



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ANANDA MARQUES PETY

**NOVAS ABORDAGENS EVOLUTIVAS EM PEIXES DA AMAZÔNIA:  
MAPEAMENTO DE ELEMENTOS REPETITIVOS COMO MARCADORES PARA  
ESTUDOS EM ESPÉCIES DO CLADO *PECKOLTIA* (SILURIFORMES,  
LORICARIIDAE)**

Belém-Para

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**NOVAS ABORDAGENS EVOLUTIVAS EM PEIXES DA AMAZÔNIA:  
MAPEAMENTO DE ELEMENTOS REPETITIVOS COMO MARCADORES PARA  
ESTUDOS EM ESPÉCIES DO CLADO *PECKOLTIA* (SILURIFORMES,  
LORICARIIDAE)**

Dissertação de mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular  
Área de concentração Biologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha,  
ICB-UFPA

Belém-PA

2018

ANANDA MARQUES PETY

**NOVAS ABORDAGENS EVOLUTIVAS EM PEIXES DA AMAZÔNIA:  
MAPEAMENTO DE ELEMENTOS REPETITIVOS COMO MARCADORES PARA  
ESTUDOS EM ESPÉCIES DO CLADO *PECKOLTIA* (SILURIFORMES,  
LORICARIIDAE)**

Dissertação de mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular  
Área de concentração Biologia geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha,  
ICB-UFPA

**Professora Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha - Orientadora**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, UFPA

**Professor Dr. Julio Cesar Pieczarka - Membro da banca**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, UFPA

**Professor Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos - Membro da banca**

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, UFPA

**Professora Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi - Suplente**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, UFPA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P477n Pety, Ananda Marques Pety  
NOVAS ABORDAGENS EVOLUTIVAS EM PEIXES DA AMAZÔNIA: MAPEAMENTO DE  
ELEMENTOS REPETITIVOS COMO MARCADORES PARA ESTUDOS EM ESPÉCIES DO CLADO  
PECKOLTIA (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) / Ananda Marques Pety Pety. — 2018  
60 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC),  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha Noronha
1. Peckoltia. 2. DNA repetitivo. 3. Família multigênica. 4. Evolução cromossômica. I. Noronha, Renata  
Coelho Rodrigues Noronha, *orient.* II. Título
- 

CDD 572.8

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas oportunidades concedidas a mim, pela força que me deste nas horas de dificuldade e ser perseverante para alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais, irmã e vó Alda que me deram todos os ensinamentos possíveis, pelo amor e dedicação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Noronha, guiando-me da melhor maneira, com paciência e compreensão, pelo seu voto de confiança e seus ensinamentos desde meus primeiros dias como PIBIC.

Aos professores Julio Cesar Pieczarka e Cleusa Nagamachi, pelo acolhimento no laboratório e pelas conversas na hora do almoço.

À equipe de peixes, que ajudou e apoiou na realização desse trabalho. Aos demais colegas do laboratório que de alguma forma contribuíram com meu trabalho.

A todas as instituições e órgãos que deram apoio financeiro e estrutural para a realização deste trabalho: UFPA, Projeto Arapaima, Vale, FAPESPA, IBAMA, ICMBio, CAPES-Pro-Amazônia e CNPq.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente com a realização deste projeto.

Meu muito obrigada.

"Falar sem aspas,  
amar sem interrogações,  
sonhar sem reticências e  
viver sem pensar no ponto final."  
Charles Chaplin

## RESUMO

Os dados citogenéticos fornecem informações importantes sobre a diversidade de Loricariidae, pois eles corroboram as análises de classificação das espécies não descritas e ajudam na compreensão da diversidade inter-intraespecífica. No entanto, entre as espécies do clado *Peckoltia*, somente a determinação do número de cromossomos não resolve essas questões, porque a maioria das espécies exibe um número diplóide ( $2n$ ) estável. Assim, o uso de outros marcadores cromossômicos, são necessários para esclarecer a organização genômica dessas espécies e entender sua diversidade. O mapeamento físico de DNAs repetitivos tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta importante no estudo de problemas taxonômicos e evolutivos em peixes, bem como para entender os processos de organização genômica e diversificação. O objetivo do presente trabalho foi mapear sítios ribossômicos (rDNA) 5S e 18S em *Ancistomus feldbergae* e cinco espécies de *Peckoltia*: *P. cavatica*; *P. multispinis*; *P. oligospila*; *P. sabaji* e *P. vittata*, e discutir os mecanismos de organização e diversificação dessas sequências. Os resultados do presente estudo demonstram que todas as seis espécies analisadas possuem cariótipo constituído de 52 cromossomos, mas possuem fórmula cariotípica divergente. Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) do tipo simples foram observadas em *Ancistomus feldbergae*, *P. cavatica*, *P. multispinis* e *P. vittata*, enquanto NOR múltiplas foram encontradas em *P. oligospila* e *P. sabaji*. Foram observadas variações extensas no número e localização dos sítios de rDNA 5S e 18S entre as espécies. Esses dados indicam que as inversões não são os únicos eventos mais importantes na evolução do cariótipo neste grupo e devem ser úteis na identificação das espécies estudadas aqui. Além das inversões, as transposições são importantes eventos evolutivos envolvidos, pelo menos, em clusters de rDNA que se espalham em *Peckoltia* e provavelmente em outras espécies de Hypostominae.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Peckoltia*, DNA repetitivo, família multigênica evolução cromossômica.

## ABSTRACT

Cytogenetic data provide important information on the diversity of Loricariidae, as they corroborate the classification analyzes of the species not described and help in the understanding of inter-intraspecific diversity. However, among the species of the *Peckoltia* clade, the determination of the number of chromosomes alone does not resolve these questions, since most species exhibit a stable diploid (2n) number. Thus, the use of other chromosomal markers is necessary to clarify the genomic organization of these species and to understand their diversity. The physical mapping of repetitive DNA has been widely used as an important tool in the study of taxonomic and evolutionary problems in fish, as well as to understand the processes of genomic organization and diversification. The objective of the present work was to map ribosomal sites (rDNA) 5S and 18S in *Ancistomus feldbergae* and five species of *Peckoltia*: *P. cavatica*; *P. multispinis*; *P. oligospila*; *P. sabaji* and *P. vittata*, and discuss the mechanisms of organization and diversification of these sequences. The results of the present study demonstrate that all six species analyzed have a karyotype composed of 52 chromosomes but have divergent karyotype formulas. Nucleolus Organizing Regions (NOR) of the single type were observed in *Ancistomus feldbergae*, *P. cavatica*, *P. multispinis* and *P. vittata*, while multiple NORs were found in *P. oligospila* and *P. sabaji*. Extensive variations in the number and location of 5S and 18S rDNA sites among species were observed. These data indicate that inversions are not the only most important events in karyotype evolution in this group and should be useful in identifying the species studied here. In addition to inversions, transpositions are important evolutionary events involved, at least in rDNA clusters that spread in *Peckoltia* and probably in other species of Hypostominae.

**KEYWORDS:** *Peckoltia*, repetitive DNA, multigenic family chromosome evolution.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A- Placas dérmicas ossificadas. B- Odontodes e disco oral ventral.....	12
<b>Figura 2:</b> Relações filogenéticas da subfamília Hypostominae.....	14
<b>Figura 3:</b> Organização das famílias multigênicas em eucariotos superiores: A- Genes ribossomais rDNA 45S; B- genes ribossomais rDNA 5S; C- Histonas.....	18
<b>Figura 4:</b> Mapa das localidades de coleta. Ao lado as espécies coletadas: A- <i>Ancistomus feldbergae</i> B- <i>Peckoltia cavatica</i> ; C- <i>P. oligospila</i> ; D- <i>P. multispinis</i> ; E- <i>P. sabaji</i> ; F- <i>P. vittata</i> .....	23
<b>Figura 5:</b> Localidades das amostras analisadas no presente estudo.....	34
<b>Figura 6:</b> Espécies de <i>Ancistomus</i> e <i>Peckoltia</i> analisadas no presente trabalho (esquerda, escala = 1 cm) e seus respectivamente cariótipos (direita, Bar = 10 µm). AFE - <i>A. feldbergae</i> ; PMU - <i>P. multispinis</i> ; POL - <i>P. oligospila</i> ; PCA - <i>P. cavatica</i> ; PVI - <i>P. vittata</i> ; PSA - <i>P. sabaji</i> .....	36
<b>Figura 7:</b> Mapeamento cromossômico do rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) em espécies de <i>Ancistomus</i> e <i>Peckoltia</i> . AFE - <i>A. feldbergae</i> ; PMU - <i>P. multispinis</i> ; POL - <i>P. oligospila</i> ; PCA - <i>P. cavatica</i> ; PVI - <i>P. vittata</i> ; PSA - <i>P. sabaji</i> . Bar = 10 µm.....	37
<b>Figura 8:</b> Hipótese da dinâmica cromossômica no clado de <i>Peckoltia</i> . (A) Espécies que mantiveram a condição sintênica ancestral. (B) Espécies que quebraram a sintenia. * Dados obtidos de Mariotto et all (2011). ** Condição ancestral com NOR simples e sítios de rDNA 5S sintênicos.....	41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

2n	Número diplóide
a	Cromossomo acrocêntrico
AFE	<i>Ancistromus feldbergae</i>
FC	Fórmula cariotípica
i	Região intersticial do cromossomo
m	Cromossomo metacêntrico
NOR	Região Organizadora de Nucléolo
p	Braço pequeno do cromossomo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCA	<i>Peckoltia cavatica</i>
POL	<i>Peckoltia oligospila</i>
PSA	<i>Peckoltia sabaji</i>
PVI	<i>Peckoltia vittata</i>
q	Braço grande do cromossomo
rDNA	DNA ribossômico
sm	Cromossomo submetacêntrico
st	Cromossomo subteloicêntrico
t	Região terminal do cromossomo

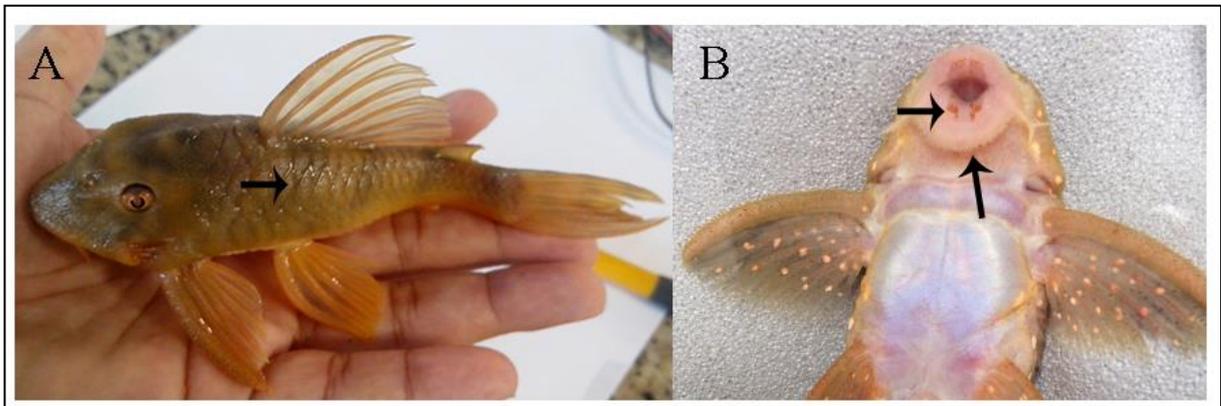
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LORICARIIDAE.....	12
1.2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE.....	13
1.3. DNA REPETITIVOS: ASPECTOS GERAIS E CLASSIFICAÇÃO.....	17
1.4. ESTUDOS CITOGENÔMICO NA SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE: DNAS REPETITIVOS.....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. AMOSTRAS.....	23
4.2. OBTENÇÃO DOS CROMOSSOMOS.....	24
4.3. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	25
4.4. COLORAÇÃO CONVENCIONAL.....	25
4.5. IDENTIFICAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (NOR).....	25
4.6. EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
4.7. ISOLAMENTO DE DNAS REPETITIVOS.....	27
4.8. MARCAÇÃO DAS SONDAS.....	28
4.9. TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE COM SONDAS DE DNAS REPETITIVOS.....	28
4.10. CAPTURA DE IMAGENS.....	29
4.11. MONTAGEM E DISPOSIÇÃO CROMOSSÔMICA.....	29
<b>5. RESULTADOS</b> .....	30
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>ANEXO 1</b> .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LORICARIIDAE

A família Loricariidae possui componentes importantes da ictiofauna da região Neotropical, onde eles são amplamente distribuídos, com registros desde o sudeste da Costa Rica ao nordeste da Argentina, e apresentam uma grande variação morfológica e de coloração (Isbrücker, 1980; Armbruster, 2004). Loricarídeos são facilmente distinguíveis de outros peixes por terem corpos cobertos com placas dérmicas ossificadas (figura 1), abundância de dentes tegumentares conhecidos como odontodes (Garg *et al.* 2010), e um disco oral ventral que



facilita a ligação à superfície e a alimentação (Geerinckx *et al.* 2011).

**Figura 1:** Exemplos do gênero *Peckoltia*. A- Placas dérmicas ossificadas. B- Odontodes e disco oral ventral. (Fonte: Acervo próprio).

É um grupo de peixes bastante diverso, cerca de 971 espécies válidas, da região Neotropical (Eschmeyer & Fong, 2018), sendo a maior família da ordem dos Siluriformes. Estes são agrupados em seis subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae e Neoplecostominae (Armbruster, 2004; Reis *et al.* 2006; Lujan *et al.* 2015), sendo a sistemática dessas subfamílias bastante controversa, constantemente revisada, tanto por análises osteológicas, morfométricas como moleculares (Cramer *et al.* 2011; Lujan *et al.* 2017).

## 1.2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE

A subfamília Hypostominae é composta por sete clados, *Chaetostoma*, *Pseudancistrus*, *Lithoxus*, *Pseudancistrus*, *Ancanthicus*, *Hemiancistrus* e *Peckoltia*, e duas tribos, *Ancistrini* e *Hypostomini*, (figura 2; Lujan *et al.* 2015).

