igual a 116 braços (Figura 2a). Desta espécie não foi possível identificar o sexo dos exemplares, porém, não foram observados cromossomos diferenciados, que pudessem evidenciar um sistema de cromossomos sexuais entre os indivíduos analisados. O primeiro par cromossômico tem uma constrição secundária intersticial no braço longo, com heteromorfismo de tamanho entre seus homólogos.

A heterocromatina constitutiva está distribuída preferencialmente na região centromérica da maioria dos cromossomos do complemento. Entretanto, alguns pares cromossômicos apresentaram bandeamento heterocromático diferenciado, uns mais evidentes que outros. Os braços longos do par cromossômico 1 e os braços curtos do par cromossômico 20 mostraram-se praticamente todo heterocromático; os pares cromossômicos 3, 4, 5, 6 e 23 apresentaram blocos pericentroméricos mais evidentes e os pares cromossômicos 13, 21, 26, 27 e 28 apresentaram blocos biteloméricos (Figura 2b).

A região organizadora de nucléolo (RON) detectada com a técnica de impregnação por Nitrato de Prata mostrou-se ativa em apenas um par cromossômico, na região intersticial dos braços longos do par cromossômico 1 (metacêntrico), a qual foi coincidente com a constrição secundária e foi positiva para banda C, evidenciando assim, um sistema de RON simples (Figura 2c). A Hibridização *in situ* fluorescente com a sonda DNAr 18S foi coincidente com a RON (Figura 2d).

A hibridização com a sonda DNAr 5S evidenciou marcação apenas nos braços curtos do par submetacêntrico 20, o qual parece ser totalmente heterocromático (Figura 2e).




Figura 2. Cariótipo de *Farlowella* cf. *amazona*. (a) Coloração convencional, Giemsa; (b) bandeamento da heterocromatina constitutiva; (c) par cromossômico nucleolar por Ag; (d) par cromossômico nucleolar por FISH - DNAr 18S; (e) par cromossômico possuidor do sitio de DNAr 5S. Barra = 10 µl.



A hibridização com a sonda telomérica marcou as regiões terminais de todos os cromossomos, evidenciando um acúmulo na porção terminal dos braços longos dos pares 16, 19, 21, 22, 26 e 27, entretanto, nenhuma sequência telomérica intersticial (ITS) foi observada (figura 5a).

4.2. Farlowella oxyrryncha

Os espécimes de *Farlowella oxyrryncha* tem o cariótipo formado por 12m+22sm+18st+6a (Figura 3a) e número fundamental igual a 110 braços. Em 21 exemplares analisados de *F. oxyrryncha* (11 machos e 10 fêmeas) foi observada uma diferença no par cromossômico 27 (possuidor da constrição secundária) entre machos e fêmeas, o que acreditamos tratar-se de cromossomos sexuais diferenciados do tipo XX/XY (Figura 3b).

Esta espécie apresentou uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva. Todos os pares apresentaram blocos heterocromáticos na região centromérica, com exceção dos pares metacêntricos 4 e 6 que não apresentaram nenhuma marcação. Os pares 2, 10, 28 e 29 apresentaram marcações biteloméricas; o par 3 apresentou marcação na região telomérica do braço longo e o par 14 na região telomérica do braço curto; os pares 8, 18 e 25 apresentaram marcações intersticiais nos braços longos; os pares 10, 12, 13, 19 e 20 apresentaram marcações pericentromérica e proximais nos braços longos e os pares 19 e 23 apresentaram o braço curto inteiramente heterocromático (Figura 3c).

O heteromorfismo do par 27 é mais evidente, quando é analisado após a técnica de bandeamento C, pois este par apresentou dois grandes blocos heterocromáticos, um que compreende cerca de 50% do braço longo e que coincide com a constrição secundária, presente nos dois homólogos de machos e fêmeas; o outro bloco na região pericentromérica presente nos dois homólogos da fêmea e ausente em um dos homólogos do macho (Figura 3c-d). A região organizadora de nucléolo foi observada somente no par 27 e também coincidente com a constrição secundária (Figura 3e).





Figura 3. Cariótipo de *Farlowella oxyrryncha*. (♀) Fêmea. (♂) Macho. (a-b) Coloração convencional, Giemsa; (cd) bandeamento C da heterocromatina constitutiva; (e) par cromossômico nucleolar por Ag; (f) FISH com sonda DNAr 18S; (g) par cromossômico possuidor do sitio de DNAr 5S. Barra: 10 µl.



A FISH com a sonda DNAr 18S foi coincidente com a RON (Figura 3f). A sonda de DNA ribossômico 5S hibridizou em apenas um par cromossômico na região centromérica do par 26 (Figura 3g), coincidentes com blocos heterocromáticos.

A hibridização com sondas teloméricas evidenciou marcações terminais em todos os cromossomos e cinco pares cromossômicos com ITS (8, 14, 18, 19 e 27), todos, com exceção do par 14, associados a blocos de heterocromatina (Figura 5b). O par acrocêntrico 27 apresentou 4 variações da ITS (Figura 5c).

4.3. Farlowella schreitmuelleri

Farlowella schreitmuelleri tem o cariótipo formado por 10m+30m+14st+4a e número fundamental igual a 112 braços (Figura 4a). Nesta espécie não foram observados cromossomos sexuais diferenciados. Uma constrição secundária foi observada nos braços longos do par acrocêntrico 28 (Figura 4a).

Esta espécie apresentou uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva, em sua maioria, localizada na região centromérica dos cromossomos e, em alguns pares cromossômicos esse marcador foi bem mais evidente. Nos pares 7, 9, 14, 22 e 23 foram observados blocos heterocromáticos na região intersticial dos braços longos; nos pares 2, 10, 13, 15 e 26 blocos somente na região pericentromérica; enquanto que nos pares 8, 24, 25 e 28 foram observados blocos conspícuos tanto nas regiões pericentromérica quanto na região telomérica dos braços longos, sendo que no par 28, coincide com a constrição secundária. Os pares cromossômicos 5, 19 e 27 apresentaram o braço curto totalmente heterocromático e o par 16 somente um de seus homólogos apresentou heterocromatina (Figura 4b).

A RON foi simples, evidenciada na região terminal dos braços longos do par cromossômico 28, a qual foi coincidente com a constrição secundária (Figura 4c).

Os sítios de DNA ribossômico 18S também foram observados no par 28, confirmando assim, o número e a posição da RON ativa no conjunto cromossômico (figura 4d).

Sítios múltiplos de DNAr 5S foram encontrados nos pares 16 (em apenas um de seus homólogos) e no par subtelocêntrico 26, os quais foram positivos para banda C (Figura 4e).





Figura 4. Cariótipo de *Farlowella schreitmuelleri*. (a) Coloração convencional, Giemsa; (b) bandeamento da heterocromatina constitutiva; (c) par cromossômico nucleolar; (d) par cromossômico possuidor do sítio de DNAr 18S; (e) pares cromossômicos possuidores dos sítios de DNAr 5S. Barra 10 µl.



A hibridização com sondas teloméricas evidenciaram marcações terminais em todos cromossomos e ITS's nos pares cromossômicos 7, 14, 25 e 28, todos coincidentes com blocos de heterocromatina. No par 28 a ITS foi observada em apenas um de seus homólogos (Figura 5d).

Na tabela 3 temos um resumo dos resultados obtidos para as três espécies de *Farlowella* analisadas no presente estudo e o das espécies de Farlowella disponíveis na literatura.

Tabela 3. Dados citogenéticos para as espécies de *Farlowella*. **2n**= Número diploide; **m**=metacêntrico; **sm**=submetacêntrico; **st**=subtelocêntrico; **a**=acrocêntrico; **NF**=Número Fundamental; **RON**=Região Organizadora de Nucléolo; **DNAr** =DNA ribossômico; **cf**=a confirmar; **ITS**=Sequência telomérica intersticial; **Ig**.=Igarapé.

Ecnócio	Localidade	2n -	F. Cariotípica			NE	DON	DNAr		ITC	DEE	
Especie			m	sm	st	а		RUN -	18S	5S	115	KEF.
Farlowella amazona	Rio Taquari-MS	58	18	20	12	8	108	Pares 26 e 27	-	-	-	1
	Rio Iguatemi-MS	58	6	38	8	6	110	Par 27	-	-	-	2
	Rio Iguatemi-MS	58	12	30	10	6	110	Par 27	-	-	-	3
Farlowella cf. amazona	Barcelos-AM	58	14	30	14	-	116	Par 1	Par 1	Par 20	-	4
Farlowella oxyrryncha	Ig. Sítio Agenor - AM	58	12	22	18	6	110	Par 27	Par 27	Par 26	Pares 8, 14, 18, 19 e 27	4
Farlowella schreitmuelleri	lg. Jundiaí - AM	58	10	30	14	4	112	Par 28	Par 28	Pares 16 e 26	Pares 7,14, 27 e 28	4

Gindri 2009 (1), Fernandes et al. 2012 (2), Fernandes et al. 2015 (3), Presente estudo (4).





Figura 5. Mapeamento das regiões teloméricas de *Farlowella*. (a) Cariótipo de *F.* cf. *amazona*; (b) cariótipo de *F. oxyrryncha*; (c) variação de ITS no par 27 de *F. oxyrryncha*; (d) cariótipo de *F. schreitmuelleri*. Barra 10 µl.



5.1. Diversidade cariotípica em Loricariinae, com ênfase no gênero *Farlowella*

Os resultados do presente estudo e os disponíveis na literatura demonstram uma relativa estabilidade do número diploide em 2n=58 cromossomos para as espécies de *Farlowella* (Gindri 2009; Fernandes *et al.* 2012; 2015; presente estudo). Em Loricariinae, subfamília na qual *Farlowella* está inserido, tem três outros gêneros, nos quais suas espécies também apresentam o complemento cariotípico com 58 cromossomos: *Brochiloricaria*, *Harttia* e *Rineloricaria* (Michele *et al.* 1977; Alves *et al.* 2003; Rodrigues 2010; Blanco 2012; Blanco *et al.* 2017).

