
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**Estudo da evolução cariotípica de espécies do gênero *Ancistrus*
(Siluriformes: Loricariidae) de córregos da região de Cuiabá/MT**

Flávia Marcorin de Oliveira

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestra em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).

Junho – 2016

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**Estudo da evolução cariotípica de espécies do gênero *Ancistrus*
(Siluriformes: Loricariidae) de córregos da região de Cuiabá/MT**

Flávia Marcorin de Oliveira

Orientadora: Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempi

Co-orientadora: Dra. Sandra Mariotto

Junho - 2016

591.15 Oliveira, Flávia Marcorin
O48e Estudo da evolução cariotípica de espécies do gênero
Ancistrus (Siluriformes: Loricariidae) de córregos da região
de Cuiabá/MT / Flávia Marcorin Oliveira. - Rio Claro, 2016
71 f. : il., figs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Patricia Pasquali Parise Maltempi
Coorientadora: Sandra Mariotto

1. Genética animal. 2. Ancistrus. 3. Rearranjos
cromossômicos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

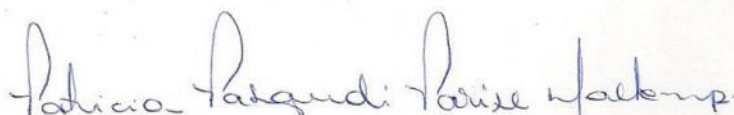
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da evolução cariotípica de espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) de córregos da região de Cuiabá/MT

AUTORA: FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA

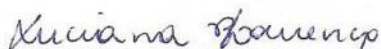
ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

CO-ORIENTADORA: SANDRA MARIOTTO

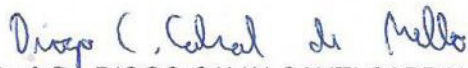
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Profa. Dra. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO MORANDINI
Departamento de Biologia Celular / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro

Rio Claro, 16 de junho de 2016

**Dedico esse trabalho a minha família,
por acreditarem sempre no meu potencial e
apoiarem minhas escolhas.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, força, por mostrar que estou no caminho certo e me permitir realizar meus sonhos;

A Universidade Estadual Paulista e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade e pela estrutura física disponível para realização do projeto;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), (2015/05993-3), pelo apoio financeiro do projeto, tornando possível a realização deste;

A Profa. Dra. Patricia, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por ser responsável pelo amor que eu sinto pela citogenética, pela amizade e orientação;

A minha co-orientadora Profa. Dra. Sandra Mariotto e Prof. Dr. Liano Centofante por toda colaboração, pela paciência e disponibilidade em nos levar para as coletas e por encherem minha mala de conhecimento toda vez que eu voltava para Rio Claro;

Aos meus amigos de laboratório, Keteryne (Kethy), Rafael (Mão), Allison, NahaNna e Thiago por me ensinarem, pela amizade e por tornarem os dias de trabalho mais divertidos;

Aos professores Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello e Profa. Dra. Sanae Kasahara por terem sido responsáveis pela melhora e evolução do trabalho;

A minha mãe Jeanete que é minha inspiração, exemplo de mulher e determinação, que moldou minha personalidade, ajudou a construir o que sou hoje, me dá força e apoio diariamente, e me mostra há 25 anos que trabalhar e correr atrás dos sonhos só nos torna melhor. Te amo muito mãe;

Ao meu pai Douglas, que apesar de morar em outra cidade e não nos vermos com frequência, está sempre presente em meus pensamentos. Por ser exemplo de dedicação aos estudos e ao trabalho, por acreditar no meu potencial, por se orgulhar das minhas conquistas e da pessoa que sou. Te amo muito pai;

Aos meus irmãos, André, Léo e Cássia, pela amizade, cumplicidade, por acompanharem todos os meus passos, por comemorarem comigo minhas conquistas e

ajudarem a me re-erguer nas minhas derrotas. Vocês não fazem ideia do quanto são importantes na minha vida e o quanto amo vocês;

Ao meu namorado, companheiro, melhor amigo, Lucas, por todo apoio, pelo carinho, pelo respeito, pela compreensão, por sempre me dar forças para continuar e estar sempre do meu lado em todas as situações. Eu te amo muito;

A toda minha família por sempre me apoiarem, em especial ao vô Marcorin, vô Creuza e vô Alice, por sempre cuidarem de mim, pela preocupação, pelo carinho, por serem meus pilares e estarem sempre comigo, seja pessoalmente ou por mensagens e ligações;

Aos meus amigos de SBO, em especial Karina, Maira e Marília por sempre me confortarem com palavras de que iria dar tudo certo e eu iria conseguir, por serem do jeito que são e se preocuparem comigo, eu amo vocês;

As amigas de graduação Natália (Judite) e Lury (linda), que apesar de morarem em outra cidade, estão sempre me apoiando e torcendo por mim, pela inúmeras risadas e pela amizade verdadeira, porque a distância não mudou nada;

Ao meu amigo Rafael (dentinho) pela amizade, pelas inúmeras conversas e desabafos que foram de grande importância para ambos entenderem melhor a vida de um mestrando;

As minhas filhas de 4 patas (Tuti, Pichilica e Belinha) e minha filha de 3 patas (Vic) por me encherem de um amor e carinho dos mais sinceros aos finais de semana, por ficarem felizes ao me ver e encherem meu dia de alegria;

A todos que de uma forma ou de outra torcem por mim e contribuíram para a realização deste projeto.

“O que nos causa problemas não é o que
não sabemos. É o que temos certeza que
sabemos e que, no final, não é verdade”

Mark Twain

Resumo

A família Loricariidae é uma das mais diversificadas da ordem Siluriformes, com espécies distribuídas entre sete subfamílias: Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Neoplecostominae, Lithogeninae, Delturinae e Ancistrinae. As espécies do gênero *Ancistrus* Kner, 1854, pertencem à subfamília Ancistrinae, têm mostrado grande variação cariotípica, além de características interessantes do ponto de vista citogenético como a presença de cromossomos sexuais e polimorfismos cromossômicos. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os cromossomos de quatro espécies do gênero *Ancistrus* (*Ancistrus* sp. 1 “cupim”, *Ancistrus* sp. 2 “cupim”, *Ancistrus* sp. “mutuca” e *Ancistrus* sp. “soberbo”) pertencentes à bacia do Paraguai utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular para melhor compreensão da evolução cariotípica dessas espécies. As espécies estudadas apresentaram número diploide variando de $2n=42$ a $2n=54$, NOR localizadas em regiões pericentroméricas e terminais, além de heteromorfismo de tamanho dessas regiões (NOR) em um dos homólogos nas quatro espécies estudadas. O bandamento C mostrou presença de pouca heterocromatina com exceção das espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” e *Ancistrus* sp. “soberbo” que apresentaram dois blocos grandes de heterocromatina em um par de cromossomos, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Um exemplar fêmea da espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim” também apresentou um bloco grande de heterocromatina em um dos homólogos do par 7, sendo esses resultados indicativos de provável relação entre esses blocos de heterocromatina e a diferenciação de cromossomos sexuais. Os resultados obtidos pela técnica de FISH utilizando sondas de DNAr 18S e 5S mostraram que o DNAr 18S está localizado na mesma região da NOR, o DNAr 5S está distribuído em quatro e cinco pares cromossômicos e o *double* FISH não mostrou co-localização desses genes. No entanto as espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” e *Ancistrus* sp. “soberbo” mostraram variação nos resultados com marcações de DNAr em blocos de heterocromatina. O uso de sonda telomérica mostrou marcações nos telômeros dos cromossomos das quatro espécies estudadas e marcação pericentromérica em um par de cromossomos da espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim”. Nossos resultados evidenciam possíveis rearranjos cromossômicos do tipo fusão cêntrica, contribuindo com a redução do número diploide e inversões pericêntricas e paracêntricas resultando na localização dos sítios de DNAr.

Palavras-chave: *Ancistrus*, rearranjos cromossômicos, evolução cariotípica.

Abstract

The Loricariidae family is one of the most diversified of the Siluriformes order, with species distributed in seven subfamilies: Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Neoplecostominae, Lithogeninae, Delturinae and Ancistrinae. The species of the genus *Ancistrus* Kner, 1854, belong to the subfamily Ancistrinae, have shown great karyotype variation, and interesting features of the cytogenetic point of view as the presence of sex chromosomes and chromosome polymorphisms. Thus the aim of this study was to characterize the chromosomes of four species of *Ancistrus* genus (*Ancistrus* sp. 1 "cupim", *Ancistrus* sp. 2 "cupim", *Ancistrus* sp. "mutuca" and *Ancistrus* sp. "soberbo") belonging to Paraguay basin using techniques of classical and molecular cytogenetics to better understand the karyotype evolution of these species. The species showed diploid number ranging from $2n = 42$ to $2n = 54$, NOR located in pericentromeric and terminal regions, and these regions size heteromorphism (NOR) in one of the homologous in the four species. The C-banding showed the presence of few heterochromatin with the exception of species *Ancistrus* sp. 2 "cupim" and *Ancistrus* sp. "soberbo" that had two large blocks of heterochromatin in a pair of chromosomes in both males and females. An exemplary female of the species *Ancistrus* sp. 1 "cupim" also presented a large block of heterochromatin in one of the pair of 7 homologous, and these results indicating probable relationship between these heterochromatin blocks and differentiation of sex chromosomes. The results obtained by FISH technique using probes 18S rDNA and 5S showed that the 18S rDNA is located in the same region of NOR, the 5S rDNA is distributed in four and five chromosome pairs and double FISH showed colocalization of these genes. However of *Ancistrus* species sp. 2 "cupim" and *Ancistrus* sp. "soberbo" showed variation in results with rDNA markings in heterochromatin blocks. The use of telomeric probe showed markings on the telomeres of the chromosomes of four species studied and pericentromeric marking on a pair of chromosomes of the species *Ancistrus* sp. 2 "cupim". Our results indicate possible chromosomal rearrangements type fusion centric, contributing to the reduction of the diploid number and pericentric inversions and paracentric resulting in the location of rDNA sites.