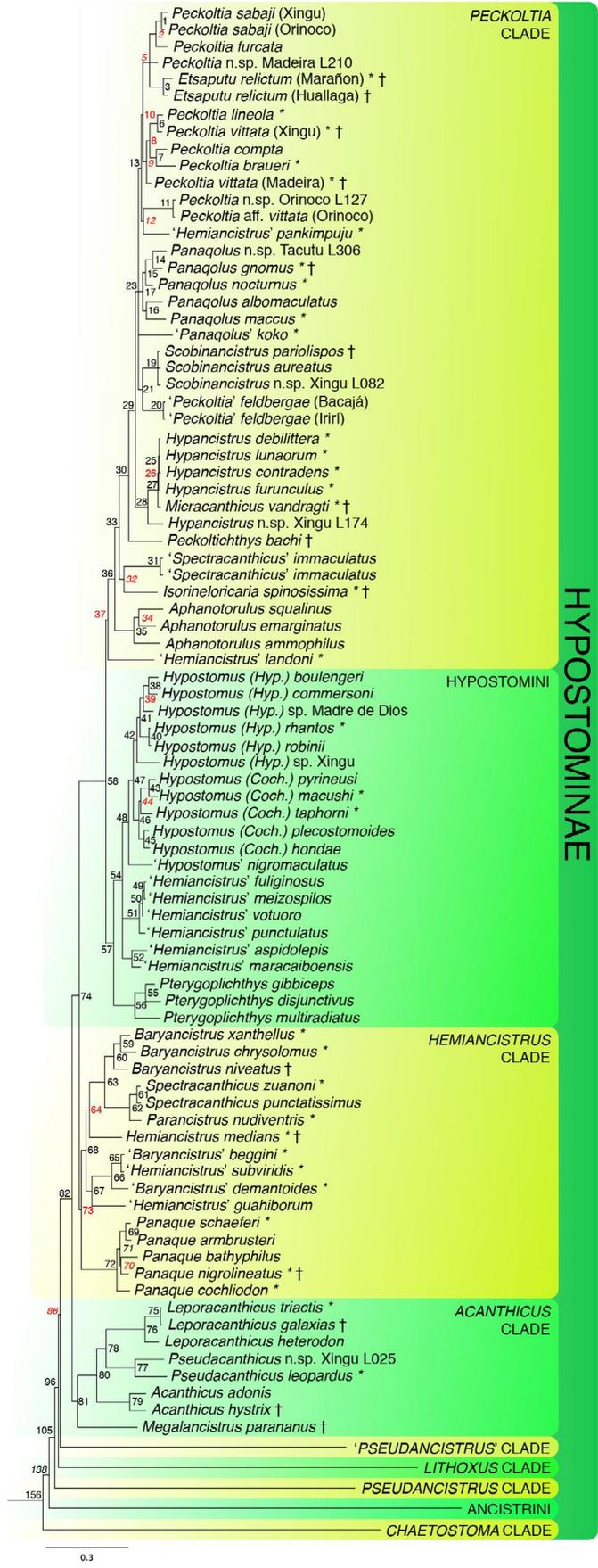


Figura 2: Relações filogenéticas da subfamília Hypostominae. (Fonte: Lujan *et al.* 2015).

O clado *Peckoltia* é mais rico em gêneros, com nove gêneros e 52 espécies válidas, comparado com os demais clado constituintes da subfamília Hypostominae, composto pelos gêneros: *Aphanotorulus*, *Etsaputu*, *Hypancistrus*, *Isorineloricaria*, *Microcanthicus*, *Panaqolus*, *Peckoltia*, *Peckoltichthys*, *Scobnancistrus*. O próprio gênero *Peckoltia*, é um taxon historicamente problemático, muitas vezes confundido com *Hemiancistrus* (Armbruster, 2004; 2008). Segundo Lujan *et al.* (2015) *Ancistomus* é um gênero válido para o clado *Peckoltia*, incluindo '*Peckoltia*' *feldbergae* neste gênero.

Poucas espécies para este clado foram descritas citogeneticamente, um clado que inclui vários gêneros, que se mostram mais conservados, principalmente em relação ao número diplóide ( $2n = 52$ ). Foram observados casos de NOR (Região Organizadora de Nucléolo) simples e múltiplas e a presença de um cromossomo B (Souza *et al.* 2009; Cardoso *et al.* 2013, 2016; Silva *et al.* 2014, Ayres-Alves *et al.* 2017) e até o presente estudo não foi identificado nenhum tipo de sistema sexual para esse clado (tabela 1).

**Tabela 1:** Levantamento de dados citogenéticos das espécies do clado *Peckoltia*

Espécie	2n	Fórmula criotípica	NOR	rDNA 18S	rDNA 5S	Referência
<i>Hypancistrus cf. debilittera</i>	52	34m/sm+18st	múltipla	2,23	1,2,9	Silva <i>et al.</i> 2014
<i>Hypancistrus zebra</i>	52	38m/sm+14st	Simple	13(q,t)	1(p,t)4(q,t)	Silva <i>et al.</i> 2014
<i>Hypancistrus zebra</i> L066	52	40m/sm+12st/a	Simple	2,21(q,t)	1(i)1(q,t)	Cardoso <i>et al.</i> 2016
<i>Hypancistrus zebra</i> L333	52	40m/sm+12st/a	Simple	2,21(q,t)	1(i)1(q,t)	Cardoso <i>et al.</i> 2016
<i>Panaqolus</i> sp.	52	42m/sm+10st/a	Simple	14(i)	14(i)	Ayres-Alves <i>et al.</i> 2017
<i>Peckoltia</i> sp.1	52	44m/sm+8st/a+1B	múltipla	-	-	Souza <i>et al.</i> 2009
<i>Peckoltia</i> sp.2	52	32m/sm+20st/a	múltipla	-	-	Souza <i>et al.</i> 2009
<i>Peckoltia vittata</i>	52	36m/sm+16st/a	simple	-	-	Souza <i>et al.</i> 2009
<i>Scobinancistrus aureatus</i>	52	42m/sm+10st	múltipla	3(i)	-	Cardoso <i>et al.</i> 2013
<i>Scobinancistrus aureatus</i>	52	42m/sm+10st	múltipla	-	5(i)	Ayres-Alves <i>et al.</i> 2017
<i>Scobinancistrus pariolispos</i>	52	42m/sm+10st	múltipla	3(q,t)	-	Cardoso <i>et al.</i> 2013
<i>Scobinancistrus pariolispos</i>	52	42m/sm+10st	múltipla	-	6(i)	Ayres-Alves <i>et al.</i> 2017

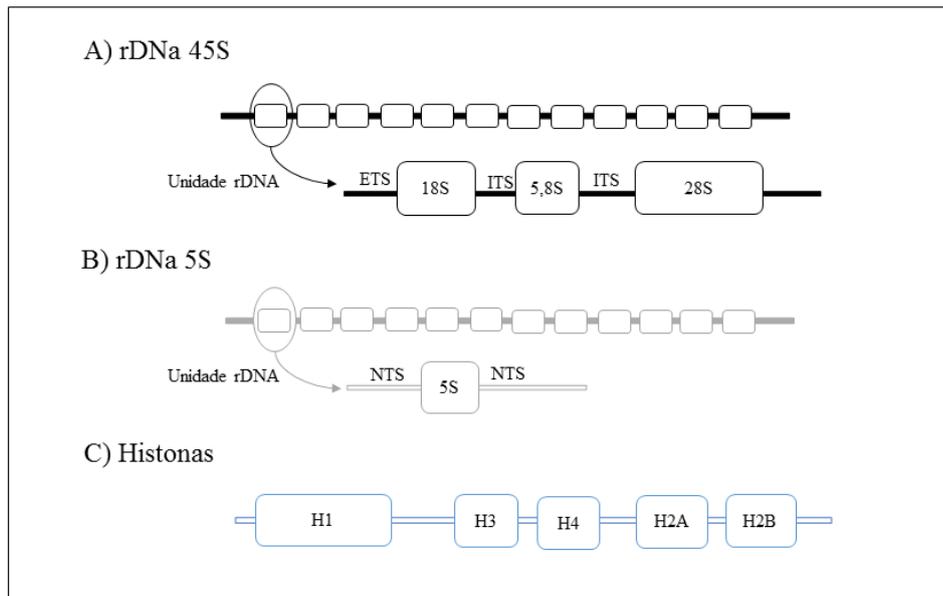
\*2n- número diploide; m- metacêntrico; sm- submetacêntrico; st- subtelo-cêntrico; a- acrocêntrico; NOR- Região Organizadora de Nucléolo; q- braço longo do cromossomo; p- braço curto do cromossomo; t- região terminal; i- região intersticial.

### 1.3.DNA REPETITIVOS: ASPECTOS GERAIS E CLASSIFICAÇÃO

As sequências de DNA repetitivos representam uma grande parte do genoma da maioria dos organismos, sendo uma característica comum no genoma dos eucariotos, apresentando alta variabilidade e constituindo, em alguns casos, mais de 80% do teor de DNA da célula (Charlesworth *et al.* 1994). Atualmente, sabe-se que estas sequências podem ser transcritas, mas por um longo período, elas foram consideradas por consenso, como não-codificantes, DNA lixo (junk DNA) (Schmidt & Heslop-Harrison, 1998). No entanto, diferentes estudos têm sugerido que estas sequências repetitivas estão envolvidas nos processos de recombinação (Biet *et al.* 1999), expressão gênica (Liu *et al.* 2001), replicação do DNA (Li *et al.* 2002) e na diferenciação de cromossomos sexuais em peixe (Parise-Maltempi *et al.* 2007), ou seja, são importantes na organização estrutural e funcional do genoma de forma geral (Kazazian, 2004; Biémont & Vieira, 2006).

Neste contexto, as sequências codificantes são constituídas pelas famílias multigênicas de RNA ribossomal e histonas (que são as mais estudadas) entre outras (Flavel, 1986; Kedes, 1979; Nagoda *et al.* 2005; Prokopowich *et al.* 2003) e as não codificantes, que são compostas por sequências idênticas ou similares organizadas *in tandem* e incluem DNAs satélites e repetições interespaçadas dispersas, compostas pelos elementos transponíveis (transposable element - TE), que possuem a capacidade de se mover no genoma (Charlesworth *et al.* 1994; Long & Dawid, 1980; Sumner, 2003).

Em eucariotos superiores, os genes ribossomais, que são responsáveis pela organização do nucléolo, estão distribuídos em duas famílias multigênicas: rDNA 45S que codifica as frações dos rDNAs 18S, 5,8S e 28S; e o rDNA menor, composto pela família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S (Long & Dawid, 1980). Outra família multigênica contém as sequências responsáveis por codificar cinco tipos de proteínas histônicas: H1, H2A, H2B, H3 e H4 (Nagoda *et al.* 2005) (figura 3).



**Figura 3:** Esquema da organização das famílias multigênicas em eucariotos superiores: A- Genes ribossomais rDNA 45S; B- genes ribossomais rDNA 5S; C- Histonas. (Fonte: adaptado de Martins *et al.* 2011).

#### 1.4. ESTUDOS CITOGENÔMICO NA SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE: DNAs REPETITIVOS

Este grupo demonstra uma grande variação no número diplóide que varia de 34 cromossomos em *Ancistrus cuiabae*, *Ancistrus* sp. “Catalão”, *Ancistrus* sp. Purus (Mariotto *et al.* 2009; Favorato *et al.* 2016) a 80 cromossomos em *Hypostomus iheringii* e *H. tapavae* (Traldi *et al.* 2012; Bueno *et al.* 2014), apresentando  $2n=54$  como número diplóide ancestral (Artoni & Bertollo, 2001). Essa grande variação cariotípica sugere a ocorrência de vários rearranjos cromossômicos, direcionando para uma evolução cariotípica bastante divergente (Artoni & Bertollo, 2001). Estudos citogenéticos na subfamília Hypostominae têm sido realizados com sondas de rDNAs 18S e 5S em diversos gêneros: *Ancistrus* (Mariotto *et al.* 2011; Konerat *et al.* 2015; Ribeiro *et al.* 2015; Favorato *et al.* 2016; Primo *et al.* 2016), *Hypancistrus* (Silva *et al.* 2014; Cardoso *et al.* 2016), *Hypostomus* (Rubert *et al.* 2011; Pansonato-Alves *et al.* 2013; Traldi *et al.* 2013; Bueno *et al.* 2014), *Scobnancistrus* (Cardoso *et al.* 2013), *Panaque armbrusteri* e *Panaqolus* sp. (Ayres-Alves *et al.* 2017), entre outros. Tais estudos têm demonstrado grande variação, tanto no número desses sítios, quanto na sua localização. DNAs repetitivos vêm sendo bastante utilizados em estudos citogenômicos. Atualmente sabe-se que

as sequências repetitivas podem estar envolvidas na organização estrutural e funcional do genoma em geral (Kazazian, 2004; Biémont & Vieira, 2006).

Para sequências de DNAs satélites está sendo atribuído o envolvimento na replicação, transcrição e recombinação do DNA (Li *et al.* 2002; Liu *et al.* 2001). Estas sequências têm sido isoladas de diferentes espécies de peixes, realizando mapeamento cromossômico (Hatanaka & Galetti Jr., 2002; Jesus *et al.* 2003; Xu *et al.* 2013), as quais tem evidenciado a localização destes elementos repetitivos preferencialmente em regiões heterocromáticas do genoma dos peixes (Martins, 2007). Em Loricariidae há poucas descrições da organização, composição e localização de sequências satélites, sendo descritas para poucas espécies: *Hisonotus leucofrenatus* (Andreatta *et al.* 2010), *Hypostomus ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara* (Traldi *et al.* 2013), *Rineloricaria latirostris*, *R. pentamaculata* (Primo *et al.* 2016).

Outra classe de DNAs satélites são as sequências teloméricas, que consistem em repetições de microssatélites. Essas sequências têm sido bastante utilizadas em estudos citológicos no grupo de peixes, sendo uma ferramenta útil na identificação de rearranjos cromossômicos relacionados à redução do número diplóide ou geração de cromossomos sexuais (Cioffi *et al.* 2010). No que se refere ao mapeamento cromossômico das sequências teloméricas em Loricariidae as análises são escassas, sendo identificadas em poucas espécies, entre elas *Hypostomus ancistroides*, *H. strigaticeps*, *H. nigromaculatus* (Pansonato-Alves *et al.* 2013), *Hypostomus ancistroides*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara* (Traldi *et al.* 2013), *Scobinancistrus aureatus*, *Scobinancistrus pariolispos* (Cardoso *et al.* 2013), *Rineloricaria lanceolata* (Porto *et al.* 2014), *Spatuloricaria* sp. (Ferreira *et al.* 2014), *Ancistrus* aff. *dolichopterus*, *A. dolichopterus*, *A. dubius*, *A. maximus*, *A. ranunculus*, *Ancistrus* sp. "Catalão" e *Ancistrus* sp. *Purus* (Favarato *et al.* 2016), *Hartia kronei*, *H. longipinna*, *H. gracilis*, *H. punctata*, *H. loricariformis*, *H. torrenticola*, *H. carvalhoi* (Blanco *et al.* 2017).

Os dados disponíveis sobre as distintas classes de DNAs repetitivos permitem inferências importantes no entendimento de organizações cromossômicas, diversificação de cromossomos sexuais, além de considerações de natureza filogenética, dispersão e biogeografia de populações naturais em peixes da família Loricariidae. O conhecimento sobre a organização desses elementos ainda é muito reduzido, em proporção à grande diversidade de peixes. Por isso, com o isolamento destes elementos, caracterização e posterior mapeamento destes e de

outros elementos em um maior número de espécies, análises comparativas poderão contribuir para a compreensão da origem, evolução e função destes elementos no genoma.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os estudos citogenéticos já realizados evidenciam a grande diversidade cromossômica inter-intraespecíficas em várias espécies da família Loricariidae. Entretanto estes dados ainda não são suficientes para resolver os problemas de ordem taxonômica, evolutiva e sistemática deste grupo.

Neste contexto, mapeamentos de famílias de DNAs repetitivos têm sido amplamente usados em estudos taxonômicos e evolutivos em alguns grupos de eucariontes. A utilização desta abordagem visa compreender os mecanismos de organização e diversificação do genoma, uma vez que estas sequências de DNAs podem estar envolvidas em eventos de rearranjos cromossômicos. Portanto, considerando a grande variabilidade cromossômica encontrada nas espécies de Loricariidae, bem como a escassez de dados referentes ao mapeamento dos DNAs repetitivos, aliada à sua funcionalidade, faz-se necessário elucidar sua localização, estrutura e função em Loricariidae para melhor compreensão da sua evolução genômica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar seis espécies do gênero *Peckoltia*, destacando o papel dos DNA repetitivos na organização e dinâmica desses elementos na diversidade cariotípica, para compreender a evolução do grupo.