Artoni e Bertollo (2001) sugerem que o cariótipo ancestral de Loricariinae seja de 54 cromossomos. Entretanto, nesta subfamília, este número modal é raro, sendo descrito apenas para espécies do gênero *Loricariichthys* (Fenocchio 1993; Scavone e Júlio Jr. 1995; Carneiro *et al.* 1998; Roncati *et al.* 1999; Maia 2008; Rodrigues 2010; Takagui *et al.* 2014). Mais recentemente, num estudo citogenético em sete espécies de *Harttia*, Blanco *et al.* (2017) propuseram que o cariótipo ancestral para esse gênero seria 2n=58 cromossomos, hipótese que pode ser perfeitamente aplicada ao gênero *Farlowella.*

Embora o número diploide para as espécies de *Farlowella* seja um caráter conservado (2n=58), as fórmulas cariotípicas são diversas tanto intra como interespecificamente. Por exemplo, para *Farlowella amazona* (Günther 1864) quatro fórmulas cariotípicas já foram descritas, sendo três para a região Centro-Oeste: (18m+20sm+12st+8a) do córrego do Ribeirão, rio Taquari – MS (Gindri 2009); (6m+38sm+8st+6a) do córrego Água Boa, rio Iguatemi – MS (Fernandes *et al.* 2012); (12m+30sm+10st+6a) do Córrego Dourado, rio Iguatemi – MS (Fernandes *et al.* 2015) e uma descrição para a região norte (14m+30sm+14sta), igarapé próximo ao município de Barcelos, rio Negro – AM (presente estudo). Esta última, classificada como *F.* cf. *amazona*, diferencia-se das descritas para a região centro-oeste principalmente devido à ausência de cromossomos do tipo acrocêntrico e por apresentar a RON num par metacêntrico (par 1). Esta variabilidade cariotípica deixa



evidente a presença de rearranjos cromossômicos, sugerindo que *F. amazona* não se trata de uma espécie, mas de um complexo de espécies.

Loricariidae tem como característica uma grande diversidade cariotípica, sendo que esta família de peixes é tida como uma das mais complexas da ictiofauna neotropical (Artoni e Bertollo 1996; Alves *et al.* 2003). Essa variação cromossômica é tanto numérica como estrutural. Exemplo dessa variação é visto em *Rineloricaria*, um dos gêneros que possui mais estudos citogenéticos, dentro desta subfamília (Giuliano-Caetano 1998; Alves *et al.* 2003; Mendes-Neto 2008; Maia *et al.* 2010; Rodrigues 2010; Porto *et al.* 2011; Rosa *et al.* 2012; Porto *et al.* 2014b; Venturelli 2014). Giuliano-Caetano (1998), analisando três populações de *Rineloricaria latirostris*, encontrou 20 fórmulas cariotípicas em 11 números diploides. Rosa *et al.* (2012), analisando duas populações de *Rineloricaria lima* encontraram oito fórmulas cariotípicas em quatro números diploides. Os autores atribuem esta diversidade cariotípica a rearranjos cromossômicos, principalmente por eventos de fusão, fissão, inversões e deleções.

A diversidade cariotípica observada em *Farlowella amazona* pode estar relacionada aos seus hábitos ecológicos. Em geral, as espécies desse gênero são de baixa vagilidade e habitam porções específicas dos rios, o que pode levar à formação de pequenas populações isoladas, causando diferenciações independentes em seu conjunto gênico, levando à especiação. Tal fato vem sendo observado em outros grupos de Siluriformes, que apresentam inúmeras variantes, decorrentes de rearranjos cromossômicos em pequenas populações intercruzantes (Ferreira *et al.* em preparação).

Farlowella oxyrryncha e *F. schreitmuelleri* também apresentaram fórmulas cariotípicas distintas, estas por sua vez, se assemelham com o padrão encontrado para as diferentes populações de *F. amazona* da região centro-oeste, pois apresentam cromossomos acrocêntricos e a constrição secundária localiza-se em um desses pares.

A presença de um par de acrocêntricos com constrição secundária é notada também em espécies de Harttia (H. longipinna, H. gracilis, H. punctata, H. torrenticola e H. carvalhoi) (Blanco et al. 2017), que se assemelha ao padrão encontrado nas populações de *F. amazona* da região centro-oeste e de *F.*



oxyrryncha e F. schreitmuelleri. Harttia kronei, por sua vez, apresenta um par cromossômico metacêntrico carreando a constrição secundária (Blanco *et al.* 2017), que, de certa forma, se assemelha ao primeiro par metacêntrico de Farlowella cf. *amazona* (presente estudo).

Alguns autores colocam *Farlowella* como gênero próximo a *Sturisoma* (Rapp Py-Daniel 1997; Montoya-Burgos *et al.* 1998; Covain e Fisch-Müller 2007; Covain *et al.* 2008; 2016), entretanto, os dados citogenéticos (numéricos e estruturais) demonstram uma similaridade muito mais acentuada de *Farlowella* com *Harttia* spp., uma vez que, *Sturisoma* spp. apresenta número diploide alto (2n=66 e 2n=74), com predominância de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos (Artoni e Bertollo 2001; Gindri 2009).

A partir dos números diploide e fundamental (NF) (número de braços) é possível deduzir a constituição cariotípica e o mecanismo de evolução de determinados grupos (Kasahara 2009). Os cromossomos dos tipos metacêntrico, submetacêntrico e subtelocêntrico possuem dois braços e os acrocêntricos um braço. Tendo em vista isso, os valores de NF de F. cf. amazona (116), de F. oxyrryncha (112) e de F. schreitmuelleri (110) nos levam a pensar que a diversidade cariotípica observada nesse gênero é causada por inversões pericêntricas, aquelas que mudam o tipo cromossômico, mas não o número diploide. O primeiro par metacêntrico de F. cf. amazona teria sofrido uma inversão pericêntrica (envolve o centrômero) e se tornado um acrocêntrico, correspondendo ao primeiro par acrocêntrico de F. oxyrryncha e F. schreitmuelleri. Essa proposta de rearranjo cromossômico pode ser sustentada pela presença da constrição secundária, e de outros marcadores (RON, Heterocromatina Constitutiva e o DNA ribossômico 18S), que estão nesses pares cromossômicos, ou seja, podemos dizer que são cromossomos homeólogos. Entretanto, o contrário também pode ser verdadeiro, ou seja, um acrocêntrico é que teria sofrido a inversão.

Região organizadora do nucléolo localizada em apenas um par cromossômico (RON simples) tem sido relatada como a condição mais comum em peixes (Kasahara 2009; Artoni e Bertollo 1996), sendo que para os loricariídeos, a presença desses sítios em posição terminal dos braços longos de um par metacêntrico é a condição considerada ancestral (Artoni 1996). Entretanto, divergências a este padrão, principalmente quanto à localização desses sítios nos cromossomos, são



frequentemente observadas nesta família (Souza 2003; Mariotto *et al.* 2004; Alves *et al.* 2005; Kavalco *et al.* 2005; de Oliveira 2006; Blanco *et al.* 2017).

Da Silva *et al.* (2014) observaram cinco padrões distintos de RON numa população de *Hypancistrus* aff. *debilittera*. Em dois, dos cinco, foram evidenciadas marcações terminais e intersticiais e em um desses dois padrões, a marcação intersticial foi evidenciada em apenas um dos homólogos. Os autores sugeriram que inversões paracêntricas estariam ocasionando a diferenciação cromossômica nesses indivíduos. Em outro estudo, Porto *et al.* (2014a) também observaram cinco padrões de RON em *Loricaria cataphracta* de uma mesma população, sendo evidenciados sítios em posições centromérica, pericentromérica e intersticial do braço longo ou ocupando o braço curto inteiro. Neste caso, os autores sugeriram que a variação desse marcador seria causada por elementos transponíveis móveis.

Para as espécies de Farlowella a RON foi simples, tanto nas do presente estudo como em duas populações de Farlowella amazona de diferentes tributários do rio Iguatemi – MS (Fernandes et al. 2012; 2015). RON múltipla foi observada em uma população de F. amazona do Córrego da Onça, rio Taquari – MS (Gindri 2009). A posição desse marcador diverge do considerado ancestral para o grupo. Em F. cf. amazona a RON foi evidenciada no braço longo de um par metacêntrico, ocupando quase todo o braço, enquanto que em F. oxyrryncha, F. schreitmuelleri e nas disponíveis na literatura, a RON foi evidenciada na região terminal do braço longo de um par acrocêntrico, dados que confirmam a grande similaridade entre esses pares cromossômicos e a presença de uma inversão pericêntrica, causando a diversificação do par cromossômico nucleolar em espécies de Farlowella. Entretanto, outras possibilidades não são descartadas, uma vez que, os dados citogenéticos disponíveis para as espécies desse gênero são escassos. Ainda, as espécies de Farlowella apresentam um heteromorfismo quanto ao tamanho das RONs e estas são positivas para banda C. Isto pode ser explicado por uma duplicação em tandem da sequência de DNA de um dos homólogos. A presença de heterocromatina constitutiva entre os genes ribossômicos pode causar um crossing-over desigual na meiose, levando a um heteromorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos (Gold 1984; Sola et al. 1988).

Os genes ribossômicos (45S e 5S) são importantes marcadores citotaxonômicos e evolutivos, pois auxiliam na compreensão da diversidade

34

cromossômica dos organismos (Bellafronte *et al.* 2005; Teixeira *et al.* 2009; Vicari *et al.* 2010). A localização desses genes em um mesmo par cromossômico (sintenia) é sugerida como uma condição plesiomórfica para os Loricariidae (Ziemniczak *et al.* 2012) e o mapeamento físico cromossômico dessas sequências nesta família tem se mostrado um excelente marcador espécie-específico (Rosa *et al.* 2012; Traldi *et al.* 2013; da Silva *et al.* 2014; Venturelli 2014; Favarato *et al.* 2016; Blanco *et al.* 2017).

Para as espécies de *Farlowella*, analisadas no presente estudo, o mapeamento dos genes ribossômicos 5S e 18S mostrou que os mesmos estão em pares cromossômicos diferentes. Os sítios de DNAr 5S foram observados em cromossomos submetacêntricos e/ou subtelocêntricos, enquanto que os sítios de DNAr 18S foram observados em cromossomos metacêntricos ou acrocêntricos, não havendo sintenia de tais sequências em nenhuma das espécies analisadas. A não sintenia dos genes ribossômicos, mais frequente em peixes (Lui *et al.* 2009), é tida, por alguns autores, como uma vantagem evolutiva, pois evita possíveis rearranjos desfavoráveis nessas regiões, uma vez que, a conversão genética e mecanismos, como *crossing over* desigual, frequentemente ocorrem em sítios de DNAr, quando em sintenia (Dover 1986; Martins e Galetti Jr. 1999).