Key-words: *Ancistrus*, chromosomal rearrangements, evolution karyotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Mapa dos Pontos de coleta.....	13
Ilustração 2 – Locais de coleta.....	15
Ilustração 3 – Espécies de <i>Ancistrus</i> estudadas.....	17
Ilustração 4 – Cariótipos com coloração convencional.....	26
Ilustração 5 – Cariótipos após bandamento C.....	28
Ilustração 6 – FISH DNAr 18S.....	30
Ilustração 7 – FISH DNAr 5S.....	32
Ilustração 8 – <i>Double</i> FISH com sondas de DNAr 18S e 5S.....	34
Ilustração 9 – FISH com sondas de DNAr 5S e 18S <i>Ancistrus</i> sp. 1 “cupim” ...;	35
Ilustração 10 – FISH com sondas de DNAr 5S e 18S <i>Ancistrus</i> sp. “soberbo”	36
Ilustração 11 – <i>Double</i> FISH em <i>Ancistrus</i> sp. 1 “cupim” e <i>Ancistrus</i> sp. “soberbo”	36
Ilustração 12 – FISH telomérica.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição de espécies de <i>Ancistrus</i> já estudadas.....	10-11
Tabela 2 – Total de exemplares estudados.....	14
Tabela 3 – Resultados obtidos no presente trabalho.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peixes neotropicais e ordem Siluriformes.....	1-2
1.2 Família Loricariidae e gênero <i>Ancistrus</i>	2-5
1.3 Citogenética no gênero <i>Ancistrus</i>	5-11

2 OBJETIVO.....12

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material.....	13
3.1.1 Locais de coleta.....	13-15
3.1.2 Características morfológicas das espécies estudadas.....	16-17
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Indução de Mitose.....	18
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos.....	18
3.2.3 Bandamento C.....	18
3.2.4 Impregnação por Nitrato de Prata (Ag-RON).....	19
3.2.5 Extração de DNA genômico.....	19
3.2.6 Obtenção de sondas de DNAr 18S e 5S.....	19-21
3.2.7 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	21-22
3.2.8 <i>Double FISH</i>	22
3.2.9 FISH Telomérica.....	23
3.3. Sequenciamento.....	23-24
3.3.1 Análise dos cromossomos mitóticos.....	24

4 RESULTADOS.....25-38

5 DISCUSSÃO.....39-47

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....48-49

REFERÊNCIAS..... 50-59

1 Introdução Geral

1.1 Peixes Neotropicais e Ordem Siluriformes

Os peixes representam o maior grupo animal entre os vertebrados e são encontrados em diversos ambientes marinhos ou de água doce. A ictiofauna de água doce neotropical (América Central e do Sul) é muito diversificada com 8.000 espécies de um total de 24.600 peixes taxonomicamente descritos (KAVALCO; PAZZA, 2007), correspondem a 24% de todas as espécies de peixes válidas e são encontrados em menos de 0,003% dos habitats de água doce disponíveis no mundo (VARI; MALABARBA, 1998).

A destruição e fragmentação de ecossistemas aquáticos neotropicais têm causado a diminuição das populações de peixes, e muitas vezes a taxa de redução é tão alta que os exemplares restantes não conseguem restabelecer seu habitat natural. Essas fragmentações populacionais geram a perda de recursos genéticos causando a extinção de muitas espécies, sendo irreversível, pois limita a variabilidade genética dentro de uma espécie (VONO et al, 2002; ARTONI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

Devido a quantidade e variedade de espécies de peixes e as consequências geradas pela destruição e fragmentação dos habitats, as pesquisas envolvendo a ictiofauna neotropical estão em crescente desenvolvimento e são indispensáveis para o conhecimento e preservação da biodiversidade das espécies (RYDER, 1986; MORITZ et al., 1996; VARI; MALABARBA, 1998; TORRES et al., 2004; KAVALCO; PAZZA, 2007; MARIOTTO, 2008; OLIVEIRA et al., 2009). Dados provenientes da citogenética clássica e molecular têm sido úteis para auxiliar no esclarecimento de dúvidas relativas à identificação e caracterização de espécies de peixes. Além disso, os peixes neotropicais têm mostrado características interessantes do ponto de vista citogenético como por exemplo grande variação cariotípica, ocorrência de polimorfismos cromossômicos, variação no número diploide, presença de sistemas de cromossomos sexuais e de cromossomos supranumerários (CENTOFANTE et al., 2001; FERRO et al., 2003; GARCIA et al., 2003; de OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; VENERE et al, 2008; ARTONI et al., 2009; BELLAFRONTI et al., 2010; HASHIMOTO; FORESTI, 2010; da CRUZ et al., 2011; VICARI et al., 2011; SANTOS et al., 2012; BLANCO et al., 2013; PARISE-MALTEMPI et al., 2013; CASTRO et al., 2015).

A ordem Siluriformes, juntamente com os Characiformes, são as ordens mais representativas da ictiofauna neotropical. A ordem Siluriformes possui 3707 espécies válidas divididas em 39 famílias (ESCHMEYER, 2016). As espécies representativas desta ordem são conhecidas popularmente como bagres e cascudos, possuem hábitos bentônicos e noturnos, vivem escondidas entre rochas e vegetação, e variam tanto na forma quanto no tamanho. Algumas espécies não apresentam escamas, sendo chamadas de peixes de couro, ou também podem apresentar o corpo parcialmente ou totalmente coberto por placas ósseas (doradídeos e loricariídeos) (BRITSKI et al., 1999; FISCHMULLER, 2003).

A maioria das espécies da ordem Siluriformes habita ambientes de água doce, sendo apenas as famílias Ariidae e Plotosidae compostas por espécies marinhas (LOWE MCCONNELL, 1999). Os Siluriformes têm grande importância econômica e ecológica, contudo há poucos estudos sobre a variabilidade genética e diferenciação das populações de bagres e cascudos no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009).

1.2 Família Loricariidae e Gênero *Ancistrus*

Dentre os Siluriformes, Loricariidae é considerada a segunda família com maior número de espécies, representada por 919 espécies descritas até o momento (ESCHMEYER, 2016). As espécies representativas desta família constituem um grupo monofilético e estão distribuídas entre sete subfamílias: Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Neoplecostominae, Lithogeninae, Delturinae e Ancistrinae (ESCHEMEYER, 2016).

Os peixes representativos destas subfamílias são conhecidos popularmente como cascudos ou acaris, na região amazônica, e apresentam o corpo dorso/ventralmente achatado e coberto por placas ósseas, possuem dentes dérmicos chamados odontodes e se alimentam de algas e pequenos invertebrados presentes nos fundos de rios e lagos (BRITSKI, 1972; ISBRUCKER, 1980; BRITSKI, et al., 1999). As espécies pertencentes à família Loricariidae possuem grande capacidade adaptativa e são encontradas por todo o neotrópico, em diferentes tipos de habitat como, por exemplo, córregos distantes da área urbana e córregos poluídos de áreas urbanas (REIS et al., 2003).

Estudos citogenéticos das espécies da família Loricariidae têm mostrado grande diversidade no número diploide, na fórmula cariotípica e na localização da Região

Organizadora do Nucléolo (NOR). Grande parte dos estudos dos cariótipos em Loricariidae se limita a descrição do número de cromossomos e a fórmula cariotípica, sendo necessário o uso de marcadores moleculares, para melhor compreensão da evolução cariotípica das espécies (ZIEMNICZAK et al., 2012).

A espécies da família Loricariidae possuem grande variação no número diplóide que vai desde $2n=34$ em *Ancistrus claro* (MARIOTTO et al., 2009) a $2n=96$ em *Upsilonodus sp.* (KAVALCO et al., 2005). Em Loricariidae, espécies com número diploide $2n=54$ e cromossomos metacêntricos e submetacêntricos são consideradas supostamente basais (ARTONI, 1996; ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO et al., 2005).

As espécies das subfamílias Neoplecostominae, Hemipsilichthiinae e Hypoptopomatinae são consideradas hipoteticamente basais, por apresentarem predominância do número diploide $2n=54$ e NOR única na região intersticial (ALVES, 2000). Em um trabalho realizado por Alves et al (2005) nove espécies estudadas da subfamília Hypostominae apresentaram $2n=54$ e sete dessas espécies possuem a mesma estrutura cariotípica observada em espécies de *Neoplecostomus* da subfamília Neoplecostominae.

A NOR única localizada na região intersticial parece ser uma característica ancestral na família Loricariidae (ALVES, 2003, 2005 e 2006), sendo esse padrão é observado em espécies da subfamília Neoplecostominae e Hypoptopomatinae. Já foi descrita a NOR única na região terminal por exemplo na espécie *Upsilonodus sp.*, enquanto que já foi descrito NORs múltiplas em espécies da subfamília Hypostominae (ARTONI; BERTOLLO, 2001), como é o caso da espécie *Hypostomus affinis* que possui a NOR distribuída em cinco pares de cromossomos (KAVALCO et al., 2005).