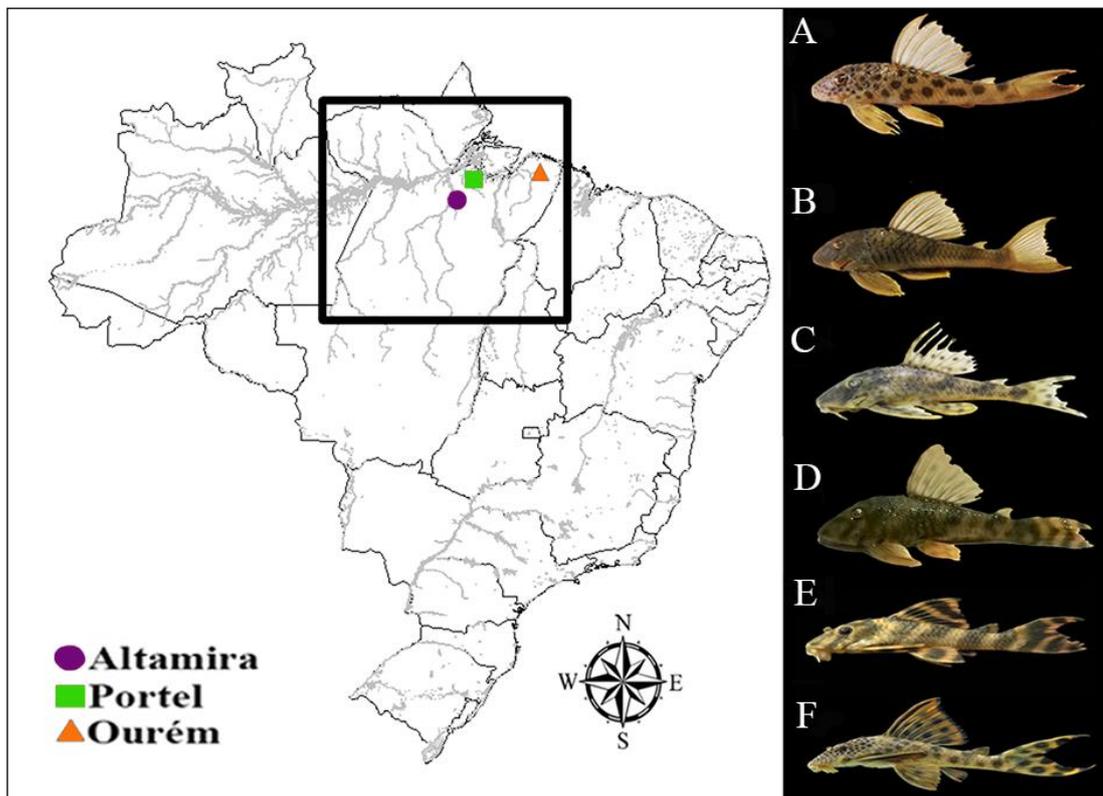
#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar o número diplóide e a fórmula cariotípica das espécies analisadas;
- b. Identificar as NORs;
- c. Isolar, caracterizar e mapear fisicamente as sequências repetitivas de DNA ribossomais em *Peckoltia*.
- d. Fazer uma análise cariotípica comparativa com os dados citogenéticos disponíveis na literatura;
- e. Contribuir com novos dados citogenéticos para o auxílio da identificação taxonômica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAS

Foram analisados 37 espécimes do clado *Peckoltia* distribuídas em seis espécies, todas coletadas nos municípios pertencentes ao Estado do Pará, Brasil. A localização e quantidade de espécimes coletados podem ser observados na figura 4 e tabela 2.



**Figura 4:** Mapa das localidades de coleta. Ao lado as espécies coletadas: A- *Ancistomus. feldbergae* B- *Peckoltia cavatica*; C- *P. oligospila*; D- *P. multispinis*; E- *P. sabaji*; F- *P. vittata*.

**Tabela 2-Espécimes coletados nos rios do Estado do Pará**

<b>Espécies</b>	<b>Localidade</b>	<b>Quantidade</b>
<i>A. feldbergae</i>	Rio Xingu (Altamira, PA) 03°06'12.8"S/51°43'53.9"O	4 machos e 3 fêmeas
<i>P. cavatica</i>	Rio Camaraipi (Portel, PA) 02°2'38.70"S/50°49'0.29"O	4 machos e 1 fêmea
<i>P. multispinis</i>	Rio Xingu (Altamira, PA) 03°06'12.8"S/51°43'53.9"O	3 machos e 1 fêmeas
<i>P. oligospila</i>	Rio Guamá (Ourém, PA) 01° 35'51"S/47° 17'23.8"O	3 machos e 2 fêmeas
<i>P. sabaji</i>	Rio Xingu (Altamira, PA) 03°06'12.8"S/51°43'53.9"O	4 machos e 3 fêmeas
<i>P. vittata</i>	Rio Xingu (Altamira, PA) 03°06'12.8"S/51°43'53.9"O	7 machos e 2 fêmeas

#### 4.2. OBTENÇÃO DOS CROMOSSOMOS

No estudo dos cromossomos mitóticos utilizou o rim cefálico, que é o órgão hematopoiético nos peixes, preparado segundo a técnica de “air drying” modificada, para peixes por Bertollo *et al.* (1978). Segue o protocolo:

1. Injetar, intraperitonealmente, uma solução aquosa de colchicina 0,025% na proporção de 1 mL/100 g de peso do animal.
2. Manter o peixe em tanque aerado por um período de 45 minutos.
3. Em seguida sacrificar o animal e retirar o rim.
4. Colocar o rim em placas de Petri de vidro contendo 10 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M.
5. Para melhor separação dos blocos celulares, dissociar bem os pedaços de tecido com um macerador, para obter uma suspensão celular e homogênea.
6. Levar a suspensão obtida para estufa a 37°C por 30 minutos.

7. Ressuspender, cuidadosamente, o material com auxílio de uma pipeta Pasteur, em seguida transferir para um tubo de centrífuga e adicionar 4 gotas de fixador Carnoy (álcool metílico: ácido acético 3:1), para interromper o processo de hipotonização.
8. Centrifugar durante 5 minutos à 900 rpm, descartando o sobrenadante.
9. Adicionar, com cuidado, 5 mL do fixador Carnoy, deixando escorrer através da parede do tubo.
10. Ressuspender cuidadosamente o material com auxílio de uma pipeta Pasteur.
11. Repetir os itens 7 a 9 por mais duas vezes.
12. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar fixador em quantidade suficiente para obter uma suspensão celular de boa concentração (cerca de 1 mL de fixador para cada 0,5 mL de sedimento).
13. Ressuspender com cuidado e guardar em tubos de Ependorff no freezer (-18°C) ou trabalhar.

#### 4.3. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

1. Limpar as lâminas.
2. Secar as lâminas com auxílio de um papel toalha.
3. Pingar 10 µl da suspensão celular gelada sobre a lâmina e deixar secar em temperatura ambiente.
4. Armazenar em caixas de plástico até o momento da aplicação das diferentes técnicas citogenéticas.

#### 4.4. COLORAÇÃO CONVENCIONAL

1. Lâminas com material citológico são coradas com Eosina Azul de Metileno, segundo Giemsa (Merck).
2. Para este procedimento diluir 0,4 mL de corante em 3 mL de tampão fosfato pH 6,8 (solução final a 10%, quantidade estabelecida para cada lâmina).
3. Despeja-se sobre a lâmina a solução, deixando corar por 10 minutos.
4. Lavar com água destilada e deixa-se secar.

#### 4.5. IDENTIFICAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (NOR)

A técnica de Ag-NOR consiste em evidenciar as Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR-nucleolus organizer regions) que estavam ativas na interfase precedente através da

marcação com nitrato de prata. A técnica seguiu o protocolo de Howell & Black (1980), com adaptações.

1. Colocar as lâminas sobre um suporte e sobre elas pingar em média duas gotas de solução de gelatina (0,2g de gelatina + 10 ml de água deionizada a 60 °C + 0,15µl de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (1g de AgNO<sub>3</sub> + 2ml de água destilada) a 50%.
2. Cobrir a lâmina com uma lamínula.
3. Inverter a lâmina e colocar em uma câmara úmida escura, devidamente fechada.
4. Colocar em um banho-maria a 60 °C, por um tempo em torno de 5 minutos, até a lâmina adquirir uma coloração marrom escuro.
5. Lavar a lâmina e deixar secar
6. Corar a lâmina por 1 minuto com solução de Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6.8 a uma diluição de 3:1.

#### 4.6. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído de tecido muscular fixado em etanol 100% utilizando o método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russel (2001) que consiste em:

1. Colocar 20 mg de tecido muscular macerado em um tubo eppendorf.
2. Adicionar 300 µL de tampão de homogeneização + 300 µL de tampão de lise + 20 µL de proteinase K (10ng/mL).
3. Homogeneizar e incubar em banho-maria por 30 minutos à 55° C.
4. Agitar delicadamente a cada dez minutos.
5. Deixar em *overnight*, para que haja uma melhor digestão.
6. Retirar do banho-maria e deixar resfriar em temperatura ambiente.
7. Adicionar 700 µL de fenol tamponado, misturar suavemente por dez minutos.
8. Centrifugar à 1400 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos.
9. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para outro eppendorf.
10. Adicionar 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).
11. Misturar por dez minutos e centrifugar à 1400 rpm por dez minutos.
12. Retirar a camada superior e transferir para um novo eppendorf.
13. Adicionar 100 µL de acetato de sódio (3m, pH = 4,8), e misturar.
14. Adicionar 700 µL de isopropanol para precipitar o DNA.

15. Centrifugar por dez minutos à 1400 rpm e descartar o sobrenadante.
16. Secar o DNA à 37° C (15 a 25 minutos).
17. Dissolver em tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0; tris = hidroximetilaminometano).
18. Depois de completamente dissolvido, manter o DNA a -20°C em tubos de 1,5 mL.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com corante GelRed (0,1 µL/mL) (Sambrook & Russell, 2001) e visualizado em transiluminador (Hoefler UV-25), sob luz ultravioleta. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram também avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer -Thermo Fisher Scientific), por meio da comparação de absorbância a 260-280 nm.

#### 4.7. ISOLAMENTO DE DNAS REPETITIVOS

As sequências dos genes ribossomais foram amplificadas por Reação de cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos descritos por Komiya & Takemura (1979): *primers* 5SF (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5SR (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC). Para os genes de RNAr 18S foi utilizado o conjunto de *primers* 18SF (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT) e 18SR (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA), construído a partir da sequência do gene RNAr 18S descrita no NCBI (nº de acesso: AF021880) para o peixe *Ictalurus punctatus*.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1%, imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com corante GelRed (0,1 µL/mL) (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), e submetidos à eletroforese a 110 V/150A. Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador (Hoefler UV-25), sob luz ultravioleta e a fotodocumentação destes foi realizada com o programa computacional EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 -Kodak Digital Science 1D). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com marcador de peso molecular conhecido.

#### 4.8. MARCAÇÃO DAS SONDAS

Após padronização das PCRs para cada um dos iniciadores, foram obtidas as sondas através de PCR utilizando incorporação de dUTP biotilado (Invitrogen), ou por Nick-Translation com o kit Bionick (Invitrogen) para marcação com biotina, e Dig-nick (Roche) para as marcações com digoxigenina.

#### 4.9. TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE COM SONDAS DE DNAS REPETITIVOS

Esta técnica foi realizada segundo Pinkel *et al.* (1986) com modificações:

1. Sobre uma lâmina citologicamente preparada pingar 200  $\mu$ L de solução contendo RNase (1  $\mu$ L de RNase para cada 100  $\mu$ L de 2 x SSC).
2. Cobrir a lâmina com parafilme por 20 min.
3. Colocar a lâmina em uma solução de pepsina (50 mL de HCl 4,8 N para 500  $\mu$ L de pepsina) por 10 minutos.
4. Lavar a lâmina em 2 x SSC por 3 vezes por 2 minutos em cada.
5. Desidratar os cromossomos em uma bateria de álcool (2x70% por 2 minutos, 2x90% por 2 minutos cada e 1x100% por 15 minutos).
6. Deixar as lâminas em estufa a 60° C por 1 hora.
7. Para a desnaturação cromossômica, mergulhar a lâmina em uma solução de formamida 70%, imersa no banho maria a 65°C por 55 segundos.
8. Desidratar novamente os cromossomos em uma bateria de álcool (1x70% gelado por 4 minutos, 1x70% por 2 minutos, 2x90% por 2 minutos cada e 1x100% por 15 minutos).
9. Desnaturar a sonda previamente preparada (2 $\mu$ L de sonda + 10 $\mu$ L de tampão de hibridização) a 70° C por 15 minutos.
10. Pingar os 12 $\mu$ L de solução contendo a sonda na lâmina, cobrir com lamínula e deixar hibridizar durante 48 horas em estufa a 37° C.
11. Retirar a lamínula e colocar a lâmina em formamida 50% a 42° C por 5 minutos.
12. Colocar a lâmina em 2 x SSC a 42° C por 2 vezes por 5 minutos em cada.
13. Colocar a lâmina em detergente 4 x Tween (200 mL de 4 x SSC para 100  $\mu$ L de Tween) a 42° C por 5 minutos.
14. Pingar 200  $\mu$ L de solução de detecção (0,3 $\mu$ L de Cy3 – avidina para 100 $\mu$ L de 4 Tween), cobrir com lamínula e deixar em estufa a 37° C por 30 minutos.
15. Retirar a lamínula e lavar a lâmina em 4 Tween em temperatura ambiente 3 vezes por 3 minutos cada.

16. Adicionar 7 $\mu$ l de DAPI-Anti-fading Vectashield, colocando-se uma lamínula sobre a lâmina e realizando a retirada do excesso de Anti-fading com papel absorvente.
17. Selar a lamínula com esmalte e levar para observação em microscópio de fluorescência em ambiente escuro.

#### 4.10. CAPTURA DE IMAGENS

Metáfases coradas pela técnica de coloração convencional foram capturadas em microscópio Olympus BX41 e com câmera digital CCD 1300QDS. Metáfases de lâminas previamente hibridizadas foram capturadas utilizando o software Nis-Elements no microscópio Nikon H550S.

#### 4.11. MONTAGEM E DISPOSIÇÃO CROMOSSÔMICA

Os cariótipos foram montados e organizados de acordo com a classificação morfológica dos cromossomos (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos), proposta por Levan *et al.* (1964), dispostos aos pares e em ordem decrescente de tamanho. A edição das imagens foi feita com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

## 5. RESULTADOS

Artigo publicado na revista Zebrafish. Fator de impacto: 2,242. (Anexo 1)

### **Localização *in situ* de sítios ribossômicos em *Peckoltia* e *Ancistomus* (Loricariidae: Hypostominae) da bacia Amazônica.**

#### **RESUMO**

Loricariidae é um diversificado grupo de peixes da região neotropical, ocupando uma grande variedade de ambientes de água doce. Os dados citogenéticos trouxeram informações importantes sobre a diversidade de Loricariidae porque ajudaram a validar espécies ainda não descritas, bem como a nossa compreensão da diversidade inter-intraespecífica. No entanto, as abordagens citogenéticas convencionais são limitadas na sua capacidade de detectar a variabilidade em algumas linhagens, como se observa no clado *Peckoltia*, devido ao seu cariótipo aparente conservado. Assim, o objetivo do presente trabalho foi mapear sítios ribossômicos (rDNA) 5S e 18S em cinco espécies de *Peckoltia* e uma espécie de *Ancistomus* da bacia amazônica e discutir os mecanismos de organização e diversificação desses clusters. As espécies analisadas foram encontradas com  $2n = 52$  e compartilham  $FC = 38m-sm + 14st-a$  cromossomos, exceto *P. vittata* com  $FC = 34m-sm + 18st-a$ . Foram observadas variações extensas no número e localização dos sítios de rDNA 5S e 18S entre as espécies. Esses dados indicam que as inversões não são os únicos eventos mais importantes na evolução do cariótipo neste grupo e devem ser úteis na identificação das espécies estudadas aqui. Além das inversões, as transposições são importantes eventos evolutivos envolvidos, pelo menos, em clusters de rDNA que se espalham em *Peckoltia* e provavelmente em outras espécies de Hypostominae.