Em Loricariinae, a sintenia entre os genes ribossômicos 5S e 18S foi evidenciada em apenas três espécies: *Harttia carvalhoi, H. loricariformis* e *Loricariichthys platymetopon* (Kavalco *et al.* 2004a; 2005; Centofante *et al.* 2006; Rodrigues 2010; Blanco *et al.* 2013; 2017). Considerando a sintenia de tais regiões uma característica plesiomórfica, Blanco *et al.* (2017) propuseram que *H. carvalhoi* e *H. loricariformis* estariam mantendo a condição basal em relação a esses genes. Em outro estudo, Rodrigues (2010) atribuiu essa sintenia como uma autapormofia, que possivelmente teria surgido de maneira isolada nesses dois gêneros, uma vez que as espécies de *Harttia* são consideradas basais e estão distantes filogeneticamente das espécies de *Loricariichthys*. Entretanto, os dados citogenéticos moleculares obtidos para os Loricariíneos ainda são escassos e estudos mais aprofundados são necessários para inferir com acurácia sobre os processos carioevolutivos do grupo.

Nas espécies analisadas no presente estudo, os sítios hibridizados com sondas de DNAr 18S se apresentaram em um único par cromossômico e coincidentes com a RON, reforçando a ideia de homeologia entre esses pares cromossômicos e que, inversões pericêntrica e/ou paracêntrica devem ter



contribuindo para a diversificação da posição deste par no cariótipo de Farlowella spp.

Em Loricariinae, a maioria dos estudos citogenéticos voltados para o mapeamento físico do gene ribossômico 18S tem demonstrado a presença de um único par cromossômico como portador dessa sequência (Tabela 4), sendo sugerido aqui, como um caráter plesiomórfico para o grupo, uma vez que todas as espécies de *Harttia* analisadas, gênero basal dentro da subfamília, apresentam apenas um par com DNAr 18S (Kavalco *et al.* 2005; Centofante *et al.* 2006; Rodrigues 2010; Blanco *et al.* 2012; 2013; 2014; 2017). Sítios múltiplos de DNAr 18S foram evidenciados em três espécies de *Rineloricaria* e em uma espécie de *Loricaria* (Porto *et al.* 2011; Porto *et al.* 2014a; b; Primo *et al.* 2016).

Enquanto o gene ribossômico 18S tem demonstrado uma relativa conservação numérica em Loricariinae, os cístrons de DNAr 5S têm evidenciado uma maior variabilidade numérica e de localização (Tabela 4). A tribo Harttiini tem se mostrado conservada com relação a este gene, variando de dois a quatro sítios, enquanto que os representantes da tribo Loricariini têm demostrado uma maior variabilidade dessa sequência, possuindo até 16 sítios.

Farlowella cf. *amazona* e *F. oxyrryncha* tiveram os sítios de DNAr 5S observados em apenas um par de cromossomos subtelocêntricos (pares 20 e 26, respectivamente), enquanto *F. schreitmuelleri* apresentou sítios múltiplos desse gene, sendo um sítio localizado no par submetacêntrico 16 (em apenas um dos homólogos) e o outro no par subtelocêntrico 26. A ausência do sítio de DNAr 5S em um dos homólogos do par 16 de *F. schreitmuelleri* pode ser devido à sensibilidade limitada da técnica de FISH, que não detecta sequências muito pequenas (Schwarzacher e Heslop-Harrison 2000) ou mesmo, que a sequência ribossômica tenha sido deslocada do par 26 por elementos transponíveis móveis, fato que tem sido relatado em diferentes grupos de peixes e que tem contribuído para a diversificação cariotípica desses organismos (Gross *et al.* 2010; Ferreira *et al.* 2011; da Silva *et al.* 2011; Blanco 2012; Schneider *et al.* 2013; Favarato *et al.* 2017; da Silva *et al.* 2016).



	Espécies	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	DNAr 18S	DNAr 5S	Referência
RTTIINI	Harttia absaberi	Rio Passa Cinco (SP)	62	13m+23sm+16st+10a	Par 1	Par 8	Ref. 12
	Harttia carvalhoi	Córrego Ribeirão Grande (SP)	52 53	16m+16sm+12st+8a 15m+16sm+12st+10a	Par 23	Par 5 e 23	Ref. 1; 2
	Harttia carvalhoi	Córrego Ribeirão Grande (SP)	52 53	18m+18sm+8st+8a 17m+18sm+8st+10a	Par 23	Par 5 e 23	Ref. 3
	Harttia gracillis	Córrego Machadinho (MG)	58	20m+22sm+8st+8a	Par 26	Par 2	Ref. 2
ΑH	Harttia kronei	Rio Açungui (PR)	58	16m+16sm+16st+10a	Par 2	Par 9	Ref. 2
BC	Harttia longipinna	Rio São Francisco (MG)	58	16m+12sm+16st+14a	Par 23	Par 11	Ref. 2
Ч	Harttia loricariformis	Rio Paraitinga (SP)	56	16m+22sm+10st +8a	Par 25	Par 25	Ref. 2; 5; 6
	Harttia punctata	Rio Itiquira (GO)	57 58	16m+21sm+12st+8a 16m+20sm+12st+10a	$\begin{array}{c} X_2 \\ X_2 X_2 \end{array}$	X ₁ Y X ₁ X ₁	Ref. 1; 2
	Harttia torrenticola	Córrego Araras (MG)	56	16m+10sm+16st+14a	Par 22	Par 3	Ref. 2
TRIBO LORICARIINI	Farlowella cf. amazona	Barcelos (AM)	58	14m+30sm+14st	Par 1	Par 20	Ref. 15
	Farlowella oxyrryncha	Sítio do Agenor (AM)	58	12m+22sm+18st+6a	Par 27	Par 26	Ref. 15
	Farlowella schreitmuelleri	Igarapé Jundiaí (AM)	58	10m+30sm+14st+4a	Par 28	Par 16 e 26	Ref. 15
	Loricaria prolixa	Rio Pardo e Mogi-Guaçu (SP)	62	14m+8sm+4st+36a	Par 12		Ref. 12
	Loricaria cataphracta	Córrego da Onça (MS)	64	12m+8sm+2st+42a 12m+8sm+2st+42a 12m+8sm+2st+42a 12m+8sm+2st+42a 12m+8sm+2st+42a	Par 12 Par 8 Par 8 e 12 Par 9 e 12 Par 12 e 13	 	Ref. 9 Ref. 9 Ref. 9 Ref. 9 Ref. 9
	Loricariichthys platymetopon	Rio do Peixe (SP)	54	10m+16sm+8st+20a	Par 14	Par 9 e 14	Ref. 12
	Rineloricaria aequalicuspis	Rio Maquiné (RS)	68	68st/a	Par 8 16 s		Ref. 14
	Rineloricaria cadeae	Rio Forquerinha (RS)	64	64sta	Par 9	4 sítios (st/a)	Ref. 14
	Rineloricaria capitonia	Rio Uruguai (SC)	64	4m+2sm+58st/a	Par 3	Par 16, 17, 18 e 19	Ref. 11

 Tabela 4. Resultados do mapeamento físico e cromossômico dos genes ribossômicos 18S e 5S para Loricariinae.



Espécies	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	DNAr 18S	DNAr 5S	Referência
Rineloricaria lanceolata	Córrego da Onça (MS)	45	4m+2sm+2st+37a	Par 13		Ref. 10
		46	4m+2sm+2st+38a	Par 4 e 13		Ref. 10
		47	4m+1sm+2st+40a	Par 4 e 13		Ref. 10
		47	3m+1sm+2st+41a	Par 4 e 13		Ref. 10
		48	3m+2st+43a	Par 4 e 13		Ref. 10
Rineloricaria latirostris	Rio Laranjinha (PR)	46	10m+4sm+32st/a	Par 2	Par 3, 10, 11, 21, 22 e 23	Ref. 11
	Rio Barra Grande (PR)	46	10m+4sm+32st/a	Par 2	Par 3,10, 11 e 21	Ref. 11
	Rio Mogi-Guaçu (SP)	40	16m+4sm+20st/a	Par 2	Par 6, 9, 10, 15, 16 e 20	Ref. 12
	Rio Passa Cinco (SP)	46	10m+4sm+32st/a	Par 1	Par 6, 7, 14 e 16	Ref. 12
<u> </u>	Río Piumhi (MG)	48	14m/sm+34st/a	Par 10	4 sítios (st/a)	Ref. 7
Rineloricaria lima	Rio Açungui (PR)	69	1m+1sm+2st+65a	2 sitios (st)	9 sitios (m/a)	Ref. 13
		68	2m+2sm+2st+62a	2 sitios (st)	7 sitios (m/a)	Ref. 13
	RIO RIDEIRA E AÇUNGUÎ (PR)	70		2 SITIOS (ST)	10 sitios (a)	Ref. 13
		70	2111+251+00a	2 SITIOS (St)		Rel. 13
		69	1111+2St+00a	2 sitios (st)	10 sitios (a)	Rel. 13 Dof 12
		60 66	2111+251+04a	2 sitios (st)	$\Omega_{\rm s}(t) = (m/2)$	Ref. 13
		66	3m+3st+60a	2 sítios (st)	8 sitios (m/a)	Ref 13
Rineloricaria malabarbai	Rio Forquetinha (RS)	64	2m/sm+62st/a	Par 10	7 sítios (st/a)	Ref. 14
Rineloricaria microlepidogaster	Rio Forquetinha (RS)	68	68st/a	Par 9	3 sítios (st/a)	Ref. 14
Rineloricaria nigricauda	Córrego Bonito (RJ)	70	70st/a	Par 4	Par 3 e 7	Ref. 12
Rineloricaria parva	Rio Miranda (MS)	60	6m/sm+54st/a	Par 1	2 sítios (st/a)	Ref. 14
Rineloricaria pentamaculata	Rio Barra grande (PR)	56	4m+10sm+42st/a	Par 3	Par 8, 9, 10, 15 e 16	Ref. 11
·	c ()	54	6m+4sm+44st/a	Par 4	Par 7, 8, 10 e 21	Ref. 11
	Rio Juruba (PR)	56	4m+10sm+42st/a	Par 3	Par 8, 9, 10, 11, 13 e 14	Ref. 11
	Rio Taquaral (SP)	58	2m+2sm+54st/a	Par 3	Par 7, 13, 15, 17 e 22	Ref. 12
	Rio Jacucaca e Quexada (PR)	56	8m/sm+48st/a	Par 1	12 sítios (st/a)	Ref. 14
	Rio Keller e Tauá (PR)	56	8m/sm+48st/a	Par 5		Ref. 8
	Rio Tatupeba (PR)	56	8m/sm+48st/a	Par 5 e 8		Ref. 8
Rineloricaria quadrensis	Lagoa Quadros (RS)	70	8m/sm+62st/a	Par 5	8 sítios (st/a)	Ref. 14

Tabela 4 (Continuação). Resultados do mapeamento físico e cromossômico dos genes ribossômicos 18S e 5S para Loricariinae.