Rearranjos cromossômicos como inversões pericêntricas e acúmulo de heterocromatina são condições importantes na diversificação dos cromossomos da família Loricariidae e contribuem com a evolução cariotípica das espécies desta família (MARIOTTO et al., 2011). Uma forma de detectar regiões que podem sofrido ter rearranjos cromossômicos é a utilização de sondas para localização dos telômeros que podem detectar as sequências teloméricas em regiões intersticiais teloméricas internas (ITS) (MEYNE et al., 1990, OCALEWICZ et al., 2011; OCALEWICZ, 2013).

Os ITS podem estar co-localizados em regiões de quebra cromossômica, tornando-se sítios chamados de “hot spots” para recombinação (ASHLEY; WARD, 1993). A presença de sequências teloméricas em regiões internas dos cromossomos pode indicar locais nos

quais rearranjos cromossômicos como fusões ou inversões podem ter ocorrido ao longo da evolução do genoma (NANDA; SCHMID, 1994; GO et al., 2000). Entretanto, não são todos os locais de rearranjos cromossômicos que apresentam sequências teloméricas (GARAGNA et al., 1995; NANDA et al., 1995).

Rosa e colaboradores (2012) identificaram a presença de ITSs em *Rineloricaria lima*, pertencente à subfamília Loricariinae, presente em diferentes locais. Os autores descreveram oito cariótipos diferentes para essa espécie, variando de $2n=66$ a $2n=70$. Dos cariótipos estudados, quatro apresentaram ITSs em regiões centroméricas e intersticiais levando os autores a sugerir várias hipóteses de rearranjos cromossômicos, como fusões, translocações e inversões. Os autores também identificaram a presença de ITS e DNAr 5S encontradas juntos em locais de fusão cromossômica, sugerindo que estas sequências de DNA repetitivo poderiam agir como sítios de fusão de cromossomos.

Uma outra espécie de *Rineloricaria lanceolata* estudada por Porto et al (2014) mostrou variação no número diploide de $2n=48$ a $2n=45$. Regiões de ITS foram detectadas em regiões pericentroméricas de espécies com cariótipos $2n=47$, $2n=46$ e $2n=45$ e além de ITS, em algumas espécies foi detectado também a presença de heterocromatina. Segundo os autores, a hipótese de rearranjo cromossômico do tipo fusão pode ser sustentada pela presença de ITS da região pericentromérica de dois pares de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio e em um cromossomo submetacêntrico maior, onde os ITS pré-existentes teriam sido preservados durante a fusão. Os autores acreditam que o cromossomo submetacêntrico de tamanho médio que resultou de fusão pericentromérica pode ter locais de maior susceptibilidade a quebras, facilitando a ocorrência de uma outra fusão que originaria o cromossomo submetacêntrico maior.

O gênero *Ancistrus* Kner, 1854 um dos mais diversificados da tribo Ancistrini, pertence à subfamília Ancistrinae e possui atualmente 68 espécies reconhecidas como válidas (ESCHMEYER, 2016). As espécies do gênero *Ancistrus* se diferenciam das demais da família Loricariidae por não possuírem placas e odontodes, possuindo apenas pequenos tentáculos carnudos e odontodes interoperculares bem desenvolvidos. O gênero também é caracterizado pela ocorrência de cuidado parental de ovos e larvas, de modo que este comportamento ocorre principalmente entre os indivíduos machos que protegem o ninho de predadores e machos rivais durante 10 dias após a eclosão dos ovos (SABAJ et al., 1999).

Em algumas espécies há dimorfismo sexual nas quais os barbilhões dos machos são mais desenvolvidos do que os das fêmeas (ISBRUCKER; NIJSSEN, 1992; SABAJ et al.,

1999). Sabaj e colaboradores (1999) acreditam que os barbilhões mais desenvolvidos nos machos de algumas espécies tem aparência das larvas e desta forma poderiam ser usados para fingir a presença de larvas no ninho e se tornarem mais atrativos para as fêmeas.

As espécies do gênero *Ancistrus* apresentam grande similaridade morfológica, transformando-o em um grupo taxonomicamente complexo (de OLIVEIRA, 2009), possuem pouca vagilidade, permanecem escondidos em troncos e pedras durante o dia e possuem hábitos noturnos (BURGESS, 1989; ZUANON, 1999). Embora as espécies de *Ancistrus* sejam amplamente distribuídas pelos rios e riachos neotropicais, as bacias dos rios Amazonas e Paraguai nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul abrigam o maior número e diversidade de espécies do gênero (FISCH-MULLER, 2003).

1.3 Citogenética no gênero *Ancistrus*

Informações cariotípicas relacionadas ao número diplóide e localização do centrômero, distribuição de heterocromatina constitutiva, número e localização das regiões organizadoras de nucléolo e localização de DNAr 18S e 5S podem ser usadas para melhor compreensão da evolução cromossômica das espécies de *Ancistrus*.

As espécies do gênero *Ancistrus* possuem grande diversidade no número diploide que varia de $2n=34$ a $2n=54$ cromossomos (ALVES et al., 2003; MARIOTTO et al., 2004; SOUZA et al., 2004; ALVES et al., 2005; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006; de OLIVEIRA et al., 2006, 2007 e 2008; MARIOTTO, 2009; MARIOTTO et al., 2011; MARIOTTO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015) (Tabela 1). Os trabalhos envolvendo os cromossomos dos *Ancistrus* até 2003 relatavam o número diploide de $2n=52$ como sendo supostamente ancestral nas espécies analisadas e a presença predominante de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (ARTONI; BERTOLLO, 2001; SOUZA, 2003; de OLIVEIRA, 2006). Estudos realizados posteriormente evidenciaram espécies com número diploide $2n=54$, sendo que os cariótipos apresentaram grande quantidade de cromossomos acrocêntricos indicando a ocorrência de possíveis rearranjos cromossômicos (de OLIVEIRA, 2009; MARIOTTO, 2011).

Em *Ancistrini*, os principais rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica das espécies são as inversões pericêntricas e paracêntricas (ALVES et al., 2003) e alguns autores sugerem que fusões cêntricas sejam responsáveis pela redução do

número diplóide encontrado em algumas espécies de *Ancistrus* (LARA, 1998; ALVES et al., 2003; SOUZA, 2003).

O único estudo utilizando sondas teloméricas em espécies de *Ancistrus* foi realizado por Favarato e colaboradores (2016) e as espécies estudadas, *Ancistrus* sp. “Purus,” *Ancistrus* sp. “Catalão,” *Ancistrus dubius*, *Ancistrus maximus*, *Ancistrus ranunculus* e *Ancistrus aff. dolichopterus*, apresentaram apenas marcações nas regiões terminais dos cromossomos. Já a espécie *Ancistrus dolichopterus* mostrou marcação na região intersticial em um par de cromossomos metacêntricos e na região intersticial nos cromossomos sexuais Z₂Z₂ nos machos e Z₂W₂ nas fêmeas.

Além da interessante variação no número diploide encontrada nas espécies de *Ancistrus*, já foi também descrita a presença de sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e XX/XY em populações de *Ancistrus* cf. *dubius* do pantanal do Mato Grosso (MARIOTTO et al. 2004; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006), XX/XO em *Ancistrus* n. sp. 1 (ALVES et al., 2006) e sistemas múltiplos dos tipos XX/XY₁Y₂ e Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂ para as espécies *Ancistrus* sp. 1 “Balbina” e *Ancistrus* sp. 2 “Barcelos” provenientes da Amazônia (de OLIVEIRA et al. 2008).

A diferenciação dos cromossomos sexuais Z e W já foi relatada para outras espécies de peixes neotropicais, sendo descrito cinco diferentes processos para a diferenciação: 1- acúmulo de heterocromatina no braço longo do cromossomo W, causando um aumento desse cromossomo em relação ao Z; 2- acúmulo de heterocromatina seguido da diminuição de tamanho durante a diferenciação do W; 3- substituição de heterocromatina no Z e W sem alteração de tamanho; 4- rearranjo cromossômico do tipo inversão sem mudança na heterocromatina; 5- rearranjo cromossômico do tipo inversão com perda de heterocromatina. Das diferentes hipóteses sobre a origem de cromossomos sexuais em peixes, os rearranjos cromossômicos e a heterocromatização são os mais aceitáveis (HAAF; SCHMID, 1984; PHILLIPS; IHSEN, 1985; GALETTI JR.; FORESTI, 1986; MOREIRA-FILHO et al., 1993; ARTONI et al., 2001; VICARI et al., 2006; ROSA et al., 2006; DINIZ et al., 2007).

Em sistemas simples de cromossomos sexuais, o acúmulo de sequências repetitivas seguido de duplicação em tandem destas é um passo importante, pois diminui a possibilidade da recombinação entre cromossomos que carregam genes de determinação do sexo, causando como consequência a diferenciação dos cromossomos (HAAF; SCHMID, 1984; MOLINA, 1995; NANDA, et al., 1990; KOEHLER et al., 1997; CHARLESWORTH et al., 2005; CIOFFI et al., 2010a; CIOFFI et al., 2012). A

diferenciação dos homólogos em sistemas simples de cromossomos sexuais pode ocorrer através de inversões pericêntricas, adição ou deleção de heterocromatina nos cromossomos X, Y, Z e W (ANDREATA et al., 1992; MESTRINER et al., 1995; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2000; CENTOFANTE et al., 2002; MOLINA et al., 2007; VICARI et al., 2008; CIOFFI et al., 2010b; PAZIAN et al., 2013).