**Palavras-chave:** DNA repetitivo, família multigênica, genes sintênicos, peixes ornamentais da Amazônia.

## ABSTRACT

Loricariidae is a diverse group of fish from the neotropical region, occupying a wide variety of freshwater environments. Cytogenetic data have brought important insights into Loricariidae diversity because they help validate undescribed species as well as our understanding of inter- and intraspecific diversity. However, conventional cytogenetic approaches are limited in their ability to detect variability in some lineages, as seen in the *Peckoltia* clade, owing to their apparent conserved karyotype. Thus, the aim of the present work was to map 5S and 18S ribosomal (rDNA) sites in five species of *Peckoltia* and one species of *Ancistomus* from the Amazon basin and discusses the mechanisms of organization and diversification of these clusters. The species analyzed were found to have  $2n = 52$  and share  $KF = 38m-sm+14st-a$  chromosomes, except *P. vittata* with  $KF = 34m-sm+18st-a$ . Extensive variations in the number and location of 5S and 18S rDNA sites were observed among species. These data indicate that inversions are not the most important events in karyotype evolution in this group and should prove useful in identifying the species studied here. In addition to inversions, transpositions are important evolutionary events that are involved at least in rDNA clusters spreading in *Peckoltia* and probably in other species of Hypostominae.

**Key-words:** repetitive DNA, multigene family, syntenic genes, ornamental Amazon fish.

## INTRODUÇÃO

Loricariidae é um diversificado grupo de peixes (cerca de 951 espécies válidas) da região neotropical, ocupando uma grande variedade de ambientes de água doce (Isbrücker, 1980; Armbruster, 2004; Eschmeyer & Fong, 2017). Esta família é composta por seis subfamílias, sendo Hypostominae a mais rica em espécies e o maior número de espécies cariotipadas (Kavalco et al., 2005). Hypostominae, por sua vez, é composta por sete clados (*Chaetostoma*, *Pseudancistrus*, *Lithoxus*, *Pseudancistrus*, *Acanthicus*, *Hemiancistrus* e *Pekoltia*) e duas tribos (Ancistrini e Hypostomini) (Lujan et al., 2015). As tribos Hypostomini e Ancistrini as mais estudadas em termos citogenéticos, indicam uma ampla divergência de cariótipo entre Hypostomini ( $2n = 64 - 80$ ) e Ancistrini ( $2n = 34-54$ ) (Mariotto et al., 2011; Traldi et al., 2012; Bueno et al., 2014; Favarato et al., 2016).

Os dados citogenéticos fornecem informações importantes sobre a diversidade de Loricariidae, pois eles validam espécies não descritas e ajudam na compreensão da diversidade inter-intraespecífica (Cardoso et al., 2013, 2016; Silva et al., 2014). No entanto, entre as espécies do clado *Pekoltia*, somente a determinação do número de cromossomos não é suficiente para resolver essas questões, porque a maioria das espécies exibe um número diploide ( $2n$ ) estável (Cardoso et al., 2013, 2016; Silva et al., 2014; Ayres-Alves et al., 2017). Assim, o uso de outros marcadores cromossômicos, é necessário para esclarecer a organização genômica dessas espécies e entender sua diversidade.

O mapeamento físico de DNAs repetitivos tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta importante no estudo de problemas taxonômicos e evolutivos em peixes, bem como para entender os processos de organização genômica e diversificação (Kazazian, 2004; Martins & Wasko, 2004; Biémont, 2002). De acordo com Kidwell (2002), tais sequências também podem estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações, inversões e translocações, sendo responsáveis pelas variações cariotípicas observadas em muitos grupos. Desta forma, os DNAs repetitivos constituem um importante marcador cromossômico, sendo útil para estudos citogenéticos. Foram realizados estudos citogenéticos em Loricariidae com sondas de rDNAs 18S e 5S em vários gêneros de Loricariidae: *Ancistrus* (Mariotto et al., 2011; Favarato et al., 2016), *Harttia* (Centofante et al., 2006; Blanco et al., 2014; Blanco et al., 2017) *Hypancistrus* (Cardoso et al., 2016; Silva et al., 2014) *Hypostomus* (Traldi et al., 2012, 2013; Pansonato et al., 2013; Rubert et al., 2016), entre outros. Tais estudos mostraram grande variação no número desses sítios e em suas localizações.

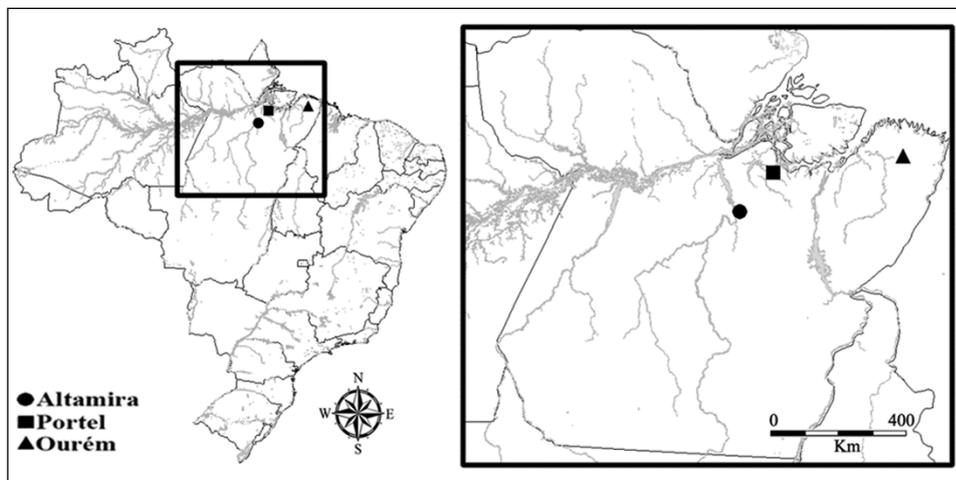
*Peckoltia* é um gênero do clado *Peckoltia* com 18 espécies reconhecidas distribuídas nas bacias Amazônica e do Orinoco e no escudo da Guiana, várias das quais são exploradas no comércio ornamental (Armbruster, 2008; Armbruster & Werneke, 2015; De Oliveira *et al.*, 2012). Os dados citogenéticos clássicos só estão disponíveis para *P. vittata* do rio Xingu e *Peckoltia* sp. 1 e *Peckoltia* sp. 2 do rio Jari, ambos com 52 cromossomos e divergências na fórmula do cariótipo (Tabela 3) (Souza *et al.*, 2009). O gênero *Peckoltia* em si é um táxon historicamente problemático que muitas vezes é confundido com *Hemiancistrus* (Armbruster, 2004, 2008). De acordo com Lujan *et al.* (2015), *Ancistomus* é um gênero válido para o clado *Peckoltia*, incluindo o "*Peckoltia*" *feldbergae* neste gênero. Portanto, é necessário cariotipar outras espécies e usar outros marcadores cromossômicos para entender o processo de diversificação cariotípica neste gênero. Assim, os objetivos do presente trabalho foram mapear os sítios de rDNA menores e maiores nos cariótipos de cinco espécies de *Peckoltia* mais uma espécie de *Ancistomus* da bacia Amazônica e discutir os mecanismos de organização e diversificação desses *clusters*.

**Tabela 3: Compilação de dados cromossômicos de espécies de *Peckoltia*.**

<b>Espécies</b>	<b>2n</b>	<b>FC</b>	<b>Referências</b>
<i>Ancistomus feldbergae</i>	52	38m+sm, 14st	Presente trabalho
<i>Peckoltia vittata</i>	52	36m+sm, 14st, 2a	Souza et. al., 2009
<i>Peckoltia</i> sp.1	52	44m+sm, 6st, 2a; +1B	Souza et. al., 2009
<i>Peckoltia</i> sp. 2	52	32m+sm, 18st, 2a	Souza et. al., 2009
<i>Peckoltia cavatica</i>	52	38m+sm, 14st	Presente trabalho
<i>Peckoltia multispinis</i>	52	28m+sm, 24st	Presente trabalho
<i>Peckoltia oligospila</i>	52	38m+sm, 14st	Presente trabalho
<i>Peckoltia sabaji</i>	52	38m+sm, 14st	Presente trabalho
<i>Peckoltia vittata</i>	52	32m+sm, 18st, 2a	Presente trabalho

## MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, analisamos amostras de uma espécie do gênero *Ancistomus* e cinco espécies do gênero *Peckoltia* (Figura 5 e 6). As coletas das amostras foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Pará (SEMA-PA); licença 020/2005. Os animais foram anestesiados com eugenol e os cromossomos foram obtidos como descrito por Bertollo *et al.*, (1972), Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) foram detectadas usando  $\text{AgNO}_3$ , conforme descrito por Howell e Black (1980), e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada seguindo o método de Martins e Galetti (1999), utilizando sondas para rDNA 5S e 18S, marcados com biotina ou digoxigenina usando a técnica de Nick-Translation e detectados com avidina-Cy3 ou anti-digoxigenina-FITC, respectivamente. Os cariótipos foram classificados como descrito por Levan *et al.*, (1964), dispostos aos pares e em ordem decrescente de tamanho. A edição das imagens foi feita com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.



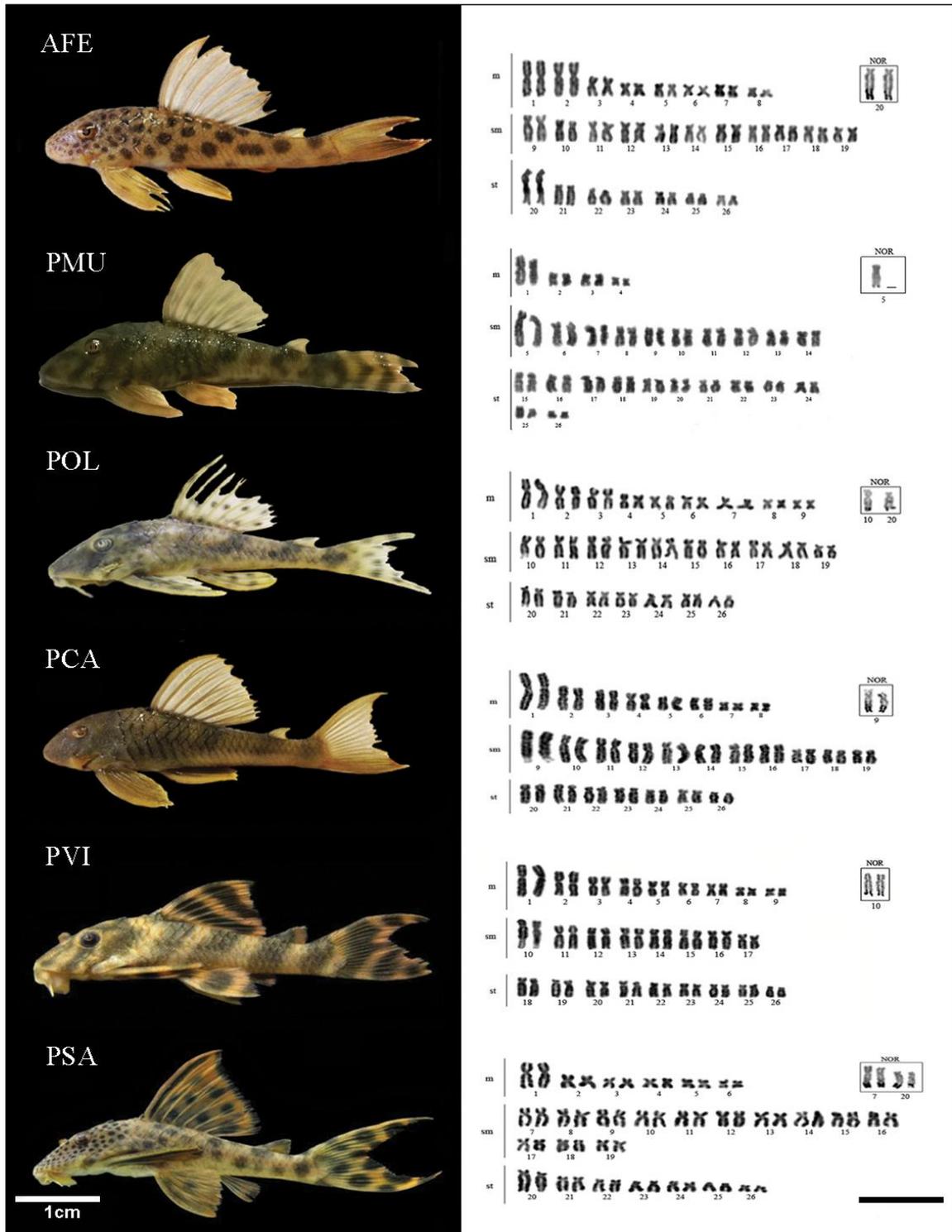
**Figura 5:** Localidades das amostras analisadas no presente estudo. No município de Altamira (*A. feldbergae*, *P. multispinis*, *P. sabaji* e *P. vittata*), no município de Portel (*P. Cavatica*) e no município de Ourém (*P. oligosipla*)

## RESULTADOS

As seis espécies analisadas no presente estudo apresentaram um número diploide ( $2n$ ) de 52 cromossomos. Além disso, a maioria das espécies possui 38 cromossomos meta-

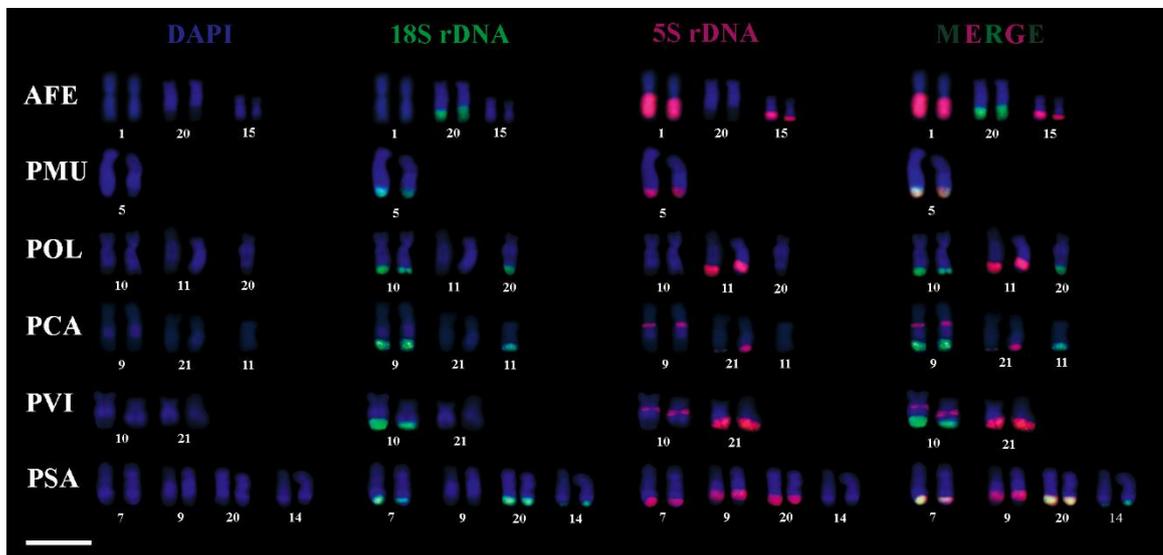
submetacêntricos e 14 subtelo-acrocêntricos, exceto *P. vittata*, que têm 34 cromossomos meta-submetacêntricos e 18 subtelo-acrocêntricos (Figura 6).