	Espécies	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	DNAr 18S	DN	IAr 5S	Referência
	Rineloricaria reisi Córrego Chimiray (ARG)		60	60st/a	Par 1			Ref. 14
	Rineloricaria sp. 1Rio Paraíba do Sul e São José (RJ)Rineloricaria sp. 2Rio Paraíba do Sul (RJ)		62	2sm+60st/a	Par 2 Par 14			Ref. 12
ARIINI			62	2sm+60st/a 4m+58st/a 6m+2sm+54st/a	Par 2 Par 3 Par 5 Dar 5	Par 14 Par 15 Par 17 e 28		Ref. 12 Ref. 12 Ref. 12
2	Rineloricaria sp. 3 Corrego Passa Vinte (SP)		62	6m+2sm+54st/a	Par 5	Par 17 e 28		Ref. 12
Ĉ	Rineloricaria sp. 4 Rio Jurumirim (RJ)		64	6m+58st/a	Par 5	Par 6, 9, 14 e 21		Ref. 12
Č	Rineloricaria sp. 5 Rio da Baía do Paranaguá (PR)		68	2m+66st/a	Par 3	Par 6, 16 e 22		Ref. 12
TRII	<i>Rineloricaria</i> sp. n	loricaria sp. n Rio Betari (SP) Rio Jacupiranga (SP)		70st/a 3m+65st/a 70st/a	Par 1 Par 4 Par 2	Par 2, 4, 6 e Par 1, 7, 12 Par 5, 6 e 9	e 13 2, 14 e 17	Ref. 12 Ref. 12 Ref. 12
	Rineloricaria stellata	Rio Uruguai (SC)	54	6m+14sm+34st/a	Par 4, 6, 9 e 10	Par 3, 8,11,	13 e 15	Ref. 11
	Rineloricaria strigilata	Lagoa Cerquinha (RS)	70	8m/sm+62st/a	Par 1	6 sítios (st/a	a)	Ref. 14
	Spatuloricaria sp. Rio Xingu (PA)		66	8m+14sm+12st+32a	Par 8			Ref. 4
(1) (2) (3)	Blanco <i>et al.</i> 2013; Blanco <i>et al.</i> 2017; Centofante <i>et al.</i> 2006;	(4) Ferreira <i>et al</i> . 2014; (5) Kavalco <i>et al</i> . 2004a; (6) Kavalco <i>et al</i> . 2005;	(7) Me (8) Pc (9) Pc	endes-Neto 2008; orto <i>et al.</i> 2011; orto <i>et al.</i> 2014a;	(10) Porto <i>et al.</i> 2 (11) Primo <i>et al.</i> 3 (12) Rodrigues 2	2014b; 2016; 010;	(13) Rosa (14) Ventu (15) Prese	<i>et al.</i> 2012 urelli 2014; ente estudo.

Tabela 4 (Continuação). Resultados do mapeamento físico e cromossômico dos genes ribossômicos 18S e 5S para Loricariinae.



As três espécies analisadas no presente estudo tiveram, tanto o sítio de DNAr 18S como o sítio de DNAr 5S, associados com heterocromatina constitutiva. A presença dessas sequências em regiões heterocromáticas, bem como em associação com elementos transponíveis, tem sido considerada um "*hotspot*" para rearranjos cromossômicos (Elgin 1996; Schneider *et al.* 2013; da Silva *et al.* 2014), contribuindo dessa forma, na diversificação do genoma, principalmente em populações isoladas.

5.2. Distribuição das regiões heterocromáticas em espécies de Farlowella

A heterocromatina foi considerada por muitos anos como DNA "lixo" ou que não apresentava nenhuma atividade gênica (Sumner 2003). Atualmente, diversas funções são atribuídas a essa região do genoma, dentre elas podemos citar: a regulação da expressão gênica, segregação cromossômica, regulação da mitose. Ainda, pode estar envolvida nos processos de recombinação genética, especiação, origem de cromossomos sexuais e, também, refletir respostas genotípicas a estresses ambientais (Verma 1988; Sumner 2003; Burt e Trivers 2006; Grewal e Jia, 2007; Richards *et al.* 2010; Ribeiro 2013). O estudo da heterocromatina constitutiva em peixes tem fornecido importantes informações para a compreensão da evolução cariotípica deste grupo (Kavalco *et al.* 2004b), e tem se mostrado eficiente na identificação de polimorfismos, bem como revelado a variabilidade intra-populacional para algumas espécies da ictiofauna (Mantovani *et al.* 2000).

Para muitos Siluriformes, incluindo os Loricariidae, o padrão de heterocromatina constitutiva observado é de pequena quantidade, distribuída preferencialmente nas regiões pericentroméricas e terminais dos cromossomos (Gold *et al.* 1990; Artoni e Bertollo 2001; Fenocchio *et al.* 2003; Swarça *et al.* 2003; Kavalco *et al.* 2004b). Entretanto, alguns loricariídeos (Hypostominae) apresentam uma maior quantidade de heterocromatina, presente em grandes blocos conspícuos, alocados preferencialmente na porção terminal dos cromossomos, e que por vezes apresentam um braço inteiramente heterocromático (Artoni e Bertollo 2001; Kavalco *et al.* 2004b; da Silva *et al.* 2014; Blanco *et al.* 2017).

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, observado nas espécies do presente estudo, mostrou-se concordante com o já descrito para alguns loricariídeos (Hypostominae), uma vez que, as três espécies apresentaram um

40

acentuado acúmulo de heterocromatina, com grandes blocos conspícuos, presentes em diversos pares cromossômicos e Fernandes et al. (2015) sugerem que esses grandes blocos de heterocromatina são ricos em G-C. Comparando o padrão de distribuição de heterocromatina entre as espécies de Farlowella é visível que F. cf. amazona (presente estudo), F. amazona (Fernandes et al. 2015) e F. amazona (Gindri 2009) apresentam menos heterocromatina em relação a F. oxyrryncha e F. schreitmuelleri. Ainda, que o padrão de heterocromatina constitutiva de F. cf. amazona difere dos padrões heterocromáticos descritos por Gindri (2009) e Fernandes et al. (2015), uma vez que no presente estudo uma maior quantidade de heterocromatina foi evidenciada. Estas diferenças podem estar associadas à influência de fatores ambientais, pois as variadas condições de estresse ambiental (físicas e químicas), as quais os organismos estão sujeitos, podem causar a ativação ou inativação de genes mediados por processos de metilação e acetilação da heterocromatina (Ribeiro 2013). Essas mudanças mediadas por processos epigenéticos podem ser herdadas (Richards et al. 2010; Niciura e Saraiva 2014) e devido a isso, contribuírem para a adaptação dos organismos a novos ambientes e, consequentemente, contribuir para a origem de novas espécies.

O padrão heterocromático de *F. oxyrryncha* e *F. schreitmuelleri* é muito similar entre si. Ambas apresentam uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva com alguns pares cromossômicos com blocos em região intersticial, padrão não observado em *F.* cf. *amazona*. Esses dados nos levam a pensar que *F. oxyrryncha* e *F. schreitmuelleri* são mais relacionadas entre si do que com *F.* cf. *amazona*, o que já foi sugerido por dados morfológicos (Retzer e Page 1996). Embora o padrão heterocromático observado para as espécies de *Farlowella* sejam diferentes, dois pares cromossômicos possuem um padrão heterocromático muito similar entre as espécies analisadas (Figura 6), sendo que um deles é o par nucleolar (Fig. 6 a, b, c, d, e). Estes dois pares podem ser considerados marcadores do gênero *Farlowella*. Vale ressaltar que os cariótipos de *F. amazona* em banda C, apresentados por Gindri (2009) e Fernandes *et al.* (2015) podem não estar refletindo o real padrão heterocromático dessas espécies/populações, por problemas de técnica.





Figura 6. Pares cromossômicos homeólogos entre as espécies de *Farlowella*. (a, f) *F. amazona* (Gindri 2009); (b, g) *F. amazona* (Fernandes *et al.* 2015); (c, h) *F.* cf. *amazona*; (d, i) *F. oxyrryncha*; (e, j) *F. schreitmuelleri* (Presente estudo). (a, b, c, d, e – par nucleolar).

Outro detalhe de grande interesse visto no presente trabalho foi o heteromorfismo do par acrocêntrico 27, entre machos e fêmeas de *Farlowella oxyrryncha*, quando analisado em bandeamento C.

A maioria dos animais com sexos separados tem um dos cromossomos homólogos diferenciado (heteromórfico) em um dos sexos. Se o heteromorfismo for visualizado no macho o sistema é denominado XY, se o heteromorfismo for evidenciado na fêmea o sistema é denominado ZW. Acredita-se que heteromorfismos surgem a partir de cromossomos inicialmente indiferenciados (Verma 1988; Burt e Trivers 2006). Existem pelo menos dois mecanismos capazes de restringir a recombinação entre cromossomos homólogos nos vertebrados: rearranjos estruturais (Moreira-Filho *et al.* 1980; 1993; Almeida-Toledo *et al.* 1984; Bertollo *et al.* 1997; de Oliveira 2006) e heterocromatinização diferencial (Feldberg *et al.* 1987; Galetti Jr. *et al.* 1981; 1995; Scavone e Júlio Jr. 1995; Mariotto *et al.* 2004).

Tendo em vista estes mecanismos, é provável que *F. oxyrryncha* esteja passando por processos de diferenciação cromossômica de determinação sexual, onde a diferenciação parece estar limitada a um seguimento heterocromático, que aparece em dois cromossomos homólogos na fêmea e em um dos homólogos do macho (Figura 7). Nesse caso, o sistema é denominado de XX/XY. Entretanto, não se descarta a possibilidade de se tratar apenas de um polimorfismo cromossômico, uma vez que, sistemas de cromossomos sexuais diferenciados são raros em Loricariinae, visto apenas em três espécies, sendo elas *Harttia carvalhoi* (XX/XY₁Y₂),



Harttia punctata (X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y) e *Loricariichthys platymetopon* (ZZ/ZW) (Scavone e Júlio Jr. 1995; Centofante *et al.* 2006; Blanco *et al.* 2013; 2014; 2017).