Nos sistemas múltiplos sexuais, os rearranjos cromossômicos, como fissões, fusões cêntricas, inversões e translocações, são responsáveis pela diferenciação desses cromossomos, uma vez que esses rearranjos favorecem a ligação de genes dispersos pelo genoma, acarretando na fixação desses sistemas de cromossomos sexuais (UYENO; MILLER, 1972; WHITE, 1973; BERTOLLO et al., 1997; BLANCO et al., 2013; BLANCO et al., 2014).

Na espécie *Ancistrus* sp. 1 “Balbina” que possui sistema múltiplo de cromossomos sexuais com machos apresentando número diploide $2n=39$, Renildo e colaboradores (2008) acreditam que fusão cêntrica seguida por inversões pericêntricas nos cromossomos Y1 e Y2 sejam responsáveis pela diferenciação de cromossomo sexuais. Os autores propõem duas vias para origem dos cariótipos nos machos desta espécie: na primeira via ocorreu a fusão de cromossomos acrocêntricos seguido por fissão de um dos homólogos do par 2, gerando dois cromossomos acrocêntricos pequenos seguido de inversões pericêntricas gerando cromossomos metacêntricos pequenos que seriam o Y1 e Y2. Poderia também ter ocorrido fusão cromossômica apenas de um dos homólogos do par 2, seguida de translocação em dois acrocêntricos, gerando dois cromossomos metacêntricos pequenos que seriam o Y1 e Y2. Nas fêmeas com $2n=38$ a fusão do conjunto de cromossomos acrocêntricos poderia ter originado o X.

Além de sistemas sexuais, outra característica interessante descrita para o grupo dos *Ancistrus* é a presença de polimorfismo cromossômico relacionado à região organizadora de nucléolo (NOR), como descrito para *Ancistrus cuiabae*, para o qual foram descritos três citótipos diferentes em função deste polimorfismo. Esta espécie apresenta número diplóide $2n=34$, sendo o citótipo A com a NOR em par metacêntrico, o citótipo B com a NOR em um cromossomo metacêntrico e em um acrocêntrico e o citótipo C com NOR em um par de cromossomos acrocêntricos (MARIOTTO et al., 2009). NOR única é considerada por alguns autores como uma característica conservada nas espécies do gênero *Ancistrus*, sendo que na maioria das espécies este sítio está localizado na região intersticial (MARIOTTO et al., 2004; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006; de OLIVEIRA et al., 2008; MARIOTTO et al., 2009; MARIOTTO et al., 2013).

Porém, NORs múltiplas já foram descritas para espécies da tribo Ancistrini como em *Peckoltia* sp. 1 e *Peckoltia* sp. 2 (SOUZA, 2003) e *Hemancistrus spilomma* (de OLIVEIRA, 2006).

As regiões organizadoras de nucléolos (NOR) são sítios cromossômicos onde o DNA ribossomal 45S é transcrito. O DNAr 45S possui três genes: RNAr 18S, 5,8S e 28S, estes genes são sequências de DNA repetitivo, dispostos em tandem. O DNAr 5S é uma sequência de DNA intercalada com espaçadores não transcritos e que não está localizado na NOR. Tanto a localização física do DNAr 5S quanto do DNAr 18S tem sido bastante usadas para melhor caracterização de diferentes espécies de peixes, contribuindo com estudos evolutivos dos cromossomos de diversas espécies de peixes neotropicais (GALETTI JR., 1998).

Embora em grande parte dos eucariotos, os genes 45S e 5S estejam organizados separadamente, já foram encontradas sintenias entre esses dois genes em diferentes espécies de peixes, como é o caso descrito no trabalho realizado por Mariotto e colaboradores (2011), no qual os autores hibridaram sondas de dois genes (5S e 18S) em espécies de *Ancistrus* de três bacias hidrográficas do Mato Grosso e encontraram sintenia nas espécies *Ancistrus claro*, *Ancistrus* sp. 04, *Ancistrus* sp. 08 e *Ancistrus cf. dubius*. Ziemniczak (2011) sugere que a sintenia entre o DNAr 18S e 5S em um par de cromossomos seja uma condição primitiva para Loricariidae.

Além de importantes como marcadores citotaxonômicos, as sequências repetitivas de RNAr 18S e 5S podem também fornecer dados interessantes do genoma, como o descrito por Favarato e colaboradores (2016). Esses autores estudaram estas sequências junto com sequências teloméricas em espécies de *Ancistrus* da região Amazônica e conseguiram identificar regiões frágeis no genoma conhecidos como *hotspots*. Nesse caso, a localização dos genes ribossomais atuou como marcador para identificação de rearranjos cromossômicos permitindo aos autores uma melhor compreensão dos processos de rearranjos cromossômicos e a fixação dos mesmos.

Diante do exposto, o gênero *Ancistrus* pode ser considerado um grupo bastante interessante do ponto de vista cromossômico. Além de mostrarem cariótipos pouco conservados, estão presentes no grupo, espécies com características interessantes como presença de cromossomos sexuais e polimorfismos estruturais (MARIOTTO et al., 2004), além de muitas espécies ainda não descritas. Resultados obtidos por meio de estudos

envolvendo a citogenética clássica e molecular são de grande importância para o entendimento da diversidade cariotípica, evolução e sugestões de espécies crípticas.

Tabela 1. Espécies de *Ancistrus* estudadas do ponto de vista cromossômico, com Número diploide (2n), Número fundamental (NF), Sistema de cromossomos sexuais (SCSex.), localização (rio/Estado) e referência..

Espécies	Nº diplóide	NF	NOR	S C. Sex.	Rio/Estado	Referência
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	84	16° sm (intersticial)		Rio Coxipó – MT	Mariotto et al., 2006
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	84	16° sm (intersticial)	XX/XY	Córrego Pari – MT	Mariotto et al., 2006
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	84	16° sm (intersticial)	XX/XY	Córrego Flechas – MT	Mariotto et al., 2006
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	84	16° sm (intersticial)	XX/XY	Córrego Fundo – MT	Mariotto et al., 2006
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	68	2° m (terminal)		Córrego Arrombado – MT	Mariotto et al., 2009
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	67	2°m (terminal)/ 2°a (intersticial)		Córrego Arrombado – MT	Mariotto et al., 2009
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	66	2° a (intersticial)		Córrego Arrombado – MT	Mariotto et al., 2009
<i>Ancistrus abilhoai</i>	2n=48	90	13° sm (terminal)		Rio Iguaçu – PR	Ribeiro et. al., 2015
<i>Ancistrus claro</i>	2n=54	84	21° a (intersticial)		Rio Coxipó – MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 03	2n=54	84	21° a (intersticial)		Córrego Pari – MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 01	2n=54	84	21° a (intersticial)		Córrego Pipa –MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 04	2n=52	82	22° a (intersticial)		Córrego São José –MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 06	2n=50	86	21° a (intersticial)		Rio Matrixã –MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus tombador</i>	2n=50	84	20° a (intersticial)		Rio Preto – MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 13	2n=40	80	18° sm (terminal)		Córrego Salgadinho – MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> n.sp.1	2n=38		5° m (intersticial)		Rio São Francisco - AC	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus</i> n. sp. 2	2n=52		24° st (terminal)		Rio Betari– SP	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus multispinnis</i>	2n=52		17° st (terminal)		Rio Itapocu – SC	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus</i> sp."Piagaçu"	2n=52	78 ♂ 79 ♀	26° a (intesticial)	ZZ/ZW	Rio Purus – AM	de Oliveira et. al., 2007
<i>Ancistrus ranunculus</i>	2n=48	82	16° st (intersticial)	ZZ/ZW	Rio Xingu – PA	de Oliveira et. al., 2007
<i>Ancistrus</i> sp. 1 "Balbina"	2n=39 ♂ 2n=38 ♀	78 ♂ 76 ♀	12° m (terminal) 23° a (intersticial)		Córrego Barretinho - AM	de Oliveira et. al., 2008
<i>Ancistrus</i> sp. 2 "Barcelos"	2n=52	80 ♂				

		79 ♀		Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1 W2	Rio Demeni –AM	de Oliveira et. al., 2008
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=44			ZZ/ZW	Córrego próximo a Serra das Araras – MT	Mariotto et. al., 2004
<i>Ancistrus</i> sp. 08	2n=44	80	13° sm (intersticial)	ZZ/ZW	Rio Currupira – MT	Mariotto et. al., 2011
<i>Ancistrus</i> sp. Purus	2n=34		4° m (terminal)	XX/XY	Rio Purus - AM	de Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Macoari	2n=46		19° a (terminal)	XX/XY	Rio Branco – RR	de Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Dimona	2n=52		13° st (intersticial)		Rio Dimona – AM	de Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Vermelho	2n=42		20° a (terminal)		Rio Demeni – AM	de Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Trombetas	2n=38		19° a (terminal)	XX/XO	Rio Trombetas – PA	de Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> n sp. 1	2n=39♂ 2n=40♀		20° sm (subterminal)		Rio Vermelho - GO	Alves et al., 2006
<i>Ancistrus</i> n sp. 2	2n=52		15° st (subterminal)		Rio Guaruva - SC	Alves et al., 2006
<i>Ancistrus</i> sp. 1 "Cupim"	2n= 42	84	9° m (pericentromérica)		Córrego Cupim – MT	presente trabalho
<i>Ancistrus</i> sp. 2 "Cupim"	2n=50	88	17° st (pericentromérica)		Córrego Cupim – MT	presente trabalho
<i>Ancistrus</i> sp. "Mutuca"	2n=54	92	9° m (terminal)		Córrego Mutuca – MT	presente trabalho
<i>Ancistrus</i> sp. "Soberbo"	2n=54	94	17° m (terminal)		Rio Soberbo - MT	presente trabalho

2 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo, identificar e descrever os cromossomos das espécies de *Ancistrus* encontradas nos córregos Cupim e Mutuca e rio Soberbo, uma vez que não há ainda dados cromossômicos das espécies encontradas nesses locais. As análises foram conduzidas utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular, focando principalmente na busca por cromossomos marcadores para o gênero, polimorfismos cromossômicos, cromossomos sexuais e cromossomos supranumerários, que pudessem contribuir para aumentar os dados para comparações entre diferentes espécies do gênero aumentando assim o entendimento da história evolutiva do grupo, além de fornecer dados que pudessem auxiliar na descrição taxonômica das espécies deste grupo de peixes.