A impregnação de NOR com  $\text{AgNO}_3$  indicou uma NOR simples em *A. feldbergae* na região terminal de 20q, em *P. cavatica* na região terminal de 9q, em *P. multispinis* na região terminal do homólogo de 5q e em *P. vittata* na região terminal de 10q, enquanto que NOR múltiplas foram indicadas em *P. oligospila* para cada região terminal nos homólogos de 10q e 20q e em *P. sabaji* nas regiões terminais de 7q e 20q (Figura 6).



**Figura 6:** Espécies de *Ancistomus* e *Peckoltia* analisadas no presente trabalho (esquerda, escala = 1 cm) e seus respectivos cariótipos (direita, Bar = 10 µm). AFE - *A. feldbergae*; PMU - *P. multispinis*; POL - *P. oligospila*; PCA - *P. cavatica*; PVI - *P. vittata*; PSA - *P. sabaji*.

A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S foi divergente entre as seis espécies (Figura 7). Em *P. multispinis*, 18S e 5S rDNA foram colocalizados no par 5q; em *A. feldbergae*, os sítios de rDNA 18S no par 20q e sítios de rDNA 5S nos pares 1q e 15q; em *P. oligospila*, os sítios de rDNA 18S nos pares 10q e 20q e sítios de rDNA 5S no par 11q; em *P. cavatica*, os sítios de rDNA 18S nos pares 9q e 11q e sítios de rDNA 5S nos pares 9q e 21q; em *P. vittata*, os sítios de rDNA 18S no par 10q e sítios de rDNA 5S nos pares 10q e 21q; em *P. sabaji*, os sítios de rDNA 18S nos pares 7q, 14q e 20q e sítios de rDNA 5S nos pares 7q, 9q e 20q. A maioria dos sítios de rDNA está em uma localização terminal, com exceção de um sítio de rDNA 5S que está localizado na região proximal em *P. cavatica* e *P. vittata*. Além disso, os sítios das duas classes de rDNA estão localizados em diferentes cromossomos como em *A. feldbergae* e *P. oligospila*. No entanto, os sítios de rDNA 18S e 5S no mesmo cromossomo, como em *P. cavatica* e *P. vittata*, e alguns foram colocalizados, como em *P. multispinis* e *P. sabaji*. Além disso, os heteromorfismos de tamanho intraespecíficos dos clusters de rDNA foram observados nas seis espécies.



**Figura 7:** Mapeamento cromossômico do rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) em espécies de *Ancistomus* e *Peckoltia*. AFE - *A. feldbergae*; PMU - *P. multispinis*; POL - *P. oligospila*; PCA - *P. cavatica*; PVI - *P. vittata*; PSA - *P. sabaji*. Bar = 10  $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

As seis espécies analisadas no presente estudo exibiram um cariótipo  $2n = 52$ , que se supõe ser uma sinapomorfia de Ancistrini (Artoni & Bertollo, 2001) e é compartilhada com espécies congêneres (Tabela 1) (Alves *et al.*, 2003). Apesar disso, existem algumas divergências na morfologia cromossômica, que devem resultar de inversões, principalmente as pericêntricas. As inversões foram identificadas como a principal fonte de evolução do cariótipo em Ancistrini. No entanto, as inversões não são os únicos eventos envolvidos na reorganização cromossômica em Ancistrini. Os eventos de fusão Robertsoriana e a redução no número diplóide são fontes de diversificação na evolução cromossômica das espécies do clado (Figura 8) (Mariotto *et al.*, 2011; Favarato *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2013, 2016; Silva *et al.*, 2014; Ayres-Alves *et al.*, 2017; De Oliveira *et al.*, 2006; Prizon *et al.*, 2016; Rocchi *et al.*, 2012). A reposição centromérica também poderia explicar essa variação, pois esse mecanismo pode alterar a morfologia do cromossomo sem modificar o número cromossômico (Artoni & Bertollo, 2001; Prizon *et al.*, 2016; Montefalcone *et al.*, 1999).

Uma pequena diferença na fórmula cariotípica também foi detectada entre *P. vittata* analisada no presente estudo e as descritas por Souza *et al.*, (2009), considerando que ambas as amostras eram do rio Xingu. É possível que a inversão cromossômica tenha ocorrido durante a divergência simpátrica dos dois cariomorfos. No entanto, a combinação de gametas em cromossomos de populações polimórficas pode levar a uma diferença no cariótipo (Rosa *et al.*, 2012).

O mapeamento de FISH e a análise Ag-NOR revelaram a ocorrência de locais inativos de rDNA 18S em *P. cavatica*, *P. multispinis* e *P. sabaji*. Da mesma forma, o mapeamento de sequências de rDNA 5S revelou uma organização dinâmica dessas sequências entre espécies: enquanto *P. multispinis* e *P. oligospila* têm um único sítio, as outras espécies têm dois ou três sítios (Bueno *et al.*, 2014; Ayres-Alves *et al.*, 2017; De Oliveira *et al.*, 2006; Prizon *et al.*, 2016). Além disso, identificamos casos em que os sítios do rDNA menor (5S) e do maior (18S) estavam em diferentes pares cromossômicos e casos em que essas duas classes de rDNA eram sintênicas e mesmo colocalizadas, como observado em Neopleocostominae, Hypoptopomatinae (Ziemniczak *et al.*, 2012), Loricarininae (Kavalco *et al.*, 2005), Hypostominae (Mariotto *et al.*, 2011; Favarato *et al.*, 2016; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2012) e a família Trichomycteridae (Ziemniczak *et al.*, 2012). Este tipo de rearranjo dessas sequências não é comum em espécies de peixes, uma vez que tende a favorecer eventos

de *crossing over* desiguais e conversão de genes (Rosa *et al.*, 2012). Apesar disso, a colocalização de rDNA 5S e 18S foi observada em algumas espécies de Loricariidae, incluindo os Ancistrini (Mariotto *et al.*, 2011; Favarato *et al.*, 2016; Prizon *et al.*, 2016). No entanto, a organização não sintênica de sítios de rDNA menor e maior é a organização mais frequentemente observada em espécies desta tribo. De acordo com Zienmiczak *et al.*, (2012), a sintonia entre as duas classes de rDNA em um único par de cromossomo é uma condição plesiomórfica para Loricariidae. Como proposto por Mariotto *et al.*, (2011) o cariótipo ancestral no gênero *Ancistrus* é semelhante ao apresentado por *Ancistrus claro* (Figura 4), que possui  $2n = 54$  cromossomos, um alto número fundamental e um par de cromossomos com sítios de rDNA 5S e 18S sintênicos. Para as mesmas características, exceto para o  $2n$ , podemos observar em *P. cavatica* e *P. vittata* a presença de um sítio de rDNA 5S na região intersticial no mesmo cromossomo com uma NOR simples, que pode ser uma condição primitiva remanescente para o clado *Peckoltia*, como encontrado em *Hypancistrus cf. debilitera* (Silva *et al.*, 2014) e *Panaqolus* sp. (Ayres-Alves *et al.*, 2017), pertencentes ao mesmo clado, e no gênero *Ancistrus* (Mariotto *et al.*, 2011; Favarato *et al.*, 2016; Prizon *et al.*, 2016, Ribeiro *et al.*, 2015), que é da mesma subfamília Hypostominae (Lujan *et al.*, 2015).

Os dados relativos à organização dos *clusters* de rDNA indicam que outros tipos de rearranjos cromossômicos, além de inversões, deveriam ter ocorrido durante a divergência do cariótipo dessas espécies. As translocações cromossômicas, por exemplo, poderiam explicar a diferença na localização cromossômica dos sítios de rDNA. Esses eventos foram presumivelmente mediados por mecanismos de transposição, que foram documentados para se aplicar a esses tipos de sequências devido à presença comum de elementos transponíveis em associação com rDNAs (Dover, 1986; Eickbush & Eickbush, 2007). Os eventos de reposição, por exemplo, poderiam explicar a diferença no número de sítios de rDNA entre as espécies, uma vez que esses mecanismos podem produzir novas cópias (Zhang *et al.*, 2008). Por outro lado, é possível que a degeneração desses sítios de rDNA tenha ocorrido em algumas espécies. Além disso, foram observados heteromorfismos de tamanho inespecífico de *clusters* de rDNA entre as seis espécies. Isso pode ser explicado por eventos de duplicação mediados por *crossing over* desiguais, eventos que são comumente descritos em espécies de vertebrados (Pendás *et al.*, 1993).

Os dados atuais sobre  $2n$ , FC e localização dos *clusters* de rDNA sugerem que o cariótipo de *Peckoltia*, bem como o de outras espécies de Hypostominae, não é estável. Assim, as inversões podem não ser o mecanismo mais importante de rearranjo do cariótipo nesse grupo,

como se supunha anteriormente. Por sua vez, transposições e duplicações também parecem ser eventos evolutivos importantes, envolvidos na dispersão desses *clusters* de rDNA que se espalham nesse grupo. Além disso, o conjunto de dados gerado aqui pode fornecer marcadores taxonômicos e, portanto, deve ser muito útil na identificação de espécies de *Peckoltia*. Eles também podem fornecer evidências de um mecanismo de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre espécies simpátricas do rio Xingu, como sugerido para *Scobnancistrus aureatus* e *S. pariolispos* (Cardoso *et al.*, 2013).



**Figura 8:** Hipótese da dinâmica cromossômica no clado de *Peckoltia*. (A) Espécies que mantiveram a condição sintênica ancestral. (B) Espécies que quebraram a sintenia. \* Dados obtidos de Mariotto et al (2011). \*\* Condição ancestral com NOR simples e sítios de rDNA 5S sintênicos.

## REFERÊNCIAS

- ALVES AL, OLIVEIRA C, FORESTI F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 2003;56: 57-63.
- ARMBRUSTER JW. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes Loricariidae with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc* 2004;141: 1-80.
- ARMBRUSTER JW. The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Zool J Linn Soc* 2008;1822: 1–76.
- ARMBRUSTER JW, WERNEKE DC, TAN M. Three new species of saddled loricariid catfishes, and a review of *Hemiancistrus*, *Peckoltia*, and allied genera (Siluriformes). *Zool J Linn Soc* 2015;480: 97–123.
- ARTONI RF, BERTOLLO LAC. Trends in the karyotype evolution in the Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 2001;134: 201-210.
- AYRES-ALVES T, CARDOSO AL, NAGAMACHI CN, DE SOUSA LM, PIECZARKA JC, NORONHA RCR. Karyotypic Evolution and Chromosomal Organization of Repetitive DNA Sequences in Species of *Panaque*, *Panaqolus*, and *Scobinancistrus* (Siluriformes and Loricariidae) from the Amazon Basin. *Zebrafish*, 2017;14: 251-260.
- BERTOLLO LAC, TAKASHI CS, MOREIRA-FILHO O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1972;2: 103-120.
- BIÉMONT C, VIEIRA C. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 2006;443: 521-524.
- BUENO V, VENERE PC, KONERAT JT, ZAWADZKI CH, VICARI MR, MARGARIDO VP. Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary tendencies in the genus. *Scientific World Journal* 2014; 2014: Article ID 943825, 8 pages.
- BLANCO DR, VICARI MR, LUI RL, ARTONI RF, ALMEIDA MC, TRALDI JB, *et al.* Origin of the X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes,

Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica* 2014;142: 119-126.

BLANCO DR, VICARI MR, LUI RL, TRALDI JB, BUENO V, MARTINEZ JF, *et al.* Karyotype diversity and evolutionary trends in armored catfish of the genus *Hartia* (Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish* 2017;14: 169-176.

CARDOSO AL, SALES KAH, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, NORONHA RCR. Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. *Comp Cytogenet* 2013; 7:43–41.

CARDOSO AL, CARVALHO HL, BENATHAR TCM, SERRÃO SMG, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, *et al.* Integrated cytogenetic and mitochondrial DNA analyses indicate that two different phenotypes of *Hypancistrus* (L066 and L333) belong to the same species. *Zebrafish* 2016; 13: 209-216.

CENTOFANTE L; BERTOLLO LAC; MOREIRA-FILHO O. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res.* 2006;12: 320-4.

DE OLIVEIRA RR, SOUZA IL, VENERE PC. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spiloma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotrop Ichthyol* 2006; 4:93-97.

DE OLIVEIRA RR, PY-DANIEL LR, ZUANON J, ROCHA MS. A new species of ornamental catfish genus *Peckoltia* (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu Basin, Brazilian Amazon. *Copeia* 2012;3: 547-553.

DOVER GA. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetics* 1986;2: 159-165.

EINCKBUSH TH, EINCKBUSH DG. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 2007;175: 477-485.

ESCHMEYER WN, FONG JD. *Catalog of fishes*. California Academy of Sciences. 2017. Available at

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.

Accessed Aug 8, 2017.

FAVARATO RM, SILVA M, OLIVEIRA RR, ARTONI RF, FELDBERG E, MATOSO DA. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 2016;13: 103-111

HOWELL WM, BLACK DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980;36: 1014–1015.

ISBRÜCKER IJH. Classification and Catalogue of the Mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). (Verslagen en technische Gegevens). Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, 1980.

KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 2005;94: 180–186.

KAZAZIAN HH. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 2004; 303: 1626-1632.

KIDWELL MG. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 2002;115: 49-63.

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 1964;52: 201–220.

LUJAN NK, ARMBRUSTER JW, LOVEJOY NR, LÓPEZ-FERNÁNDEZ H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenet Evol* 2015;82: 269–288.

MARIOTTO S, CENTOFANTE L, VICARI MR, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogen* 2011;5: 289–300.

MARTINS C, GALETTI PM. Chromosome localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 1999;7: 363-367.

MARTINS C, WASKO AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (ed) Focus on Genome Research. Nova Science Publishers, Hauppauge. 2004; 289-318.

MONTEFALCONE G, TEMPESTA S, ROCCHI M, ARCHIDIACONO N. Centromere Repositioning. *Genome Res* 1999;9: 1184-1188.

PANSONATO-ALVES JC, SERRANO EA, UTSUNOMIA R, SCACCHETTI PC, OLIVEIRA C, FORESTI C. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fish* 2013;23: 477–489.

PENDÁS AM, MORÁN P, GARCIA-VÁZQUEZ E. Ribosomal RNA genes are interdispersed throughout a heterochromatin chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Gen Res* 1993;63: 128-130.