Figura 7. Diferença no padrão de banda C do par 27 entre fêmeas (\mathcal{Q}) e machos (\mathcal{J}) de *Farlowella oxyrryncha*. Retângulo vermelho evidenciando a diferença no tamanho dos blocos heterocromáticos.

A princípio, foi sugerido que o par acrocêntrico 27 de *F. oxyrryncha* teria surgido a partir do par metacêntrico 1 de *F.* cf. *amazona*, por meio de rearranjos cromossômicos do tipo inversão (pericêntrica/paracêntrica) ou teria ocorrido apenas uma inversão pericêntrica e posterior heterocromatinização (cromossomo X), como esquematizado na figura 8. Em contrapartida, o cromossomo Y teria perdido o seguimento heterocromático pericentromérico. Com base nessa hipótese, a possibilidade de se tratar de um sistema de cromossomos sexuais diferenciados do tipo XX/XY em *F. oxyrryncha* é plausível. Em *Farlowella schreitmuelleri* foi observado no par 28, acrocêntrico, um padrão heterocromático semelhante ao padrão observado no par 27 das fêmeas de *F. oxyrryncha*, entretanto, sem diferença entre machos e fêmeas.



Figura 8. Esquema da provável origem do possível cromossomo sexual em *Farlowella oxyrryncha*. Seta invertida superior = inversão pericêntrica. Seta invertida inferior = inversão paracêntrica.



5.3. Estudo de sequências teloméricas em três espécies de Farlowella

Os telômeros são sequências repetidas em tandem (TTAGGG)n, são amplamente conservadas nos genomas de vertebrados e normalmente estão presentes nas extremidades dos braços cromossômicos (Meyne *et al.* 1990; Guerra 2004). No presente estudo foi realizado o primeiro mapeamento físico de DNA telomérico em três espécies de *Farlowella* e todas apresentaram sítios teloméricos nas extremidades cromossômicas. Entretanto, *F. cf. amazona e F. oxyrryncha* apresentaram sítios tênues de DNA telomérico nas extremidades da maioria dos pares cromossômicos e alguns pares apresentando sítios mais fortemente marcados. Já, a espécie *F. schreitmuelleri* apresentou sinais teloméricos homogêneos nas extremidades de seus cromossomos.

A variação de intensidade dos sinais de DNA telomérico, geralmente está relacionada com variações nos respectivos comprimentos das sequências teloméricas (Pathak et al. 1994a, b; Pathak et al. 1996; Multani et al. 1999; Pathak 2001). Essas sequências são de extrema importância para o genoma, uma vez que, associadas ao complexo multiprotéico Shelterin, as muitas proteínas e as moléculas de RNA (TERRA) são responsáveis por ativar respostas a danos no DNA, mantendo assim a integridade e estabilidade dos cromossomos (Zakian 1995; de Lange 2005; Palm e de Lange 2008; Luke e Lingner 2009; Chan e Chang 2010; Feuerhahn et al. 2010; O'Sullivan e Karlseder 2010), e, embora reduzido, o tamanho das sequências teloméricas detectadas em F. cf amazona e F. oxyrryncha pode representar uma quantidade mínima necessária para a proteção desta região (Multani et al. 2001). Em contrapartida, a eliminação de sequências teloméricas nas extremidades dos cromossomos pode contribuir para a ocorrência de vários tipos de rearranjos cromossômicos, incluindo fusões, deleções terminais, duplicações invertidas, amplificação de DNA, translocações duplicativas e não recíprocas e formação de cromossomos dicêntricos (Slijepcevic 1998; Bolzán 2011).

Os rearranjos cromossômicos têm sido, na maioria das vezes, evidenciados com o mapeamento físico cromossômico dos telômeros, usando sondas (TTAGGG)n (Nanda *et al.* 2002; Guerra 2004; Multani *et al.* 2001; Monagham 2010). Assim, a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITSs) pode indicar que rearranjos ocorreram, tais como fusões, inversões e translocações, durante a evolução



(Holmquist e Dancis 1979; Hastie e Allshire 1989; Meyne *et al.* 1990) ou que sequências de DNA telomérico foram inseridas em sítios instáveis, durante os mecanismos de reparo das quebras de fita dupla (DSBs - *double-strand breaks*) (Azzalin *et al.* 2001).

A ocorrência de DNA telomérico em regiões intracromossômicas foi observada em poucas espécies de peixes, entretanto, tal característica tem sido evidenciada em diferentes táxons, distantes filogeneticamente (Ocalewicz 2013). Em Loricariinae, por exemplo, os estudos citogenéticos usando sondas de DNA telomérico são escassos (Rodrigues 2010; Blanco *et al.* 2012; 2013; 2014; 2017; Rosa *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2014; Porto *et al.* 2014b; Primo *et al.* 2016). Entretanto, a ocorrência de ITSs nesta subfamília é algo frequente, visto que foi evidenciada em diferentes gêneros, tais como, *Harttia, Loricaria, Loricarichthys, Rineloricaria*, (Rodrigues 2010; Rosa *et al.* 2012; Porto *et al.* 2014b; Primo *et al.* 2016; Blanco *et al.* 2017) e em *Farlowella*, no presente estudo.

Das espécies de *Farlowella* analisadas, somente *F.* cf. *amazona* não apresentou ITS. No entanto, muitos rearranjos cromossômicos envolvendo o telômero, podem não ser detectados pela técnica convencional de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) devido a muitos fatores, tais como, os mecanismos de erosão de sequências de DNA repetitivos, inativação dos telômeros e eliminação de sequências teloméricas das extremidades cromossômicas (Mandrioli *et al.* 1999; Nanda *et al.* 2002; Bolzán 2011; Ocalewicz 2013).

Em *F. oxyrryncha* foram observados cinco pares cromossômicos com ITS e em *F. schreitmuelleri* foram observados quatro pares. Os pares 14 e 18 de *F. oxyrryncha* apresentaram ITSs tênues na região intersticial do braço longo, sugerindo que inversões, translocações ou inserção de DNA telomérico pela telomerase durante os mecanismos DSB estejam envolvidas na evolução cariotípica dessa espécie. Os pares 8 e 19 de *F. oxyrryncha* e os pares 7, 14 e 25 de *F. schreitmuelleri* apresentaram ITSs próximas ao centrômero de cromossomos do tipo submetacêntrico e subtelocêntrico, sugerindo a ocorrência de fusões cêntrica ou em tandem nessas espécies/populações. Esses dados corroboram a filogenia molecular proposta por Covain *et al.* (2016), que sugere que *F. oxyrryncha* e *F. schreitmuelleri* sejam mais derivadas que *F. amazona*.



O par acrocêntrico 27 de *F. oxyrryncha*, que acreditamos se tratar de um par sexual, além de apresentar sítios nas extremidades cromossômicas, apresentou 4 variações de ITSs, sendo que duas dessas variações foram observadas somente nas fêmeas (Figura 9a, b) e duas observadas somente nos machos (Figura 9c, d) como segue:

(a) ambos os homólogos apresentaram ITS próximo ao centrômero (XaXa)(Figura 9a);

(b) um dos homólogos apresentou ITS próximo ao centrômero (Xa), o outro apresentou uma ITS tênue na região intersticial do braço longo (Xb) (Figura 9b);

(c) um dos homólogos apresentou ITS próximo ao centrômero (Xa), o outro não apresentou ITS (Y) (Figura 9c). Esse mesmo padrão de ITS foi observado no par 28 de *F. schreitmuelleri*, entretanto sem diferenciação entre machos e fêmeas;

(d) um dos homólogos apresentou uma ITS tênue na região intersticial do braço longo (Xb), o outro não apresentou nenhuma ITS (Y) e ambos os homólogos não apresentaram ITS próximo ao centrômero (Figura 9d).



Figura 9. Variações de ITSs observadas no par acrocêntrico 27 de *F. oxyrryncha*. (a) e (b) variações observadas nas fêmeas; (c) e (d) variações observadas nos machos. Xa e Xb = polimorfismo observado no cromossomo X. Y= não polimórfico.

O padrão de banda C do par 27 de *F. oxyrryncha* foi de extrema importância para diferenciar machos e fêmeas, como mencionado no tópico anterior (Figura 7). Entretanto, quando comparamos os dados de banda C e das ITSs, um novo cenário é observado, onde as variações (a) e (c) da Figura 9 refletem perfeitamente o padrão de banda C do par 27 de *F. oxyrryncha* e nas outras duas variações (b) e (d)

46 AMM INTERNE

somente um dos homólogos refletem o padrão de banda C do par 27 de *F. oxyrryncha* da Figura 10. A partir dessa observação sugerimos que o cromossomo X é polimórfico, uma vez que apresenta dois padrões de ITSs, referidos aqui como Xa e Xb e o cromossomo Y, que não apresenta ITS, estaria refletindo uma possível condição ancestral para esta espécie.



Figura 10. Par 27 de machos e fêmeas de *F. oxyrryncha* em banda C (BC), evidenciando o heteromorfismo sexual e sequência telomérica intersticial (ITS) evidenciando o polimorfismo da ITS.

Existem diferentes tipos de ITS: as ITSs heterocromáticas (het-ITS) que são blocos estendidos de DNA telomérico associados à heterocromatina, observados principalmente em regiões centroméricas ou pericentroméricas dos cromossomos; as ITSs curtas (s-ITS) que são sequências de DNA telomérico com número limitado de pares de bases, localizadas em regiões intersticiais (entre telômero e centrômero); e as ITSs eucromáticas (eu-ITS) que são sequências de DNA telomérico as equências de DNA telomérico dispersas ou restritas a regiões eucromáticas, com distribuição aleatória ou não (Azzalin *et al.* 2001; Ruiz-Herrera *et al.* 2008; Schmid e Steinlein 2016).