3 Material e Métodos

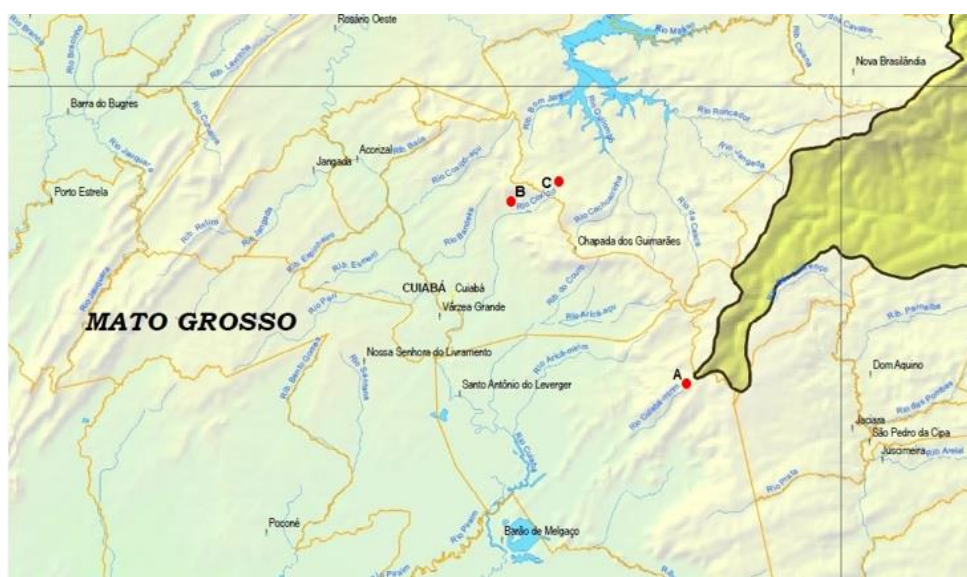
3.1 Material

3.1.1 Locais de coleta

No presente trabalho foram estudadas quatro espécies do gênero *Ancistrus*, coletadas no córrego Cupim, córrego Mutuca e rio Soberbo, pertencentes a Bacia do Paraguai, no Mato Grosso (Figura 1).

A Bacia do Paraguai abrange os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, além de três países vizinhos: Paraguai, Argentina e Bolívia. A região do Mato Grosso abriga um grande número de espécies do gênero *Ancistrus* e as espécies estudadas até o momento mostraram grande diversidade cariotípica. O estado do Mato Grosso possui grande diversidade de sistemas aquáticos e vegetação de três ecossistemas: Cerrado, Amazônia e Pantanal, favorecendo a grande diversidade ictiofaunística dessa região (MARIOTTO, 2008).

Figura 1. Pontos de coletas: A – Córrego Cupim localizado na Serra de São Vicente, no município de Santo Antônio do Leverger; B – Córrego Mutuca localizado na Chapada dos Guimarães, no município de Cuiabá; C – Rio Soberbo localizado na Chapada dos Guimarães, no município de Cuiabá.



Fonte: Agência Nacional das Águas (ANA).

O córrego Cupim está localizado na Serra de São Vicente, no município de Santo Antônio do Leverger. O acesso a este córrego é difícil, pois a estrada é bastante íngreme e de terra. O córrego possui vegetação em sua volta, grande quantidade de pedras, além de uma pequena queda d'água de água límpida (Figura 2 A e B). O córrego Mutuca e o rio Soberbo ficam localizados na região da Chapada dos Guimarães e as coletas foram realizadas em locais utilizados para o lazer de banhistas, possuindo até restaurantes próximo de ambos.. O córrego Mutuca possui grande quantidade de pedras e água límpida (Figura 2 C e D). Já o rio Soberbo apresenta menor quantidade de pedras e maior volume de água (Figura 2 E).

As coletas foram realizadas com auxílio da Profa. Dra. Sandra Mariotto (Instituto Federal do Mato Grosso) e do Prof. Dr. Liano Centofante (Universidade Federal do Mato Grosso) entre outubro/2014 a novembro/2015. Para captura dos peixes foram utilizadas tarrafas. Foram analisados 93 exemplares divididos entre as quatro espécies estudadas do córrego Cupim, Córrego Mutuca e Córrego Soberbo (Tabela 2). A maioria dos exemplares estudados das quatro espécies foram fêmeas e nas três coletas realizadas elas apresentavam ovócitos maduros.

Tabela 2. Número de exemplares estudados de cada espécie.

Bacia	Espécie	Nº de exemplares	Córrego/ Rio – Local
Paraguai	<i>Ancistrus</i> sp. 1 “cupim”	6 ♀/ 7 ♂	Córrego Cupim – Serra de São Vicente
Paraguai	<i>Ancistrus</i> sp. 2 “cupim”	19♀/ 11 ♂	Córrego Cupim – Serra de São Vicente
Paraguai	<i>Ancistrus</i> sp. “mutuca”	20 ♀ / 8 ♂	Córrego Mutuca – Chapada dos Guimarães
Paraguai	<i>Ancistrus</i> sp. “soberbo”	14 ♀ / 8 ♂	Rio Soberbo – Chapada dos Guimarães

Figura 2. Córregos e rio em que as espécies foram coletadas. A e B córrego Cupim localizado na Serra de São Vicente; C e D córrego Mutuca localizado na região da Chapada dos Guimarães; E: rio Soberbo localizado na região da Chapada dos Guimarães. Todos os córregos e o rio estudados fazem parte da bacia do Paraguai.



Fonte: própria autora.

3.1.2 Características morfológicas das espécies estudadas

A maioria das espécies do gênero *Ancistrus* apresenta dimorfismo sexual em relação ao tamanho do barbilhão, sendo esses maiores nos machos e mais curtos nas fêmeas. Além do tamanho dos barbilhões, os machos costumam ter o focinho mais largo do que as fêmeas. A coloração das espécies é bastante variável do preto ao marrom esverdeado, podendo apresentar pintas ou manchas pelo corpo, sendo que a tonalidade da coloração pode variar de acordo com o ambiente (dentro da água adquirem uma coloração diferente quando colocados fora da água) (MARIOTTO, 2008).

As espécies *Ancistrus* sp. 1 “cupim” e *Ancistrus* sp. 2 “cupim” são morfologicamente semelhantes, contudo observando a coloração destas espécies e a distância dos olhos é possível diferenciá-las: *Ancistrus* sp. 1 “cupim” possui coloração dorsalmente escura, não possui manchas e pintas, os olhos são mais distantes uns dos outros e as nadadeiras são escuras com bordas amareladas, enquanto que *Ancistrus* sp. 2 “cupim” possui coloração dorsalmente escura com pintas amareladas distribuídas por todo corpo, olhos mais juntos e nadadeiras amareladas com manchas escuras (Figura 3: A e B).

A espécie *Ancistrus* sp. “mutuca” possui coloração dorsalmente escura com manchas disformes marrons por todo corpo, nadadeiras amareladas com pintas escuras (Figura 3 C). Já a espécie *Ancistrus* sp. “soberbo” apresenta coloração dorsalmente escuro/marrom com pequenas manchas marrons e nadadeiras amareladas com manchas escuras (Figura 3D). Tanto a espécie *Ancistrus* sp. “mutuca” quanto *Ancistrus* sp. “soberbo” possuem dimorfismo sexual, onde o macho apresenta barbilhões maiores do que as fêmeas.

Figura 3. Espécies de *Ancistrus* estudadas no presente trabalho. A: *Ancistrus* sp. 1 “cupim” com coloração escura; B: *Ancistrus* sp. 2 “cupim” com pintas amareladas; C: *Ancistrus* sp. “mutuca” com manchas marrons; D: *Ancistrus* sp. “soberbo” com poucas manchas marrons.



A



B



C



D

Fonte: própria autora.

3.2. Métodos

3.2.1. Indução de Mitose

Para uma maior quantidade de células mitóticas, foi realizada a indução de divisão celular utilizando fermento biológico. O fermento biológico foi feito com açúcar e água e, após a fermentação, foi injetado próximo à nadadeira dorsal dos exemplares, que permaneceram em aquário variando o tempo de 24 horas a 48 horas.