PRIZON AC, BORIN-CARVALHO LA, BRUSCHI DP, RIBEIRO MO, BARBOSA LM, FERREIRA GEB, *et al.* Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. *Comp Cytogen* 2016;10: 625-636.

RIBEIRO MO, NOLETO RB, LORSCHIEDER CA, PORTO FE, PRIZON AC, ZAWADZKI CH, *et al.* Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçu River basin, southern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 2015;14: 4051-4057.

ROCCHI M, ARCHIDIACONO N, SCHEMPP W, CAPOZZI O, STANYON R. Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 2012;108: 59–67.

ROSA KO, ZIEMNICZAK K, DE BARROS AV, NOGAROTO V, ALMEIDA MC, CESTARIMM, *et al.* Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae) fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fisheries* 2012;22: 739–749.

RUBERT M, DA ROSA R, ZAWADZKI CH, MARIOTTO S, MOREIRA-FILHO O, *et al.* Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): diversity analysis of the sites. *Zebrafish*, 2016;13: 360-8.

SILVA M, RIBEIRO ED, MATOSO DA, SOUSA LM, HRBEK T, PY-DANIEL LR, *et al.* Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. *Genetica* 2014;142: 127-139.

SOUZA ACP, NAGAMACHI CY, MILHOMEM SSR, FELDBERG E, PIECZARKA JC. Cytogenetics analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). *Comp Cytogenet* 2009;3: 103-109.

TRALDI JB, VICARI MR, BLANCO DR, MARTINEZ JF, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comp Cytogenet* 2012;6: 115–125.

TRALDI JB, BLANCO DR, VICARI MR, MARTINEZ JF, LUI RL, BARROS AV, *et al.* Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res* 2013; 12: 463-471.

ZHANG X, EICKBUSH MT, EICKBUSH TH. Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 2008;180: 1617-1626.

ZIEMNICZAK K, BARROS AV, ROSA KO, NOGAROTO V, ALMEIDA MC, CESTARI MM, *et al.* Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool* 2012;79: 1–10.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho foram as primeiras descrições para as espécies *Ancistomus feldbergae*, *P. cavatica*, *P. multispinis*, *P. oligospila* e *P. sabaji*.

O conjunto de dados cromossômicos obtidos para as espécies de *Peckoltia* indica a conservação do número diplóide igual a 52 cromossomos, sendo uma característica compartilhada com as espécies congêneres, porém com divergência na fórmula cariotípica.

Observou-se uma variação no número e localização das NORs. No entanto, todas as marcações encontram-se na região terminal do braço longo dos cromossomos portadores, demonstrando uma característica conservada para as espécies desse gênero.

As espécies estudadas apresentaram heteromorfismo em relação ao tamanho da NOR, sendo esse heteromorfismo melhor observado no FISH com a sonda de rDNA 18S. Heteromorfismos de tamanhos já foram encontradas em outras espécies do clado *Peckoltia* e parece ser uma característica já estabelecida entre as espécies desse grupo.

O *double* FISH com as sondas de rDNA 18S e 5S mostrou que essas espécies possuem colocalização (*P. multispinis* e *P. sabaji*) e sintenia (*P. cavatica* e *P. vittata*) desses genes. Esses resultados contribuem ainda mais com as hipóteses de rearranjos cromossômicos.

Neste trabalho foi possível caracterizar seis espécies do clado *Peckoltia*, contribuindo com maior número de dados cromossômicos a respeito do grupo e os resultados obtidos nos permitiu fazer inferências sobre possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cromossômica das espécies. No entanto, devido ao seu grande número de espécies, são necessários mais estudos para que possa se compreender a história evolutiva deste grupo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATA RA; FERREIRA DC; FORESTI F; OLIVEIRA C (2010) Molecular cytogenetic study of heterochromatin in *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Hereditas*. 147: 10–17.
- ARMBRUSTER JW. (2004) Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes Loricariidae with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc* 141: 1-80.
- ARMBRUSTER JW. (2008) The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa* 1822, 1–76.
- ARTONI RF and BERTOLLO LAC (2001) Trends in the karyotype evolution in the Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134:201-210.
- AYRES-ALVES T, CARDOSO AL, NAGAMACHI CN, DE SOUSA LM, PIECZARKA JC, NORONHA RCR. (2017) Karyotypic evolution and chromosomal organization of repetitive DNA sequences in species of *Panaque*, *Panaqolus*, and *Scobinancistrus* (Siluriformes and Loricariidae) from the Amazon Basin. *Zebrafish*, 14: 251-260.
- BERTOLLO LAC; TAKASHI CS; MOREIRA-FILHO O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinae). *Brazilian Journal of Genetics* 2:103-120.
- BIÉMONT C & VIEIRA C (2006) Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 443: 521-524.
- BIET E, SUN J AND DUTREIX M. (1999) Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*. 27: 596-600.
- BLANCO DR, VICARI MR, LUI RL, TRALDI JB, BUENO V, MARTINEZ JF, *et al.* (2017) Karyotype diversity and evolutionary trends in armored catfish of the genus *Hartia* (Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish* 14: 169-176.
- BUENO V; VENERE PC; KONERAT JT; ZAWADZKI CH; VICARI MR; MARGARIDO VP (2014) Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède

1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary Tendencies in the Genus. Hindawi Publishing Corporation and Scientific World Journal. Article ID 943825, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/943825>.

CARDOSO AL; SALES KAH; NAGAMACHI CY; PIECZARKA JC; NORONHA RCR (2013) Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. *Comparative Cytogenetics*. 7:43-51.

CARDOSO AL, CARVALHO HL, BENATHAR TCM, SERRÃO SMG, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, *et al.* (2016) Integrated cytogenetic and mitochondrial DNA analyses indicate that two different phenotypes of *Hypancistrus* (L066 and L333) belong to the same species. *Zebrafish* 13: 209-216.

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

CIOFFI MB; MARTINS C; BERTOLLO LAC (2010) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolution Biology*. V.10, p. 271.

CRAMER CA; BONATTO SL; REIS RE (2011) Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. V. 59, 43–52.

ESCHMEYER WN, FONG JD (2018) Species by family/subfamily. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesBy-Family.asp>, Acessado em 29 de janeiro de 2018.

FAVARATO RM, SILVA M, OLIVEIRA RR, ARTONI RF, FELDBERG E, MATOSO DA. (2016) Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 13: 103-111.

FERREIRA RO; PEREIRA AL; NAGAMACHI CY; PIECZARKA JC; DE SOUSA LM; NORONHA RCR (2014). Caracterização citogenética de uma espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu, (Pará, Amazônia, Brasil). *Biota Amazônia*. Macapá, v. 4, n. 1, p. 30-36.

- FLAVEL RB (1986) Repetitive DNA and chromosomes. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 312, 227-242.
- GARG, T.K., VALDES DOMINGOS, F.X., ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L (2010) Histochemistry and functional organization of the dorsal skin of *Ancistrus dolichopterus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotrop. Ichthyol.* 8, 877–884.
- GEERINCKX, T., HERREL, A., ADRIAENS, D (2011) Suckermouth armored catfish resolve the paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of *Pterygoplichthys disjunctivus*. *J. Exp. Biol.* 315, 121–131.
- HATANAKA T & GALETTI JRPM. (2002) A polymorphic telomeric-like sequence microsatellite in the neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenet. Gen. Res.* V.98, p. 76-78.
- HOWELL WM, BLACK DA (1980) Controlled silver-staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- ISBRÜCKER IJH. (1980) Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). (Verslagen en technische Gegevens). Universiteit van Amsterdam, Amsterdam.
- JESUS CM; GALETTI JR PM; VALENTINI SR; MOREIRA-FILHO O (2003) Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica.* V. 118, p. 25-32.
- KAZAZIAN HH (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science.* 303: 1626-1632.
- KEDES LH (1979) Histone genes and histone messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 837-870.
- KIDWELL MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica.* 115: 49-63.
- KOMIYA H & TAKEMURA S (1979) Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *J. Biochem.* 86: 1067–1080.
- KONERAT JT; BUENO V; MARGARIDO VP; PORTELA-CASTRO ALB; MARTINS-SANTOS IC (2015) Diversity of sex chromosome systems in Ancistrini (Loricariidae,

Hypostominae): ZZ/ZW in *Ancistrus taunayi* Miranda Ribeiro, 1918. *Cytogenet GenRes* 146:306–310.

LEVAN A; FREDGA K; SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.

LI YC; KORD AB; FAHIMA T; BERLES A; NERO E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465.

LIU Z; LI P; KOCABAS A; KARSI A; JU Z (2001) Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 289: 317-324.

LONG EO & DAWID ID (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*. 49:727-764.

LUJAN NK, ARMBRUSTER JW, LOVEJOY NR, LÓPEZ-FERNÁNDEZ H. (2015) Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenet Evol* 82: 269–288.

LUJAN NK; CRAMER CA; COVAIN R; FISCH-MULLER S; LÓPEZ-FERNÁNDEZ H. (2017) Multilocus molecular phylogeny of the ornamental wood-eating catfishes (Siluriformes, Loricariidae, *Panaqolus* and *Panaque*) reveals undescribed diversity and parapatric clades. *Mol Phylogenet Evol* 109:321–336.

MARIOTTO S; CENTOFANTE L, MIYAZAWA CS, BERTOLLO LAC. and MOREIRA-FILHO O (2009) Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotropical Ichthyology*. 7: 595-600.

MARIOTTO S; CENTOFANTE L; VICARI MR; ARTONI RF; MOREIRA-FILHO O (2011) Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *CompCytogen* 5(4): 289–300. Doi: 10.3897/CompCytogen.v5i4.1757.

MARTINS C. (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Fish Cytogenetics. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.

MARTINS C; CABRAL-DE-MELLO DC; VALENTE GT; MAZZUCHELLI J; OLIVEIRA SG; PINHAL D (2011) Animal genomes under the focus of cytogenetics. Nova Science Publisher, Hauppauge. NY, USA. P. 53-74.

NAGODA N; FUKUDA A; NAKASHIMA Y; MATSUO Y (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. Insect Mol. Biol. 14, 6, 713-717.

PANSONATO-ALVES JC; SERRANP EA; UTSUNOMIA R; SCACCHETTI PC; OLIVEIRA C; FORESTI F (2013) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. Rev Fish Biol Fisheries. 23:477–489. Doi: 10.1007/s11160-013-9303-0.

PARISE-MALTEMPI PP, MARTINS C, OLIVEIRA C AND FORESTI F. (2007) Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. Cytogenetics and Genome Research 116: 218-223.

PINKEL D; STRAUME T; GRAY JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 2934-2938.

PORTO FE; GINDRI BS; VIEIRA MMR; BORIN LA; PORTELA-CASTRO ALB; MARTINS-SANTOS C (2014) Polymorphisms of the nucleolus organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the upper Paraguay River basin indicate an association with transposable elements. Genet. Mol. Res. 13 (1): 1627-1634.

PRIMO CC; GLUGOSKI L, ALMEIDA MC; ZAWADZKI CH; MOREIRA-FILHO O; VICARI MR; *et al.* (2016) Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). 10.1089/zeb.2016.1386.

PROKOPOWICH CD; GREGORY TR; CREASE TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. Genome. 46, 48-50.

REIS RE; PEREIRA EHL; ARMBRUSTER JAW (2006) Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. Zool. J. Linn. Soc. V.147, p. 277–299.

RIBEIRO MO, NOLETO RB, LORSCHIEDER CA, PORTO FE, PRIZON AC, ZAWADZKI CH, *et al.* (2015) Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçú River basin, southern Brazil. Genet. Mol. Res. 14: 4051-4057.

RUBERT M, DA ROSA R, ZAWADZKI CH, MARIOTTO S, MOREIRA-FILHO O, GIULIANO-CAETANO L. (2016) Chromosome Mapping of 18S Ribosomal RNA Genes in Eleven Hypostomus Species (Siluriformes, Loricariidae): Diversity Analysis of the Sites. Zebrafish. 13(4):360-8.

SAMBROOK J & RUSSEL DW (2001) Molecular cloning. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHMIDT T & HESLOP-HARRISON JS (1998) Genomes, genes, and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. Trends in Plant Science. 3: 195-199.

SILVA M; RIBEIRO ED; MATOSO DA; SOUSA LM; HRBEK T; PY-DANIEL LR; *et al.* (2014) Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. Genetica 142:127-139.

SOUZA ACP; NAGAMACHI CY; MILHOMEM SSR; FELDBERG E; PIECZARKA JC (2009) Cytogenetics analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). Comparative Cytogenetics 3(2):103-109.

SUMNER AT (2003) Chromosomes: organization and function (1st edition). London: Blackwell Publishing company.

TRALDI JB, VICARI MR, BLANCO DR, MARTINEZ JF, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O. (2012) First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. Comp Cytogenet 6: 115–125.

TRALDI JB; BLANCO DR; VICARI MR; MARTINEZ JF; LUI RL; ARTONI RF; *et al.* (2013) Physical mapping of (GATA)*n* and (TTAGGG)*n* sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *J. Genet.* 92, 127–130.

XU D; LOU B; BERTOLLO AC; CIOFFI MB (2013) Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome. *Molecular Cytogenetics.* 6:12.

## In Situ Localization of Ribosomal Sites in *Peckoltia* and *Ancistomus* (Loricariidae: Hypostominae) from the Amazon Basin

Ananda Marques Pety,<sup>1</sup> Adauto Lima Cardoso,<sup>2</sup> Cleusa Yoshiko Nagamachi,<sup>1,\*</sup> Julio Cesar Pieczarka,<sup>1,\*</sup> Leandro Melo de Sousa,<sup>3</sup> and Renata Coelho Rodrigues Noronha<sup>1</sup>

### Abstract

Loricariidae is a diverse group of fish from the neotropical region, occupying a wide variety of freshwater environments. Cytogenetic data have brought important insights into Loricariidae diversity because they help validate undescribed species as well as our understanding of inter- and intraspecific diversity. However, conventional cytogenetic approaches are limited in their ability to detect variability in some lineages, as seen in the *Peckoltia* clade, owing to their apparent conserved karyotype. Thus, the aim of this work was to map 5S and 18S ribosomal (rDNA) sites in five species of *Peckoltia* and one species of *Ancistomus* from the Amazon basin, and discusses the mechanisms of organization and diversification of these clusters. The species analyzed were found to have  $2n=52$  and share  $KF=38\text{ m-sm}+14\text{ st-a}$  chromosomes, except *Peckoltia vittata* with  $KF=34\text{ m-sm}+18\text{ st-a}$ . Extensive variations in the number and location of 5S and 18S rDNA sites were observed among species. These data indicate that inversions are not the most important events in karyotype evolution in this group, and should prove useful in identifying the species studied here. In addition to inversions, transpositions are important evolutionary events that are involved at least in rDNA clusters spreading in *Peckoltia* and probably in other species of Hypostominae.