No presente estudo, com exceção do par 14 e um dos homólogos do par 28 de *F. schreitmuelleri* e no homólogo Xb do par 27 de *F. oxyrryncha*, todas as ITSs foram observadas em associação com heterocromatina, sendo assim classificadas como het-ITS. A associação de DNA telomérico e heterocromatina constitutiva foram relatadas em muitos vertebrados (Meyne *et al.* 1990; Multani *et al.* 2001; Silva 2016) e tem sido sugerida como um componente de DNA satélite. Ainda, essas marcações podem ser resquícios de um rearranjo cromossômico antigo (Metcalfe *et al.* 2004), sendo essas regiões sugeridas como *hotspots*, ou seja, locais com maior chance de rearranjos cromossômicos (Scouarnec e Gribble 2012).

Assim, as espécies de *Farlowella*, até agora estudadas, apresentam uma macroestrutura cariotípica conservada em relação ao número diploide, entretanto, quando marcadores cromossômicos são aplicados fica evidente que a dinâmica



evolutiva deste táxon é intensa. Ainda, a presença de ITS nessas espécies sugere que rearranjos cromossômicos estão presentes e contribuindo para a diversificação evolutiva das mesmas, o que torna esse gênero objeto de grande interesse para estudos mais aprofundados, principalmente envolvendo a variação das ITSs, observadas no par 27 de *F. oxyrryncha*.

6. Conclusões

Para as três espécies de *Farlowella* o número diploide se manteve como um caráter conservado (2n=58), entretanto as fórmulas cariotípicas foram diversas tanto intra como inter-especificamente, sugerindo que os principais mecanismos de evolução cromossômica, neste gênero, são inversões paracêntrica e pericêntrica.

A região organizadora de nucléolo foi simples, entretanto o par carreador e sua localização no cariótipo divergiram, o que confirma a presença de inversões, uma vez que, este par parece ser homeólogo entre as espécies. Ainda, este par tem uma forte relação com a heterocromatina e a sonda de DNAr 18S confirmou a RON simples. Já, a sonda de DNAr 5S foi um marcador espécie-específico.

Sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram observadas em *F. oxyrryncha* e em *F. schreitmuelleri* e estas foram coincidentes com heterocromatina, entretanto não descartamos a possibilidade de tratar-se de rearranjos do tipo inversão, translocação ou inserção de DNA telomérico pela telomerase.

F. oxyrryncha tem um par cromossômico que acreditamos se tratar de um par sexual. Este mesmo par apresenta sítios teloméricos com quatro variações de ITSs, sugerindo um polimorfismo.



7. Referências Bibliográficas

- Affonso, P.R.A.M. 2000. Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 115pp.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Eduem, Maringá, PR, BR 501pp.
- Alexander, R.M.C.N. 1965. Structure and function in the catfish. *Journal of Zoology*, 148(1): 88-152.
- Almeida-Toledo, L.F. 1998. Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M. S.; Lucena, C.A (eds). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, BR. p. 583-588.
- Almeida-Toledo, L.D.A.; Foresti, H.; Toledo-Filho, S.D.A. 1984. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica*, 64(3): 165-169.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. 1985. As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. *Ciência e Cultura*, 37(3): 448-453.
- 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 co-localization with major rDNA clusters in five species of Astyanax (Pisces, Characidae). Cytogenetic and Genome Research, 97(3-4): 229-233.
- Alves, A.L. Oliveira, C. Foresti, F. 2003. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, 56(1): 57-63.
- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2005. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, 124(2-3): 127-136.



- Andreata, A.A. 1991. Estudos citogenéticos na subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysis, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 122pp.
- Arai, R. 2011. *Fish karyotypes: a check list*. Springer Science & Business Media. Tóquio, JHS, JP. 340pp.
- Armbruster, J.W. 1998. Modifications of the digestive tract for holding air in loricariid and scoloplacid catfishes. *Copeia*, 3: 663-675.
- Armbruster, J.W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141: 1-80.
- Armbruster, J.W. 2011. Global catfish biodiversity. *American Fisheries Society Symposium*, 77: 15-37.
- Artoni, R.F. 1996. Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero <u>Hypostomus</u> Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 162pp.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus. Caryologia*, 49(1): 81-90.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201-210.
- Azzalin, C.M.; Nergadze, S.G.; Giulotto, E. 2001. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*, 110(2): 75-82.
- Ballen, G.A.; Pastana, M.N.; Peixoto, L.A. 2016a. A new species of *Farlowella* (Siluriformes: Loricariidae) of the *F. nattereri* species-group from the rio Xingu basin, Mato Grosso, Brazil, with comments on *Farlowella jauruensis*, a poorlyknown species from the upper rio Paraguai basin. *Neotropical Ichthyology*, 14(3): e160046.



- Ballen, G.A.; Urbano-Bonilla, A.; Zamudio, J.E. 2016b. Farlowella mitoupibo, a new species of stick catfish from the upper Guaviare River, Orinoco basin, Colombia (Teleostei: Loricariidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters, 27(4): 325-332.
- Batista, V.S.; Inhamuns, A.J.; Freitas, C.E.C.; Freire-Brasil, D. 1998. Characterization of the fishery in river communities in the low-Solimões/high-Amazon region. *Fisheries Management and Ecology*, 5: 419-435.
- 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. *Genetics and Molecular Biology*, 28(4): 710-716.
- Berra, T.M. 2001. *Freshwater fish distribution*. Academic Press, San Diego, CA, USA. 604pp.
- Bertollo, L.A.C.; Fontes, M.S.; Fenocchio, A.S.; Cano, J. 1997. The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome research*, *5*(7): 493-499.
- Blanco, D.R. 2012. Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero <u>Harttia</u> (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 167 pp.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Traldi, J.B.; Moreira-Filho, O. 2012. 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.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Bertollo, L.A.C.; Traldi, J.B.; Moreira-Filho, O. 2013. 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*, 23(1): 127-134.



- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; de Almeida, M.C.; Traldi, J.B.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. 2014. Origin of the X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica*. 142(2): 119-126.
- Blanco, D.R., Vicari, M.R., Lui, R.L., Traldi, J.B., Bueno, V., Martinez, J.D.F., Moreira-Filho, O. 2017. Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Armored Catfish Species of the Genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish*, 14(2): 169-176.
- Bolzán, A.D. 2011. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, 27(1): 1-15.
- Britto, M.R. 2002. Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 289pp.
- Britski, H.A. 1981. *Peixes de água doce. In*: Carvalho, J.C.M. (Coord.) *Atlas da fauna brasileira.* Melhoramentos, São Paulo, São Paulo. 84-93pp.
- Britski, H.A.; de Silimon, K.Z.S.; Lopes, B.S. 1999. *Peixes do Pantanal: Manual de identificação*. Brasília, Embrapa. 184pp.
- Burt, A.; Trivers, R. 2006. *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA. 602pp
- Carneiro, A.S.P.; Pauls, E.; Oliveira, A.S.S.; Silva, L.P.; Vieira, W.S. 1998. Projeto
 Managé: Estudos citogenéticos de *Harttia* sp. e *Loricariichthys* sp. (Pisces,
 Loricariidae) da bacia hidrográfica do rio Itabopoana (MG/ES/RJ). VII
 Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada a Peixes Neotropicais, B11.
- 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). *Cytogenetic and Genome Research*, 112: 320-324.
- Chan, S.S.; Chang, S. 2010. Defending the end zone: studying the players involved in protecting chromosome ends. *FEBS letters*, 584(17): 3773-3778.

52

- Chiachio, M.C.; Oliveira, C.; Montoya-Burgos, J.I. 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes
 Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae).
 Molecular Phylogenetics and Evolution, 49(2): 606-617.
- CONCEA. 2013. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasília, DF, BR. 54p.
- Covain, R. 2011. *Phylogeny and evolution of a highly diversified catfish subfamily: the Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae).* Tese de Doutorado, Universidade de Genebra/Universidade Claude Bernard – Lyon I, Lyon, França. 431pp.
- Covain, R.; Fisch-Muller, S. 2007. The genera of Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa*, 1462: 1-40.
- Covain, R.; Dray, S.; Fisch-Muller, S.; Montoya-Burgos, J.I. 2008. Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(3): 986-1002.
- Covain, R.; Fisch-Muller, S.; Oliveira, C.; Mol, J.H.; Montoya-Burgos, J.I.; Dray, S. 2016. Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. *Molecular phylogenetics and evolution*, 94: 492-517.
- Cramer, C.A.; Liedke, A.M.R.; Bonatto, S.L.; Reis, R.E. 2008. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Bulletin of Fish Biology*, 9: 51-59.
- Cramer, C.A.; Bonatto, S.L.; Reis, R.E. 2011. Molecular Phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59: 43-52.
- Diogo, R. 2003. Higher-level phylogeny of Siluriformes an overview. In: Arratia, G.; Kapoor, B.G.; Chardon, M.; Diogo, R. (Eds.). Catfishes. Vol. 2. Science Publishers, Los Angeles, CA, USA. p. 353-384.



- D'Horta, F.M.; da Silva, J.; Cardoso, M.; Ribas, C.C. 2008. Species limits and hybridization zones in *Icterus cayanensis–chrysocephalus* group (Aves: Icteridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(3): 583-597.
- Dover, G.A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in genetics*, 2: 159-165.
- Eigenmann, C.H.; Eigenmann, R.S. 1890. A revision of the South American nematognathi, or catfishes. *Occasional Papers California Academy Science*, 1: 1-508.
- Elgin, S.C. 1996. Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Current opinion in genetics* & *development*, 6(2): 193-202.
- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. 2015. Species of Fishes by family/subfamily. (http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamil y.asp). Acessado 03/06/2015.
- Favarato, R.M.; da Silva, M.; de Oliveira, R.R.; Artoni, R.F.; Feldberg, E.; Matoso, D.A. 2016. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish*, 13(2): 103-111.
- Favarato, R.M.; Ribeiro, L.B.; Feldberg, E.; Matoso, D.A. 2017. Chromosomal mapping of transposable elements of the Rex family in the bristlenose catfish, *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae), from the Amazonian region. *Journal of Heredity*, 108(3): 254-261.
- Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C.; Toledo, L.F.D.A.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Santos, A.F.D. 1987. Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome*, 29(1): 1-4.
- Fenocchio, A.S. 1993. Cromossomos supranumerários no gênero <u>Rhamdia</u> (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 122pp.



- Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Dias, A.L.; Swarça, A.C. 2003. Cytogenetic studies and correlate considerations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, 68(4): 363-368.
- Fernandes, C.A; Damásio, J.F; Martins-Santos, I.C. 2012. Cytogenetic studies in species of family Loricariidae (Osteichthyes, Siluriformes) from Iguatemi River basin, Brazil. First cytogenetic report in *Farlowella amazonum* (Günther, 1864). *Caryologia*, 65(4): 276–280.
- Fernandes, C.A.; Alves, D.S.; Guterres, Z.R.; Martins-Santos, I.C. 2015. Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Parana River drainage) in Brazil. *Comparative cytogenetics*, 9(1): 67.
- Ferraris Jr, C.J. 2003. Subfamily Loricariinae (armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (eds.) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, BR. p. 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.
- Ferraz, E. 1999. Management and diseases of the ornamental fish exported from the rio Negro basin. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds) Biology of Tropical Fishes. Ed. INPA, Manaus, AM, BR. p. 99-111
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2011. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 132(1-2): 64-70.
- Ferreira, R.O.; Pereira, A.L.; Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C.; de Sousa, L.M.; Noronha, R.C.R. 2014. Caracterização citogenética de uma espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu (Pará, Amazônia, Brasil). *Biota Amazônia*, 4(1): 30-36.
- Ferreira, M.; Garcia, C.; Matoso, D.A.; Jesus, I.S.; Feldberg, E. 2016. A new multiple sex chromosome system X₁X₁X₂X₂/X₁Y₁X₂Y₂ in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-016-9927-9.



- Feuerhahn, S.; Iglesias, N.; Panza, A.; Porro, A.; Lingner, J. 2010. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS letters*, 584(17): 3812-3818.
- Friel, J.P. 2003. Family Aspredinidae (Banjo catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander S.O.; Ferraris, C. J. Jr. (Eds.) Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, BR. p. 261–265.
- Galetti Jr, P.M.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 1981. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 29(3): 138-142.
- Galetti Jr, P.M.; Lima, N.R.W.; Venere, P.C. 1995. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia*, 60(4): 375-382.
- García-Alzate, C.A.; Román-Valencia, C.; Barrero, A.M. 2012. Biología alimentaria y reproductiva de *Farlowella vittata* (Siluriformes: Loricariidae) en la cuenca del río Güejar, Orinoquía, Colombia. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 60(4): 1873-1888.
- Garcia, C. 2005. Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de cinco famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 124pp.
- Gindri, B.S. 2009. Contribuição ao estudo citogenético em Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) da região do alto Taquari. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá. Maringá. Paraná. 41pp.
- Giuliano-Caetano, L. 1998. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de <u>Rineloricaria</u> <u>latirostris</u> (Pisces, Loricariidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 78pp.
- Gold, J.R. 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. *Copeia*, 133-139.
- Gold, J.R.; Li, Y.C.; Shipley, N.S.; Powers, P.K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37(4): 563-575.



- Gosline, W.A. 1947. Contributions to the classification of the loricariid catfishes. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 41: 79–134.
- Grewal, S.I.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*, 8(1): 35-46.
- Griffiths, A.J.; Wessler, S.R.; Gelbart, W.M.; Suzuki, D.T.; Miller, J. H. 2008. Introdução à Genética. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, BR. 856pp.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76: 1117-1127.
- Guerra, M. 1988. Introdução à citogenética geral. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, RJ, BR. 142pp.
- Guerra, M. 2004. *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP, BR. 184pp.
- Guerra, M. 2012. *Citogenética molecular: Protocolos comentados*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, BR. 132pp
- Hardman, M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 700-720.
- Hastie, N.D.; Allshire, R.C. 1989. Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends in Genetics*, 5: 326-331.
- Holmquist, G.P.; Dancis, B. 1979. Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9): 4566-4570.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Howes, G. J. 1983. The cranial muscles of loricarioid catfishes, their homologies and value as taxonomic characters (Teleostei: Siluroidei). *Bulletin of the Natural History Museum: Zoology series*, 45: 309-345.



- Hubert, N.; Renno, J.F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33(8): 1414-1436.
- 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 Research*, 19(17): 4780.
- Isbrücker, I.J.H. 1979. Description préliminaire de nouveaux taxa de la famille des Loricariidae, poissons-chats cuirassés néotropicaux, avec un catalogue critique de la sous-famille nominale (Pisces, Siluriformes). *Revue Française d'Aquariologie et Herpetologie*, 5: 86-116.
- Isbrücker, I.J.H. 1980. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Verslagen en Technische Gegevens, 22(1): 1-181
- Isbrücker, I.J.H. 1981. Revision of *Loricaria* Linnaeus, 1758 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Beaufortia*, 31(3): 51–96.
- Isbrücker, I.J.H.; Britski, H.A.; Nijssen, H.; Ortega, H. 1983. Aposturisoma myriodon, une espèce et un genre nouveaux de poisson-chat cuirassé, tribu Farlowellini Fowler, 1958 du bassin du Rio Ucayali, Pérou (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Revue Française d'Aquariologie et Herpetologie, 10: 33-42.
- Kasahara, S. 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, BR. 160pp.
- 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. *Cytogenetic and Genome Research*, 106(1): 107-110.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Antonio Carlos Bertollo, L.A.C.: Moreira-Filho, O. 2004b. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, 141(3): 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.
- de Lange, T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18): 2100-2110.



- Leite, R.G.; Cañas, C.; Forsberg, B.; Barthem, R.; Goulding, M. 2007. *Larvas dos grandes bagres migradores.* Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica, Manaus, AM, BR. 127pp.
- Levan, A.; Fregda, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lowe-McConnell, R.H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Edusp, São Paulo, SP, BR. 534pp.
- 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(5): 552-559.
- Luke, B.; Lingner, J. 2009. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *The EMBO journal*, 28(17): 2503-2510.
- Lundberg, J.G. 1975. The fossil catfishes of North America. *University of Michigan Papers on Paleontology*, 11: 1-61.
- Lundberg, J.G.; Friel, J.P. 2003. *Siluriformes. Catfishes*. Version 20 January 2003 (under construction). http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20 in The Tree of Life Web Project, http://tolweb.org/
- Machado F.A.; Sazima I. 1983. Comportamento alimentar do peixe hematófago *Branchioica bertonii* (Siluriformes, Trichomycteridae). *Ciência e Cultura*, 35: 344-348.
- Maia, T.P.A. 2008. Estudos citogenéticos em peixes da subfamília Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 75pp.
- Maia, T.P.A.; Giuliano-Caetano, L.; Rodrigues, M.; Rubert, M.; Takagui, F.H.; Dias,
 A.L. 2010. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). *Ichthyological Research*, 57: 209–213.


- Mandrioli, M.; Cuoghi, B.; Marini, M.; Manicardi, G.C. 1999. Localization of the (TTAGGG)n telomeric repeat in the chromosomes of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Hamilton Buchanan) (Osteichthyes). *Caryologia*, 52: 155-157.
- Mantovani, M.; dos Santos Abel, L.D.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109(3): 161-168.
- Mariotto, S.; Artoni, R.F.; Miyazawa, C.S. 2004. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*, 57(4): 327-331.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Research, 7: 363–367.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 2001. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111(1-3): 439-446.
- Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P.; Wright, J.M. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - a review. *Aquaculture*, 231(1): 37-49.
- Mendes-Neto, E.O. 2008. Estudos citogenéticos em algumas espécies de Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) da região de transposição do rio Piumhi para o rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 76pp
- Metcalfe, C.J.; Eldridge, M.D.; Johnston, P.G. 2004. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T₂AG₃)n in the 2n= 14 ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research*, 12(4): 405-414.
- Meyne, J.; Baker, R.J.; Hobart, H.H.; Hsu, T.C.; Ryder, O.A.; Ward, O.G.; Wiley, J.E.; Wurster-Hill, D.H.; Yates, T.L.; Moyzis, R.K. 1990. Distribution of nontelomeric sites of the (TTAGGG)n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99(1): 3-10.



- Michele, J.L. Takahashi, C.S. Ferrari, I. 1977. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42(3-4): 539-546.
- Milliman, J.D.; Meade, R.H. 1983. World-wide delivery of river sediment to the oceans. *The Journal of Geology*, 91(1): 1-21.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente) 2006. Caderno da Região Hidrográfica Amazônica, Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos. Brasília. DF, BR. 124pp.
- Monagham, P. 2010. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206: 130-142.
- Montoya-Burgos, J.I.; Fisch-Muller, S.; Weber, C.; Pawlowski, J. 1998. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, BR. p. 363-375.
- Montoya-Burgos, J.I. 2001. *Phylogenetic relationships of the Hypostominae* (Siluriformes: Loricariidae) with investigations on the phylogeny and evolution of the catfishes. Tese de Doutorado, Universidade de Genebra, Genebra, Suiça.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. 1980. Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 33(1): 83-91.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr, P.M. 1993. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46(2-3): 115-125.
- Multani, A.S.; Li, C.; Ozen, M.; Imam, A.S.; Wallace, S.; Pathak, S. 1999. Cell-killing by paclitaxel in a metastatic murine melanoma cell line is mediated by extensive telomere erosion with no decrease in telomerase activity. *Oncology reports*, 6: 39-44.
- Multani, A.S.; Ozen, M.; Furlong, C.; Zhao, Y.J.; Hsu, T.; Pathak, S. 2001. Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma*, 110(3): 214-220.



- Muriel-Cunha, J. 2008. Biodiversidade e sistemática molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) - com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 33p.
- Nanda, I.; Schrama, D.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Schartl, M.; Schmid, M. 2002. Distribuition of telomeric (TTAGGG) sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*, 111: 215-227.
- Nelson, J.A.; Wubah, D.A.; Johnson, E.A.; Stewart, D.J. 1999. Wood-eating catfishes of the genus *Panaque*: gut microflora and cellulolytic enzyme activities. *Journal of Fish Biology*, 54(5): 1069-1082.
- Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. 2016. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, USA. 707pp.
- Niciura, S.C.M.; Saraiva, N.Z. 2014. Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicação para a produção animal e vegetal. *EMBRAPA*, Brasília, DF, BR. 286pp.
- Ocalewicz, K. 2013. Telomeres in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2-3): 114-125.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. 1988. Supernumerary Chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydora aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- de Oliveira, R.R. 2006. Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero <u>Ancistrus</u> (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, Amazonas. 96pp.
- O'sullivan, R.J.; Karlseder, J. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3): 171-181.
- Palm, W.: de Lange, T. 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual Review of Genetics*, 42: 301-334.