3.2.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos

Para obtenção dos cromossomos mitóticos foi aplicada a técnica descrita por Foresti et al (1993):

Foi injetado colchicina 0,025% na região intraperitoneal numa proporção de 0,1 mL/10 g do animal. Após 25 minutos os exemplares foram sacrificados para retirada do rim anterior e posterior. O rim foi colocado em solução hipotônica de KCl 0,075 M e dissociado com seringa de vidro sem agulha até a obtenção de uma solução homogênea. O material foi mantido durante 20 minutos em estufa a 37°C. Passados 20 minutos, o material foi suspenso com pipeta Pasteur de vidro e foram acrescentadas 20 gotas de fixador Carnoy (3: Metanol/1: Ácido Acético). Com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro o material foi ressuspendido novamente e este foi centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta Pasteur de vidro e foi acrescentado 7 mL de fixador Carnoy, ressuspendendo o material com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm. O material foi novamente fixado com Carnoy e, após a última fixação, o sobrenadante foi descartado e o material foi armazenado em microtubo de 1,5 mL em freezer.

3.2.3 Bandamento C

A técnica de bandamento C, para detecção de heterocromatina constitutiva, foi realizada conforme descrito por Sumner (1972), com algumas modificações:

Foram pingadas duas gotas de preparação cromossômica em lâminas em banho Maria a 60°C. As lâminas com preparação cromossômica foram hidrolisadas em HCl 0,2 N durante 15 minutos em temperatura ambiente e após a hidrólise, foram lavadas com água destiladas e secas em temperatura ambiente. Após estarem secas, as lâminas foram tratadas com Hidróxido de Bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a 2,5 % a 50°C durante 1 minuto. Em seguida foram lavadas com água destilada e passadas rapidamente em HCl a 1N a 50°C. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e incubadas em 2xSSC a 50°C durante 45 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas e coradas com Giemsa em Tampão Fosfato pH 6,8 (1:10) durante 30 minutos.

3.2.4 Impregnação por nitrato de prata (Ag-RON)

Para detecção da região organizadora de nucléolo (NOR) foi utilizado o protocolo descrito por Howell e Black (1980), com algumas alterações:

As preparações cromossômicas foram pingadas em lâminas em banho Maria a 60°C e hidrolisadas em HCl 1N durante 3 minutos em temperatura ambiente. Sobre cada lâmina foi pingada uma mistura de duas gotas de gelatina (1g de gelatina + 50 mL água deionizada + 0,5 mL ácido fórmico) e 3 gotas de nitrato de prata (1g nitrato de prata (AgNO_3) + 2 mL água destilada). As lâminas foram incubadas a 60°C durante aproximadamente 3 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada e coradas com Giemsa e tampão fosfato pH 6,8 (1:10 respectivamente) durante 30 segundos.

3.2.5 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de fígado e nadadeira, utilizando o kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). O protocolo utilizado foi segundo recomendações do fabricante.

3.2.6 Obtenção das sondas de DNAr 18S e 5S

Para obtenção da sonda de DNAr 18S foi realizado primeiramente uma PCR utilizando Mix PCR (Qiagen) a partir de DNA total de cada espécie estudada. Foram utilizados os primers NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS2 5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3'

(WHITE et al. 1990) conforme o protocolo que segue: 6,25 μ L Mix PCR, 5, 25 μ L H₂O, 0,5 μ L Primer 18S NS1, 0,5 μ L Primer 18S NS2, 1,0 μ L DNA. Volume total 13,5 μ L.

O programa utilizado para PCR foi:

	94°C – 5'	
30 ciclos	{	94°C – 45''
		52°C – 45''
		68°C – 1'30''
		68°C – 5'
	Hold 12°C	

A sonda foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por *Nick Translation* e a detecção foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). O protocolo para marcação da sonda foi: 2,78 μ L H₂O; 2 μ L NTB Buffer 10x; 2 μ L dCTP (0,4 mM); 2 μ L dATP (0,4 mM); 2 μ L dGTP (0,4 mM); 0,70 μ L dTTP; 0,52 μ L digoxigenina 11-dUTP; 3 μ L DNA pol I; 5 μ L PCR 18S.

A sonda de DNAr 5S foi obtida a partir de PCR utilizando Mix PCR (Qiagen) a partir de DNA total de cada espécie estudada, utilizando os primers NS1 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e NS2 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3' descritos por Pendás et al. (1994) e Martins e Galetti (1999). O protocolo utilizado foi: 6,25 μ L Mix PCR, 5, 25 μ L H₂O, 0,5 μ L Primer 5S NS1, 0,5 μ L Primer 5S NS2, 1,0 μ L DNA. Volume total 13,5 μ L. O ciclo utilizado para PCR foi:

	94°C – 5'	
30 ciclos	{	95°C – 1'
		61°C – 30''
		72°C – 45''
		Hold 4°C

Após obtenção do produto de PCR, este foi usado para marcação da sonda com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por *Nick Translation* e a detecção foi

realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). O protocolo para marcação da sonda foi o mesmo utilizado na marcação da sonda de DNAr 18S, porém utilizando PCR 5S.

3.2.7 Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

A técnica de FISH foi realizada seguindo protocolo de DA SILVA et al (2012), com algumas modificações.

Passo 1: Desidratação das lâminas e incubação com RNase:

As lâminas com preparação cromossômica foram passadas em série alcoólica 70%, 90% e 100% durante 5 minutos cada em temperatura ambiente e colocadas em estufa a 37°C para secagem. Após estarem secas, foi colocado sobre as lâminas 100 µL de RNase (2,5 µL RNase 20 mg/mL + 997,5 µL 2xSSC) e estas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante uma hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC durante 5 minutos cada lavagem em temperatura ambiente e desidratadas novamente em série alcoólica 70%, 90% e 100% 5 minutos cada à temperatura ambiente;

Passo 2: Desnaturação dos cromossomos e desnaturação das sondas

Os cromossomos foram desnaturados em formamida 70% (70 mL de formamida + 30 mL 2xSSC) durante 50 segundos a 70°C. Após desnaturação, as lâminas foram passadas em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%) durante 5 minutos cada. Para desnaturação da sonda foi utilizado 24µL de *Hybuffer* + 6 µL de sonda (18S ou 5S). A desnaturação ocorreu em termociclador durante 10 minutos a 95°C;

Passo 3: Hibridação

Cada lâmina foi montada com 30 µL da sonda, coberta com lamínula e incubada em câmara úmida a 37°C *overnight*;

Passo 4: Lavagem em 2xSSC

As lâminas foram lavadas em 2xSSC a 72°C durante 10 minutos;

Passo 5: Detecção com anticorpo e lavagem

Para detecção da sonda, foi aplicado em cada lâmina 4 µL de anti-digoxigenina-rodamina + 26 µL de PBD (20xSSC + Triton + leite em pó + água destilada) durante 40 minutos em câmara úmida a 37°C. Após a detecção, as lâminas foram lavadas por 3x em PBD a 45°C, 5 minutos cada lavagem;

Passo 6: Montagem das lâminas

As lâminas foram montadas com 15 µL de solução DAPI + *antifading* (Vectashiled), cobertas com lamínula de vidro e mantidas em geladeira até o momento da visualização em microscópio.

3.2.8 Double FISH

O protocolo utilizado para o *Double FISH* foi o mesmo utilizado para o FISH para localizar o DNAr 18S e 5S, diferindo apenas na desnaturação da sonda e na detecção. O protocolo para marcação da sonda também foi o mesmo, contudo a sonda de 18S foi marcada com biotina 16 dUTP (Roche Applied Science) e a sonda 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). A detecção da sonda de 18S foi feita utilizando Alexa (Thermo Fisher Scientific) e para a sonda 5S anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

Para o *Double FISH* foi utilizado o protocolo descrito no item 3.3.8, com as seguintes modificações:

Desnaturação da sonda: a sonda foi desnaturada com 24 µL de *Hybuffer* + 3 µL de sonda 18S + 3 µL de sonda 5S em termociclador a 95°C durante 10 minutos. Para detecção da sonda foi aplicada sobre cada lâmina 100 µL de PBD + 0,5 µL de Alexa + 0,5 µL de anti-digoxigenina-rodamina e as lâminas foram incubadas durante uma hora em câmara úmida a 37°C.

3.2.9 FISH Telomérica

Para o FISH telomérica foi utilizado o kit Telomere PNA FISH KIT/FITC (DakoCytomation) (TTAGGG)_n, com protocolo descrito pelo fabricante com algumas modificações, que consiste nas seguintes etapas:

Primeiramente as lâminas com preparação cromossômica foram mantidas em estufa a 37°C durante 4 horas. Após este tempo, as lâminas foram submetidas a um pré-tratamento:

Passo 1: Pré-tratamento

As lâminas foram colocadas em TBS (*Tris-Buffered Saline* pH 7,5) por aproximadamente 2 minutos. Em seguida foram incubadas em formaldeído 37% em TBS por exatos 2 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes em TBS por 5 minutos cada lavagem. Depois foram passadas em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%) por 2 minutos cada e foram secas em estufa a 37°C;

Passo 2: Desnaturação e hibridação

Foram adicionados 15 µL da sonda telomérica PNA/FITC (7 µL de sonda + 23 µL de *Hybuffer*) em cada lâmina que foram cobertas com lamínula de vidro 18x18 e em seguida incubadas em banho Maria a 80°C por 5 minutos. As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente;

Passo 3: Lavagens

Posteriormente, as lâminas foram passadas em solução de Rinse por 1 minuto para remoção das lamínulas. Em seguida foram colocadas em solução de lavagem por 5 minutos a 45°C. Após solução de lavagem, as lâminas foram passadas em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%) por 2 minutos cada. Depois de estarem secas, as lâminas foram montadas com 15 µL de solução de *antifade* com DAPI e lamínula de vidro.