**Keywords:** repetitive DNA, multigene family, syntenic genes, ornamental Amazon fish

### Introduction

LORICARIIDAE IS A DIVERSE GROUP of fish (951 valid species) from the neotropical region, occupying a wide variety of freshwater environments.<sup>1–3</sup> This family is composed of six subfamilies, with Hypostominae being the most species-rich and harboring the largest number of karyotyped species.<sup>4</sup> Hypostominae, in turn, is composed of seven clades (*Chaetostoma*, *Pseudancistrus*, *Lithoxus*, *Pseudancistrus*, *Acanthicus*, *Hemiancistrus*, and *Peckoltia*) and two tribes (Ancistrini and Hypostomini).<sup>5</sup> Data for Hypostomini and Ancistrini, the most studied in cytogenetic terms, indicate a wide divergence of karyotype among Hypostomini ( $2n=64–80$ ) and Ancistrini ( $2n=34–54$ ).<sup>6–9</sup>

Cytogenetic data have provided important insights into Loricariidae diversity because they validate undescribed species and aid understanding of inter- and intraspecific

diversity.<sup>10–12</sup> However, among *Peckoltia* species, the determination of number of chromosomes alone is not useful for resolving these issues, because most species exhibit a stable  $2n$  karyotype.<sup>10–13</sup> Thus, the use of other chromosomal markers is necessary to clarify the genomic organization of these species and understand their diversity.

The physical mapping of repetitive DNAs has been widely used as an important tool in the study of taxonomic and evolutionary problems in fish, as well as to understand the processes of genomic organization and diversification.<sup>14–16</sup> According to Kidwell,<sup>17</sup> such sequences may also be involved in chromosomal rearrangements, such as deletions, duplications, inversions, and translocations, being responsible for karyotypic variations observed in many groups. In this way, the repetitive DNAs constitute an important chromosomal marker, being useful for cytogenetic studies. Cytogenetic studies in Loricariidae have been performed with probes of 18S and 5S

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Para, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório Genômica Integrativa, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil.

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Altamira, Para, Brazil.

\*CNPq Researcher.

TABLE 1. COMPILATION OF CHROMOSOME DATA OF PECKOLTIA SPECIES

Species	2n	KF	Reference
<i>Peckoltia vittata</i>	52	36m+sm, 14st, 2a	Souza <i>et al.</i> <sup>27</sup>
<i>Peckoltia</i> sp.1	52	44m+sm, 6st, 2a; +1B	Souza <i>et al.</i> <sup>27</sup>
<i>Peckoltia</i> sp. 2	52	32m+sm, 18st, 2a	Souza <i>et al.</i> <sup>27</sup>
<i>Peckoltia cavatica</i>	52	38m+sm, 14st	Present work
<i>Peckoltia feldbergae</i>	52	38m+sm, 14st	Present work
<i>Peckoltia multispinis</i>	52	28m+sm, 24st	Present work
<i>Peckoltia oligospila</i>	52	38m+sm, 14st	Present work
<i>Peckoltia sabaji</i>	52	38m+sm, 14st	Present work
<i>Peckoltia vittata</i>	52	32m+sm, 18st, 2a	Present work

rDNAs in several Loricariidae genera: *Ancistrus*,<sup>6,9</sup> *Harttia*,<sup>18–20</sup> *Hypancistrus*,<sup>11,12</sup> *Hypostomus*,<sup>7,21–23</sup> among others. Such studies have shown great variation both in the number of these sites and in their locations.

*Peckoltia* is a genus of the *Peckoltia* clade with 18 recognized species distributed in the Amazon and Orinoco basins and Guiana shield, several of which are exploited in the ornamental trade.<sup>24–26</sup> Classical cytogenetic data are only available for *Peckoltia vittata* from the Xingu River and *Peckoltia* sp. 1 and *Peckoltia* sp. 2 from the Jari River, both with 52 chromosomes and divergences in karyotype formula (Table 1).<sup>27</sup> The genus *Peckoltia* itself is a historically problematic taxon that is often confused with *Hemiancistrus*.<sup>2,24</sup> According to Lujan *et al.*,<sup>5</sup> *Ancistomus* is a valid genus for the *Peckoltia* clade, including "*Peckoltia*" *feldbergae* in this genus. Therefore, it is necessary to identify other species and use other chromosomal markers to understand the process of karyotype diversification in this genus. Thus, the aims of this work were to map the minor and major rDNA sites in the karyotypes of five species of *Peckoltia* plus one species of *Ancistomus* from the Amazon basin and dis-

cuss the mechanisms of organization and diversification of these clusters.

## Materials and Methods

In this study, we analyzed samples from one species of the genus *Ancistomus* and five species of the genus *Peckoltia* (Figs. 1 and 2). Sample collection was authorized by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) and Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Pará (SEMA-PA); permit 020/2005. Animals were anesthetized with eugenol and chromosomes were obtained as described by Bertollo *et al.*<sup>28</sup> Nucleolar organizer regions (NORs) were detected using AgNO<sub>3</sub>, as described by Howell and Black,<sup>29</sup> and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was conducted following the method of Martins and Galetti<sup>30</sup> using probes for 5S and 18S rDNA, labeled with biotin or digoxigenin using nick translation and detected using avidin-Cy3 or antidigoxigenin-FITC, respectively. The karyotypes were classified as described by Levan *et al.*<sup>31</sup>

## Results

The six species analyzed in this study were found to have a diploid number (2n) of 52 chromosomes. Moreover, most species possessed 38 meta-submetacentric and 14 subteloacrocentric chromosomes, except *P. vittata*, which had 34 meta-submetacentric and 18 subteloacrocentric chromosomes (Fig. 2).

Impregnation of NORs with AgNO<sub>3</sub> indicated a single NOR in *A. feldbergae* in the terminal region of 20q, in *Peckoltia cavatica* in the terminal region of 9q, in *Peckoltia multispinis* in the terminal region of the 5q homologue, and in *P. vittata* in the terminal region of 10q, whereas multiple NORs were indicated in *Peckoltia oligospila* for each homologous terminal region in 10q and 20q, and in *Peckoltia sabaji* in the terminal regions of 7q and 20q (Fig. 2).

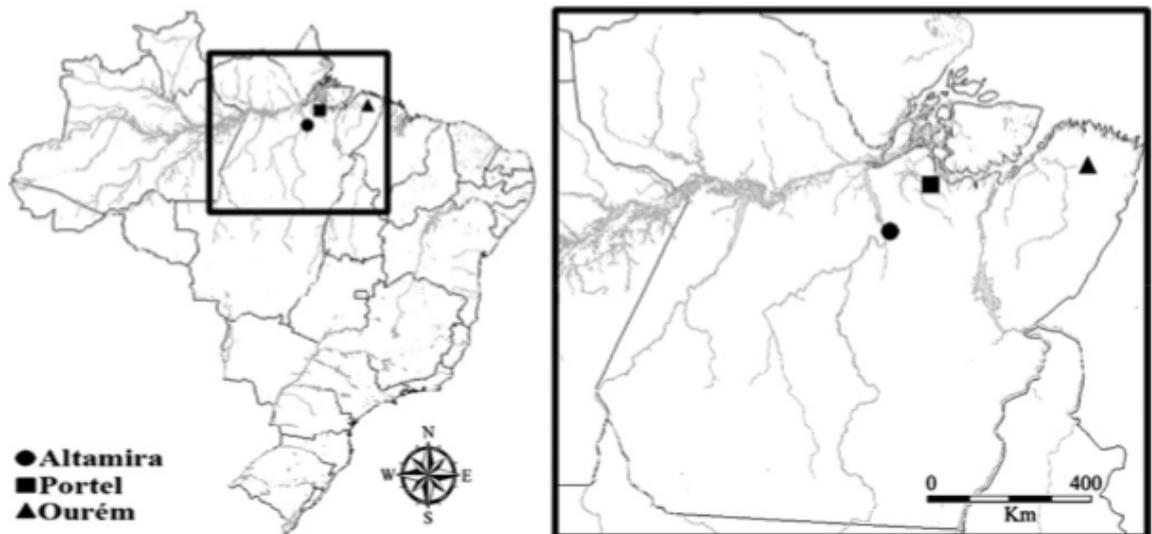
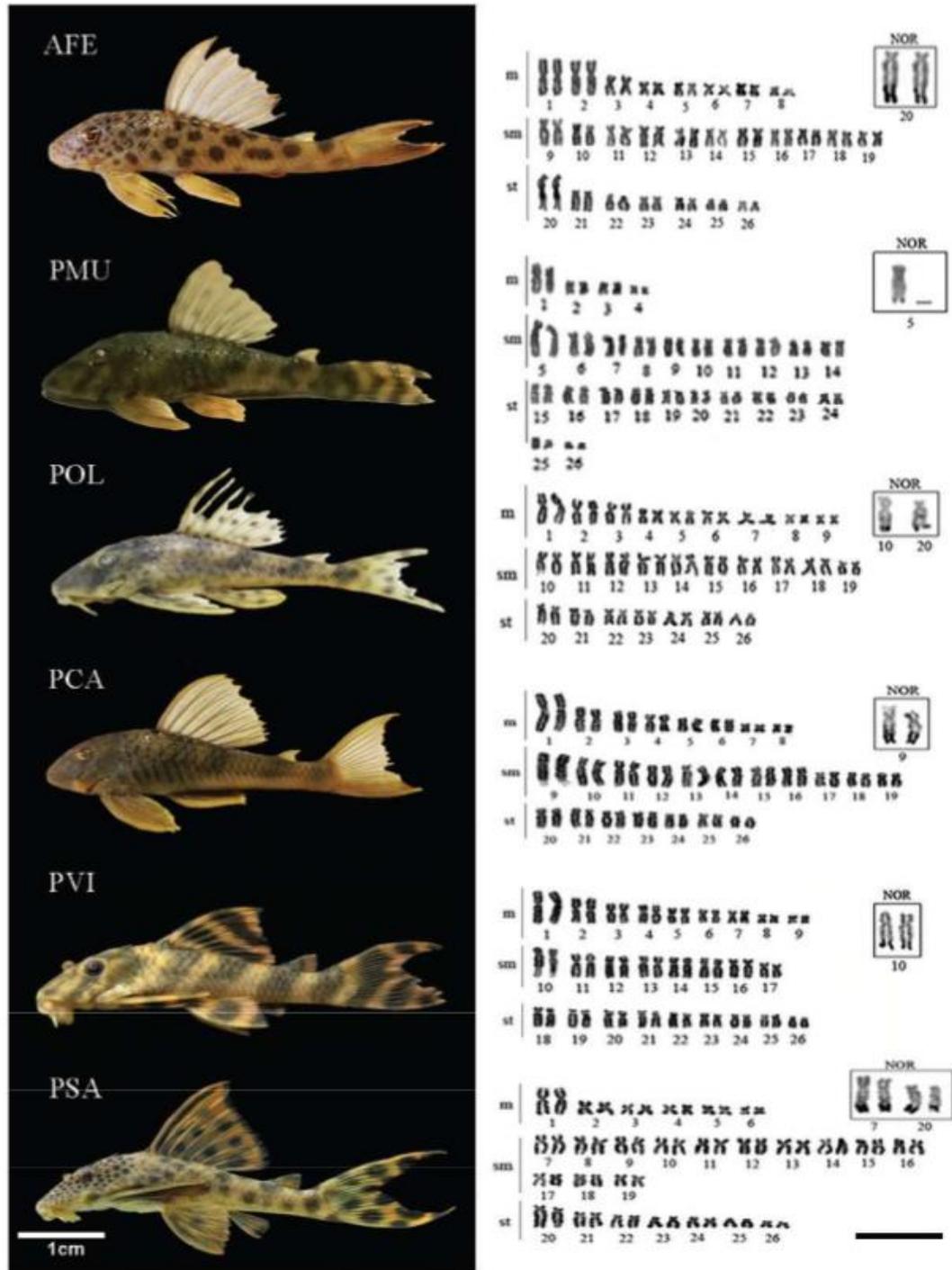
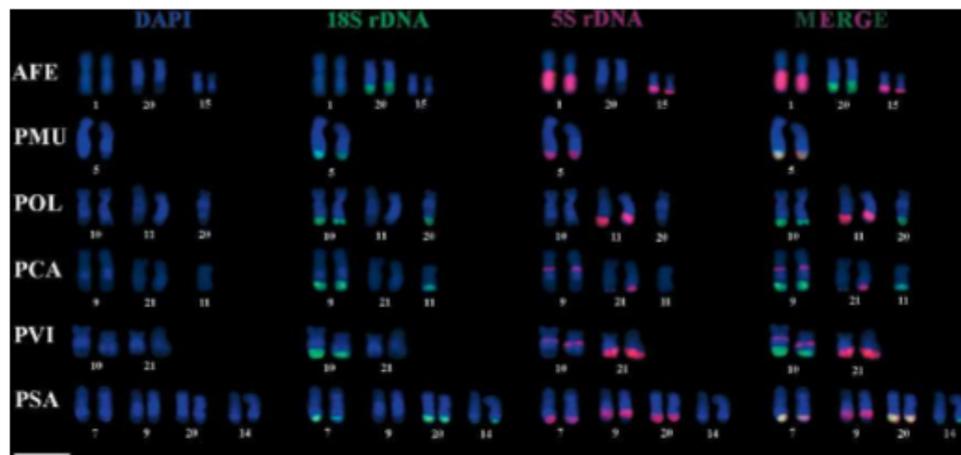


FIG. 1. Localities of the samples analyzed in this study.



**FIG. 2.** Species of *Ancistomus* and *Peckoltia* analyzed in this work (left, scale bar=1cm) and their, respectively, karyotypes (right, scale bar=10  $\mu$ m). AFE, *A. feldbergae*; PMU, *P. multispinis*; POL, *P. oligospila*; PCA, *P. cavatica*; PVI, *P. vittata*; PSA, *P. sabaji*. Color images available online at [www.liebertpub.com/zeb](http://www.liebertpub.com/zeb)



**FIG. 3.** Chromosomal mapping of 18S (green) and 5S (red) rDNA in *Ancistromus* and *Peckoltia* species. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . AFE, *A. feldbergae*; PMU, *P. multispinis*; POL, *P. oligospila*; PCA, *P. cavatica*; PVI, *P. vittata*; PSA, *P. sabaji*. Color images available online at [www.liebertpub.com/zeb](http://www.liebertpub.com/zeb)

The location of 18S and 5S rDNA sites was divergent among the six species (Fig. 3). In *P. multispinis*, 18S and 5S rDNA were colocalized in 5q; in *A. feldbergae*, 18S rDNA sites were in 20q and 5S rDNA sites were in 1q and 15q; in *P. oligospila*, 18S rDNA sites were in 10q and 20q and 5S rDNA sites were in 11q; in *P. cavatica*, 18S rDNA sites were in 9q and 11q and 5S rDNA sites were in 9q and 21q; in *P. vittata*, 18S rDNA sites were in 10q and 5S rDNA sites were in 10q and 21q; in *P. sabaji*, 18S rDNA sites were in 7q, 14q, and 20q, and 5S rDNA sites were in 7q, 9q, and 20q. Most rDNA sites had a terminal location, except one 5S rDNA site, which was in the proximal region in *P. cavatica* and *P. vittata*. Moreover, the sites of the two classes of rDNA were in different chromosomes in *A. feldbergae* and *P. oligospila*. However, there were also 18S and 5S rDNA sites in the same chromosome, such as in *P. cavatica* and *P. vittata*, and some were even colocalized, as was the case in *P. multispinis* and *P. sabaji*. In addition, intraspecific heteromorphisms in the size of rDNA clusters were observed in the six species.