- Pathak, S.; Risin, S.; Brown, N.M.; Berry, K. 1994a. Telomeric association of chromosomes is an early manifestation of programmed cell death. *International journal of oncology*, 4(2), 323-328.
- Pathak, S.; Dave, B.J.; Gagos, S. 1994b. Chromosome alterations in cancer development and apoptosis. *In vivo*, 8(5): 843-850.
- Pathak, S.; Multani, A.S.; Amoss Jr. M.S. 1996. Telomere, telomerase and malignant melanomas in human and domestic mammals. *Arch Zootecnia*, 45: 141–149
- Pathak, S. 2001. Telomeres in human cancer research. *In*: Manna GK, Roy SC (eds) *Perspective in cytology and genetics*. 10th All Indian Congress of Cytology and Genetics Publication, Kalyani University, Kalyani, West Bengal 10: 13–22.
- Pereira, E.H.L. 2005. Resurrection of *Pareiorhaphis* Miranda Ribeiro, 1918 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae), and description of a new species from the rio Iguaçu basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3: 271-276.
- de Pinna, M.C.C. 1993. *Higher level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi).* Tese de Doutorado, Universidade da Cidade de Nova York, Nova York, Nova York. 482pp.
- de Pinna, M.C.C. 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, BR. p. 279-330.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- Porto, F.E.; Portela-Castro, A.L.B.; Martins-Santos, I.C. 2011. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. *Ichthyological Research*, 58(3): 225-231.



- Porto, F.E.; Gindri, B.S.; Vieira, M.M.R.; Borin, L.A.; Portela-Castro, A.L.B.; Martins-Santos, I.C. 2014a. Polymorphisms of the nucleolus organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the upper Paraguay River basin indicate an association with transposable elements. *Genetics and Molecular Research*, 13(1): 1627-1634.
- Porto, F.E.; de Rossi Vieira, M.M.; Barbosa, L.M.; Borin-Carvalho, L.A.; Vicari, M.R.; de Brito Portela-Castro, A.L.; Martins-Santos, I.C. 2014b. Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish*, 11(4): 318-324.
- Post, V.A. 1965. Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen hei Süßwasser-Teleosteern. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 3(1-2): 47-93.
- Primo, C.C.; Glugoski, L.; Almeida, M.C.; Zawadzki, C.H.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V. 2016. Mechanisms of Chromosomal Diversification in Species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish*, 14(2): 161-168.
- Rafinesque, C.S. 1815. Analyse de la nature, ou tableau de l'univers et des corps organisés. Aux dépens de l'auteur, Nápoles, Itália. 224pp.
- Rapp Py-Daniel, L.H. 1997. Phylogeny of the Neotropical armored catfishes of the subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae). Tese de Doutorado, Universidade do Arizona, Tucson, Arizona. 280 pp.
- Rapp Py-Daniel, L.H.: Ohara, W.M. 2014. Loricariinae. *In:* Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W.M.; Pires, T.H.S.; Zuanon, J.A.S.; Doria, C.R.C. (Org.). *Peixes do Rio Madeira*. Vol. 2. Dialeto, São Paulo, SP, BR. p. 224-301.
- Regan, C.T. 1904. A monograph of the fishes of the family Loricariidae. *Transactions* of the Zoological Society of London, 17: 191–350.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. 2003. *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America.* EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, BR. 742pp.



- Reis, R.E.; Pereira, E.H.L.; Armbrüster, J.W. 2006. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys. Zoological Journal of the Linnean Society*, 147: 277–299.
- Retzer, M.E.; Page, L.M. 1996. Systematics of the stick catfishes, Farlowella Eigenmann & Eigenmann (Pisces, Loricariidae). Proceedings of the Academy of Natural Sciences Philadelphia, 147: 33–88.
- Ribeiro, A.C.; Lima, F.C.; Pereira, E.H.L 2012. A new genus and species of a minute suckermouth armored catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins drainage, central Brazil: the smallest known loricariid catfish. *Copeia*, 4: 637-647.
- Ribeiro, L.B. 2013. Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em <u>Colossoma</u> <u>macropomum</u> (Characiformes, Serrasalmidae) associado à piscicultura. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 105pp.
- Richards, C.L.; Bossdorf, O.; Pigliucci, M. 2010. What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution? *BioScience*, 60(3): 232-237.
- Rodrigues, R.M. 2010. Estudos cromossômicos em Loricariinae com ênfase em espécies de <u>Rineloricaria</u> (Siluriformes, Loricariidae): uma abordagem evolutiva. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 241pp.
- Roncati H.A.; Corio, C; Malone, G.; Fenocchio A.S.; Pastori, M.C. 1999.
 Relevamiento citogenetico em peces del rio Paraná (Argentina). VII
 Subfamílias Loricariinae e Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae).
 Genetics and Molecular Biology, 22: 82.
- 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 polymorfism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusions points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, 22(3): 739–749.



- Roxo, F.F.; Zawadzki, C.H.; Alexandrou, M.A.; Costa Silva, G.J.; Chiachio, M.C.
 2012. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily
 Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution*, 2: 2438–2449.
- Ruiz-Herrera, A.; Nergadze, S.G.; Santagostino, M.; Giulotto, E. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(3-4): 219-228.
- Sabaj, M.H.; Armbruster, J.W.; Page L.M. 1999. Spawning in Ancistrus (Siluriformes; Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 10(3): 217-229.
- Sabino, J.; Andrade, L.P.D. 2003. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo da região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no rio Baía Bonita (Aquário Natural de Bonito). *Biota Neotropica*, 3(2): 1-9.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis,
 K.B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EDUSP, São Paulo, SP, BR. p. 345-373.
- 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). *Revista Brasileira de Genética*, 18: 31-35.
- Schaefer, S.A. 1986. *Historical Biology of the Loricariid Catfishes: Phylogenetics and Functional Morphology.* Tese de Doutorado, The University of Chicago, Chicago, Illinois.
- Schaefer, S.A. 1987. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus) with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Natural History Museum of Los Angeles County*, 394: 1–31.



- Schaefer, S.A. 1991. Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Siluroidei: Loricariidae), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 102(1): 1-41.
- Scheel, J.J. 1972. Die Chromosomen der drei Neon-Tetras. Aquarien Terrarien, 19(9): 307–309.
- Schmid, M.; Steinlein, C. 2016. Chromosome banding in amphibia. XXXIV. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. *Cytogenetic and Genome Research*, 148(2-3): 211-226.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Do Carmo, E.J.; Martins, C.; Feldberg,
 E. 2013. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex 1, Rex 3 and Rex 6 in neotropical cichlid genomes. *BMC evolutionary biology*, 13(1): 152.
- Schwarzacher, T.; Heslop-Harrison, P. 2000. *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Norwich, UK. 203pp
- Scouarnec, S.L.; Gribble, S.M. 2012. Characterizing chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity*, 108(1): 75-85.
- da Silva, M.; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; de Almeida, M.C.; Margarido, V.P.; Artoni,
 R.F. 2011. Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes:
 Gymnotus pantanal and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenetic and genome research*, 134(4): 303-307.
- da Silva, M.; Ribeiro, E.D.; Matoso, D.A.; Sousa, L.M.; Hrbek, T.; Rapp Py-Daniel,
 L.H.; Feldberg, E. 2014. Chromosomal polymorphism in two species of
 Hypancistrus (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for
 understanding their biodiversity. *Genetica*, 142(2): 127-139.
- da Silva, M.; Barbosa, P.; Artoni, R.F.; Feldberg, E. 2016. Evolutionary Dynamics of 5S rDNA and Recurrent Association of Transposable Elements in Electric Fish of the Family Gymnotidae (Gymnotiformes): The Case of Gymnotus mamiraua. Cytogenetic and Genome Research, 149(4): 297-303.



- Silva, C.E.F. 2016. *Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em marsupiais Amazônicos*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 87pp.
- Slijepcevic, P. 1998. Telomere length regulation a view from the individual chromosome perspective. *Experimental cell research*, 244(1): 268-274.
- Sola, L.; Natili, G.L.; Cataudella, S. 1988. Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae), an Argentine species introduced in Italy. *Genetica*, 77(3): 217-224.
- Souza, A.C.P.D. 2003. Descrição cariotípica de peixes dos gêneros <u>Baryancistrus</u>, <u>Parancistrus</u>, <u>Peckoltia</u> e <u>Ancistru</u>s (Ancistrinae, Loricariidae) da bacia Amazônica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará. 130pp.
- Sullivan, J.P.; Lundberg, J.G.; Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 636-662.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Sumner, A.T. 2003. *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing Ltd. Malden, MA. USA. 287pp
- Swarça, A.C.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M.; Dias, A.L. 2003. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119(1): 87-92.
- Takagui, F.H.; Venturelli, N.B.; Dias, A.L.; Swarca, A.C.; Vicari, M.R.; Fenocchio, A.S.; Giuliano-Caetano, L. 2014. The importance of pericentric inversions in the karyotypic diversification of the species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon. Zebrafish*, 11(4): 300-305.



- Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. 2009. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 125: 224–234.
- Trajano, E. 2001. Ecology of subterranean fishes: an overview. *Environmental Biology of Fishes*, 62: 133-160.
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Barros, A.V.; Artoni,
 R.F.; Moreira-Filho, O. 2013. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research*, 12(1): 463-471.
- Turner, B.J., Diffoot, N.; Rasch, E.M. 1992. The callichthyid catfifish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling species complex. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 3: 17–23.
- Vari, R.P., Malabarba, L.R. 1998. Neotropical Ichtyology: an overview. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (eds). *Phylogeny* and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, BR. p. 1-11.
- Venturelli, N.B. 2014. Mapeamento dos genes ribossômicos e cromossomos marcadores em nove espécies de <u>Rineloricaria</u> (Siluriforme, Loricariidae, Loricariinae) de distintas bacias hidrográficas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 78pp.
- Verma, R.S. 1988. *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. Cambridge University Press. New York, NY, USA. 301pp.
- 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. *Journal of Fish Biology*, 76: 1094-1116.
- Wasko, A.P.; Martins, C.; Wright, J.M.; Galetti Jr., P.M. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon. Genome*, 44(5): 893-902.



- Weber, C. 2003. Subfamily Hypostominae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J.Jr. 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, BR. p. 351-372.
- Zakian, V.A. 1995. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, 270(5242): 1601.
- 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 Zoo*logy, 79: 1-10.
- Zuanon, J.A.S. 1999. *História Natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira, Pará.* Tese de Doutorado, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 199pp.