3.3 Sequenciamento

Os PCRs foram sequenciados para confirmação se as regiões amplificadas correspondiam aos genes 18S e 5S. Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare), seguindo o protocolo: 10 µL do produto de PCR + 2 µL ExoSAP e 2 µL H₂O milli-Q autoclavada. A reação ocorreu em termociclador utilizando o ciclo:

1x: 37°C – 1 hora

1x: 80°C – 15 minutos

Os produtos de PCR purificados foram enviados para serem sequenciados pela empresa MacroGen Inc. (Seoul, Coréia).

Após o sequenciamento, as sequências foram alinhadas pelo programa Clustal W no Bioedit e colocadas no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

3.3.1 Análise dos cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram escolhidas quanto à qualidade das metáfases para montagem dos cariótipos e para realização das demais técnicas de citogenética clássica e molecular. Foram analisadas também preparações antigas que estavam armazenadas no Laboratório de Genética Animal da UFMT.

Para isto, as preparações foram pingadas em lâminas limpas em banho Maria a 60°C, coradas com Giemsa e tampão fostato pH 6,8 (1:10, respectivamente) durante 10 minutos e observadas em microscópio óptico.

As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado com uma câmera digital Olympus (modelo D71) e as imagens foram capturadas utilizando o programa DP controller. Para montagem dos cariótipos, foi utilizado o programa Corel Draw X6 e os cromossomos foram classificados do maior para o menor, levando em consideração a posição do centrômero.

4 Resultados

As espécies estudadas apresentaram número diploide variando de $2n=42$ a $2n=54$, além de variação relacionada a localização da NOR e do DNAr 5S, que estão distribuídos em diferentes pares cromossômicos (Tabela 3).

A espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim”, possui número diploide $2n=42$, com fórmula cariotípica 12 m, 20 sm, 8 st e número fundamental (NF) igual a 84. A região organizadora de nucléolo (NOR) está localizada na região pericentromérica do braço longo do par 9. *Ancistrus* sp. 2 “cupim” apresentou número diploide $2n=50$, fórmula cariotípica 12 m, 16 sm, 10 st, 12 a, NF igual a 88 e a NOR foi localizada na região pericentromérica do braço longo do par 17, coincidindo com uma região de constrição secundária.

Já a espécie *Ancistrus* sp. “mutuca” apresentou número diploide $2n=54$, fórmula cariotípica 6 m, 18 sm, 14 st, 16, NF igual a 92 e a NOR foi identificada na região terminal do braço longo do par 12. *Ancistrus* sp “soberbo” apresentou número diplóide $2n=54$ sendo sua fórmula cariotípica 6 m, 20 sm, 14 st e 14 a, com NF igual a 94 e a região organizadora de nucléolo nesta espécie foi localizada na região terminal do braço longo do par 18.

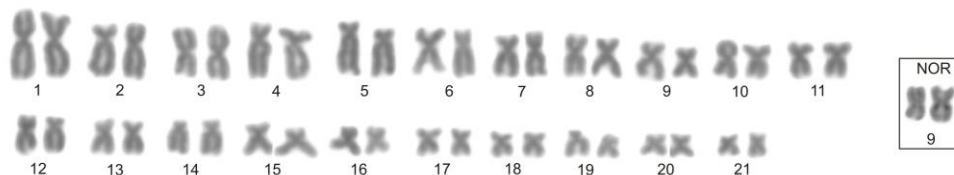
Comparando os resultados das quatro espécies estudadas, pode-se perceber que as espécies com maiores números diploide apresentaram grande quantidade de cromossomos acrocêntricos, enquanto a espécie $2n=42$ apresentou predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Figura 4).

Tabela 3. Tabela descritiva dos resultados obtidos de cada espécie. NF: Número fundamental; NOR: Região organizadora de nucléolo.

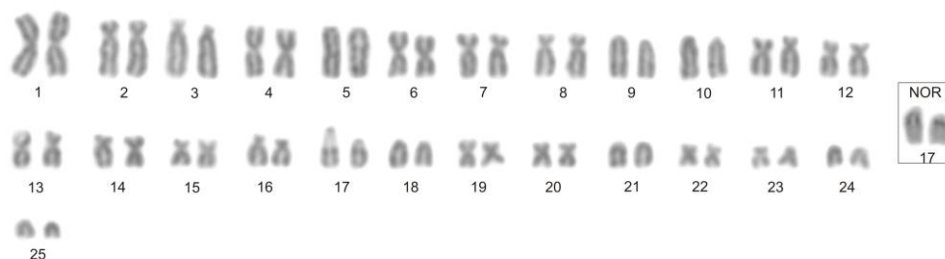
Espécies	2n	NF	NOR	18S	5S
<i>Ancistrus</i> sp. 1 “cupim”	$2n=42$	84	2m	2m	4m, 4sm
<i>Ancistrus</i> sp. 2 “cupim”	$2n=50$	88	2a	2a	2m, 2st, 6a
<i>Ancistrus</i> sp. “mutuca”	$2n=54$	92	2m	2m	2m, 4sm, 2a
<i>Ancistrus</i> sp. “soberbo”	$2n=54$	94	2m	2m	4sm, 2st, 2a

Figura 4. Cariótipos das quatro espécies estudadas. *Ancistrus* sp. 1 cupim com $2n=42$; *Ancistrus* sp. 2 “cupim” com $2n=50$; *Ancistrus* sp. “mutuca” com $2n=54$ e *Ancistrus* sp. “soberbo” com $2n=54$. Cromossomos corados com Giemsa. Em destaque os cromossomos portadores da NOR.

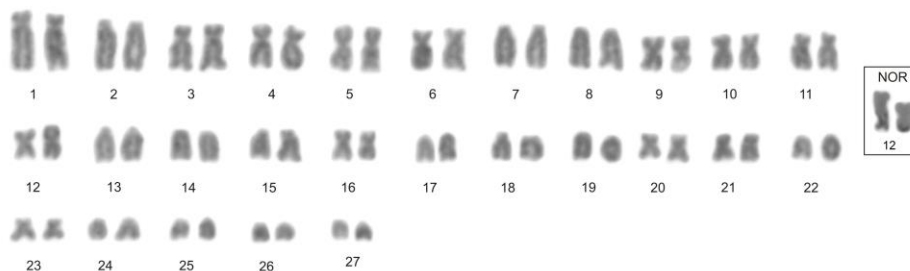
Ancistrus sp. 1 ‘cupim’



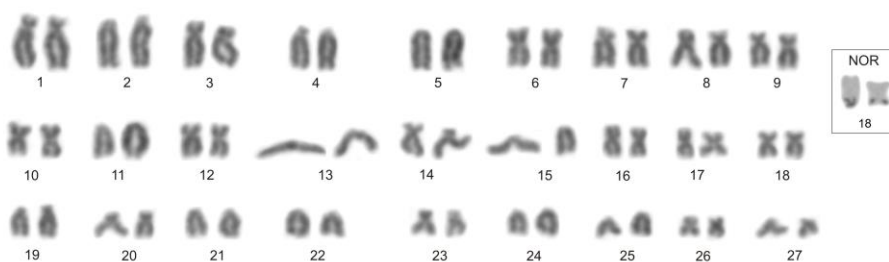
Ancistrus sp. 2 ‘cupim’



Ancistrus sp. ‘mutuca’



Ancistrus sp. ‘soberbo’



Fonte: Elaborada pela autora.