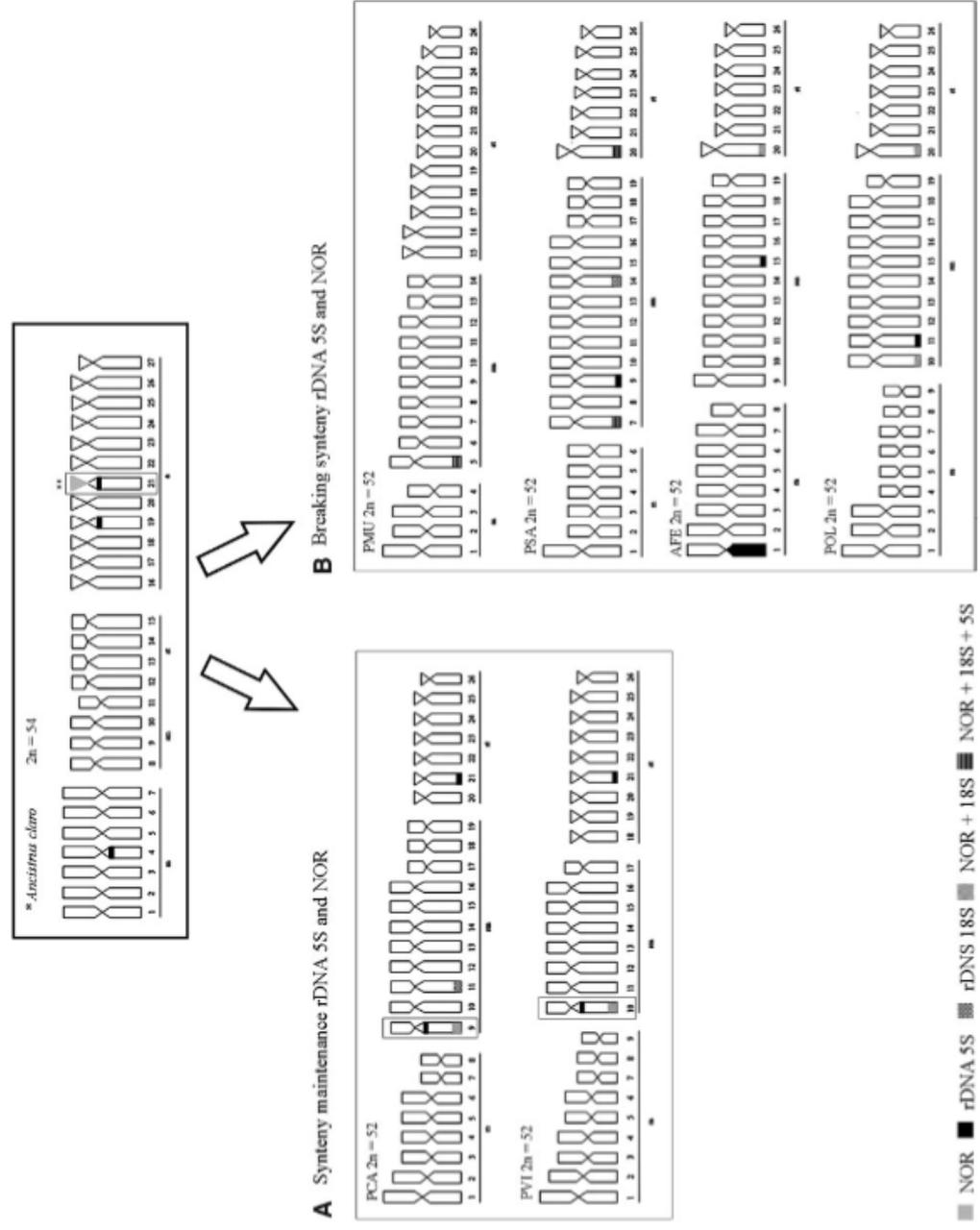
### Discussion

The six species analyzed in this study exhibited a  $2n=52$  karyotype, which is purported to be a synapomorphy of Ancistrini<sup>32</sup> and is shared with congeneric species (Table 1).<sup>27</sup> However, there are some divergences in chromosome morphologies, which must result from inversions, mainly pericentric, that are inversions that have been identified as the main source of karyotype evolution in Ancistrini.<sup>33</sup> However, inversions are not the only events involved in chromosome reorganization in Ancistrini, Robertsonian fusion events and diploid reduction are sources of diversification in the chromosome evolution of the clade species (Fig. 4).<sup>6,9,10-13,34-56</sup> Centromeric reposition could also explain this variation, since this mechanism can change chromosome morphology without modifying number of chromosomes.<sup>32,35,37</sup>

A small difference in karyotype formula was also detected among the *P. vittata* analyzed in this study and those described

by Souza *et al.*,<sup>27</sup> despite both samples being from Xingu River. It is possible that a chromosome inversion occurred during sympatric divergence of the two karyomorphs. However, the combination of gametes in chromosomes of polymorphic populations may lead to a difference in the karyotype.<sup>38</sup>

FISH mapping and Ag-NOR analysis revealed the occurrence of inactive sites of 18S rDNA in *P. cavatica*, *P. multispinis*, and *P. sabaji*. Similarly, the mapping of 5S rDNA sequences revealed a dynamic organization of these sequences among species: whereas *P. multispinis* and *P. oligospila* had a single site, the other species had two or three sites.<sup>8,15,34,35</sup> Moreover, we identified cases wherein the minor (5S) and major (18S) sites of rDNA were in different chromosome pairs and cases wherein these two classes of rDNA were syntenic and even colocalized, as observed in Neopleocostominae, Hypoptopomatinae,<sup>39</sup> Loricariniinae,<sup>4</sup> Hypostominae,<sup>6,9,21,38</sup> and the Trichomycteridae family.<sup>39</sup> This type of arrangement of these sequences is not common in fish species, since it tends to favor unequal crossing over events and gene conversion.<sup>38</sup> Despite this, colocalization of 5S and 18S rDNA was observed in some species of Loricaridae, including Ancistrini.<sup>6,9,35</sup> However, nonsyntenic organization of minor and major rDNA clusters is the most frequently observed organization in species of this tribe. According to Zienmiczak,<sup>39</sup> the synteny between the two classes of rDNA on a single chromosome pair is a plesiomorphic condition for Loricaridae. As proposed by Mariotto,<sup>6</sup> the ancestral karyotype in the *Ancistrus* genus is similar to that presented by *Ancistrus claro* (Fig. 4), which has  $2n=54$  chromosomes, a high fundamental number, and one chromosome pair with syntenic 5S and 18S rDNA sites. For the same characteristics, except for  $2n$ , we can observe in *P. cavatica* and *P. vittata* the presence of a 5S rDNA site in the interstitial region in the same chromosome with the single NOR, which may be a primitive remnant condition for the *Peckoltia* clade, as found in *Hypancistrus cf. debilitata*<sup>12</sup> and *Panaqolus sp.*,<sup>13</sup> belonging to the same clade, and in the *Ancistrus*<sup>6,9,35,40</sup> genus that is of the same subfamily Hypostominae.<sup>5</sup>



**FIG. 4.** Hypothesis for chromosome dynamics in the *Peckofilia* clade. (A) Species that maintained the ancestral syntentic condition. (B) Species with a break in synteny. \*Data obtained from Martotto *et al.*,<sup>6</sup> \*\*Ancestral condition with single NOR and 5S rDNA site synthetic. NORs, nucleolar organizer regions.

Data relating to organization of rDNA clusters indicate that other types of chromosome rearrangements in addition to inversions should have occurred during karyotype divergence of these species. Chromosome translocations, for example, could explain the difference in chromosome location of rDNA sites. These events were presumably mediated by transposition mechanisms, which have been documented to apply to these types of sequences owing to the common presence of transposable elements in association with rDNAs.<sup>41,42</sup> Retroposition events, for example, could explain the difference in the number of rDNA sites among species, since these mechanisms can produce new copies.<sup>43</sup> In contrast, it is possible that degeneration of rDNA sites took place in species with a reduced number of these sites. Moreover, intraspecific size heteromorphisms of rDNA clusters were observed among the six species. These could be explained by duplication events mediated by unequal crossing over, events that are commonly described in vertebrate species.<sup>44</sup>

The present data on 2n, KF, and location of rDNA clusters suggest that the karyotype of *Peckoltia*, as well as that of other Hypostominae species, is not stable. Thus, inversions may not be the most important mechanism of karyotype rearrangement in this group, as previously supposed. In turn, transpositions and duplications also seem to be important evolutionary events, involved at least in rDNA clusters spreading in this group. Moreover, the data set generated here could provide taxonomic markers and thus should prove very useful in identifying *Peckoltia* species. They could also provide evidence for a postzygotic reproductive isolation mechanism among sympatric species from the Xingu River, as suggested for *Scobinancistrus aureatus* and *Scobinancistrus pariolispsis*.<sup>10</sup>

#### Acknowledgments

This study is part of master dissertation of A.M.P. who was a recipient of a CAPES Scholarship in Neurosciences and Cell Biology, UFPA. The authors are grateful to members of the team of cytogenetics laboratory UFPA in the field work and chromosomal preparations and to MSc. Jorge Rissino, MSc. Shirley Nascimento, and Maria da Conceição for assistance in laboratory work. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) through the Edital Universal (proc. 475013/2012-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through the Edital 047/2012 PRÓ-AMAZÔNIA: Biodiversidade e Sustentabilidade on a project coordinated by C.Y.N.; by FAPESPA (Pará Foundation for Supporting Science) through the National Excellence on Research Program (PRONEX, TO 011/2008) and Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social-BNDES (Operação 2.318.698.0001) on a project coordinated by J.C.P. C.Y.N. (308428/2013-7) and J.C.P. (308401/2013-1) are grateful to CNPq for Productivity Grants. We also thank the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for the collection permit 020/2005 (Registration: 207419). The authors thank Projeto Arapaima Ltda (Pará) for help with field sampling, Cesar Martins UNESP-Botucatu for primers for cytogenetic probes, and C.Y.N. and J.C.P. are both CNPq researchers.

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

1. Isbrücker JH: Classification and Catalogue of the Mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). (Verslagen en technische Gegevens). Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, 1980.
2. Armbruster JW. Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armoured catfishes Loricariidae with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc* 2004;141:1–80.
3. Eschmeyer WN, Fong JD. Catalog of fishes. California Academy of Sciences 2017. Available at <http://research.archive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Accessed August 8, 2017.
4. Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Hereditas (Edinb)* 2005;94:180–186.
5. Lujan NK, Armbruster JW, Lovejoy NR, López-Fernández H. Multilocus molecular phylogeny of the sucker-mouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenet Evol* 2015; 82:269–288.
6. Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet* 2011;5:289–300.
7. Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, Artoni RF, Moreira-Filho O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comp Cytogenet* 2012;6:115–125.
8. Bueno V, Venere PC, Konerat JT, Zawadzki CH, Vicari MR, Margarido VP. Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary tendencies in the genus. *ScientificWorldJournal* 2014;2014: Article ID 943825, 8 pages.
9. Favarato RM, Silva M, Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E, Matoso DA. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 2016; 13:103–111.
10. Cardoso AL, Sales KAH, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Noronha RCR. Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. *Comp Cytogenet* 2013; 7:43–41.
11. Cardoso AL, Carvalho HL, Benathar TCM, Serrão SMG, Nagamachi CY, Pieczarka JC, et al. Integrated cytogenetic and mitochondrial DNA analyses indicate that two different phenotypes of *Hypancistrus* (L066 and L333) belong to the same species. *Zebrafish* 2016;13:209–216.
12. Silva M, Ribeiro ED, Matoso DA, Sousa LM, Hrbek T, Py-Daniel LR, et al. Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. *Genetica* 2014;142:127–139.
13. Ayres-Alves T, Cardoso AL, Nagamachi CN, De Sousa LM, Pieczarka JC, Noronha RCR. Karyotypic evolution and chromosomal organization of repetitive DNA sequences in species of *Panaque*, *Panaqolus*, and *Scobinancistrus* (Siluriformes and Loricariidae) from the Amazon basin. *Zebrafish* 2017;14:251–260.
14. Kazazian HH. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 2004;303:1626–1632.
15. Martins C, Wasko AP: Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on Genome*

- Research. Williams CR (ed), pp. 289–318, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2004.
16. Biémont C, Vieira C. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 2006;443:521–524.
  17. Kidwell MG. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 2002;115:49–63.
  18. Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Cytogenetic characterization and description of an XX<sub>1</sub>XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res* 2006;12:320–324.
  19. Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, et al. Origin of the X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica* 2014;142:119–126.
  20. Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Traldi JB, Bueno V, Martinez JF, et al. Karyotype diversity and evolutionary trends in armored catfish of the genus *Hartia* (Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish* 2017;14:169–176.
  21. Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti C. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fish* 2013;23:477–489.
  22. Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, et al. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res* 2013;12:463–471.
  23. Rubert M, da Rosa R, Zawadzki CH, Mariotto S, Moreira-Filho O, Giuliano-Caetano L. Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): diversity analysis of the sites. *Zebrafish* 2016;13:360–368.
  24. Ambruster JW. The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Zool J Linn Soc* 2008;1822:1–76.
  25. Ambruster JW, Werneke DC, Tan M. Three new species of saddled loricariid catfishes, and a review of *Hemiancistrus*, *Peckoltia*, and allied genera (Siluriformes). *Zool J Linn Soc* 2015;480:97–123.
  26. De Oliveira RR, Py-Daniel LR, Zuanon J, Rocha MS. A new species of ornamental catfish genus *Peckoltia* (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu Basin, Brazilian Amazon. *Copeia* 2012;3:547–553.
  27. Souza ACP, Nagamachi CY, Milhomem SSR, Feldberg E, Pieczarka JC. Cytogenetics analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). *Comp Cytogenet* 2009;3:103–109.
  28. Bertollo LAC, Takashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1972;2:103–120.
  29. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980;36:1014–1015.
  30. Martins C, Galetti PM. Chromosome localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 1999;7:363–367.
  31. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 1964;52:201–220.
  32. Artoni RF, Bertollo LAC. Trends in the karyotype evolution in the Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 2001;134:201–210.
  33. Alves AL, Oliveira C, Foresti F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 2003;56:57–63.
  34. de Oliveira RR, Souza IL, Venere PC. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spiloma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotrop Ichthyol* 2006;4:93–97.
  35. Prizon AC, Borin-Carvalho LA, Bruschi DP, Ribeiro MO, Barbosa LM, Ferreira GEB, et al. Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intragenetic karyotype diversification. *Comp Cytogen* 2016;10:625–636.
  36. Rocchi M, Archidiacono N, Schempp W, Capozzi O, Stanyon R. Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 2012;108:59–67.
  37. Montefalcone G, Tempesta S, Rocchi M, Archidiacono N. Centromere repositioning. *Genome Res* 1999;9:1184–1188.
  38. Rosa KO, Zienniczak K, de Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, et al. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria* lima (Siluriformes: Loricariidae) fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fisheries* 2012;22:739–749.
  39. Zienniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, et al. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool* 2012;79:1–10.
  40. Ribeiro MO, Noleto RB, Lorscheider CA, Porto FE, Prizon AC, Zawadzki CH, et al. Cytogenetic description of *Ancistrus abelhoi* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguacu River basin, southern Brazil. *Genet Mol Res* 2015;14:4051–4057.
  41. Dover GA. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetics* 1986;2:159–165.
  42. Eickbush TH, Eickbush DG. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 2007;175:477–485.
  43. Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH. Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 2008;180:1617–1626.
  44. Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E. Ribosomal RNA genes are interdispersed throughout a heterochromatin chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Gen Res* 1993;63:128–130.

Address correspondence to:  
 Renata Coelho Rodrigues Noronha, PhD  
 Laboratório de Citogenética  
 Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Universidade Federal do Pará  
 Belém 66075-110  
 Para  
 Brazil

E-mail: renatarcm@gmail.com