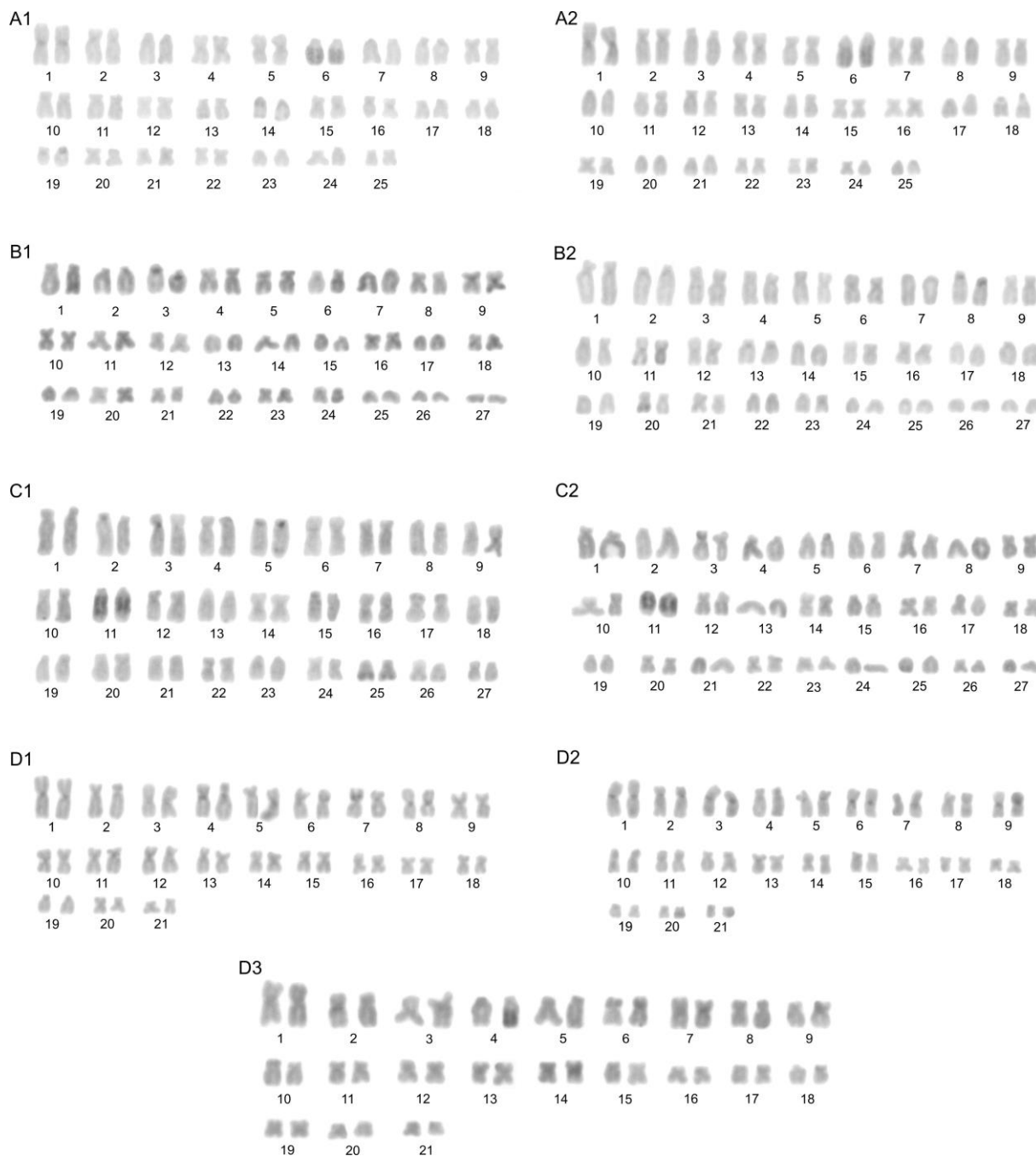
Em relação aos resultados obtidos pela técnica de bandamento C, as fêmeas da espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” apresentaram marcações de heterocromatina na região centromérica dos pares 1, 2, 4, 8, 14, 16 e 19. Os pares 4 e 14 além das centroméricas, também apresentaram marcações terminais e o par 6 mostrou dois grandes bloco de heterocromatina no braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos (Figura 5 A1). Nos machos foi possível observar heterocromatina na região centromérica dos pares 1, 2, 4 e 8, e o par 6 apresentou dois grandes blocos de heterocromatina no braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos (Figura 5 A2), igual ao observado nas fêmeas. Esse grande bloco de heterocromatina encontrado tanto nos machos quanto nas fêmeas ocupa quase todo o braço longo do par de cromossomos, exceto uma pequena região pericentromérica.

Em *Ancistrus* sp. “mutuca” os cromossomos apresentam pouca heterocromatina. Nos cromossomos das fêmeas foi possível observar regiões heterocromáticas apenas nos centrômeros dos pares 3, 9, 16 e 19 (Figura 5 B1), e nos machos foi observada heterocromatina nos centrômeros dos pares 9, 11 e 13, sendo possível observar marcação terminal neste último par. Além disso, o par 20 apresentou marcação terminal em apenas um dos cromossomos homólogos (Figura 5 B2).

As fêmeas da espécie *Ancistrus* sp. “soberbo” apresentaram marcações centroméricas nos pares 2, 3, 5 e 9, marcações terminais nos pares 17, 25 e 26 e além dessas marcações foi possível observar também dois blocos grandes de heterocromatina no braço longo do par 11 (Figura 5 C1). Os machos dessa espécie apresentaram heterocromatina na região terminal do par 25 e um bloco grande no braço longo do par 11 (Figura 5 C2). O bloco grande de heterocromatina encontrado em ambos os sexos abrange quase todo o braço longo com exceção de uma pequena região pericentromérica e terminal.

Os cromossomos da espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim” apresentaram pouca heterocromatina tanto nos machos quanto nas fêmeas, contudo apenas um exemplar fêmea apresentou um bloco de heterocromatina que se destaca em um dos homólogos do par 7, além de marcações centroméricas nos pares 2 e 4 (Figura 5 D3). Nas fêmeas, em geral, foi possível observar marcações centroméricas nos pares 1, 4, 5, 7, 8 e 11 (Figura 5 D1) e os machos apresentaram apenas marcações centroméricas nos pares 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 e 13 (Figura 5 D2).

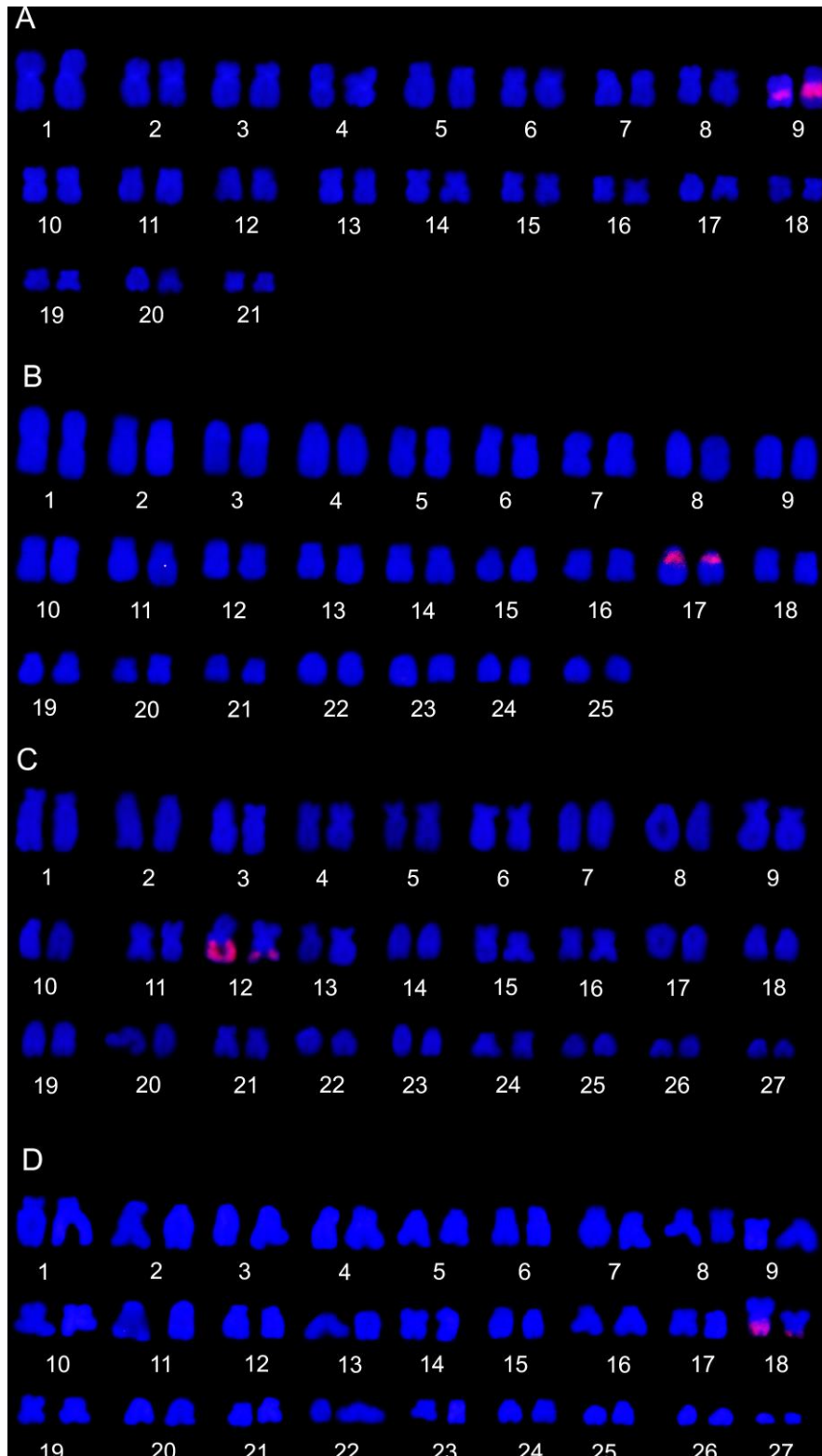
Figura 5 . Bandamento C das quatro espécies estudadas: A1: *Ancistrus* sp. 2 “cupim” fêmea e A2 *Ancistrus* sp. 2 “cupim” macho; B1 e B2 *Ancistrus* sp. “mutuca” fêmea e macho, respectivamente; C1 e C2 *Ancistrus* sp. “soberbo” fêmea e macho, respectivamente; D1 e D2 *Ancistrus* sp. 1 “cupim” fêmea e macho, respectivamente; D3 *Ancistrus* sp. 1 “cupim” único exemplar fêmea que apresentou um cromossomo com um bloco grande de heterocromatina no braço longo do par 7.



Fonte: Elaborada pela autora.

O FISH com sonda de DNAr 18S mostrou marcações no mesmo sítio da NOR, evidenciado pela técnica de Ag-RON, nas quatro espécies. A espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim” possui DNAr 18S localizado na região pericentromérica do par 9 (Figura 6 A). Em *Ancistrus* sp. 2 “cupim” o DNAr 18S está localizado na região pericentromérica do par 17 (Figura 4 B) e em *Ancistrus* sp. “mutuca” e *Ancistrus* sp. “soberbo” o DNAr 18S está localizado em região terminal nos pares 12 e 18 respectivamente (Figura 6 C e D). Vale ressaltar que as quatro espécies apresentaram heteromorfismo de tamanho do sítio de DNAr 18S em um dos homólogos, sendo essa característica observada tanto nos machos quanto as fêmeas.

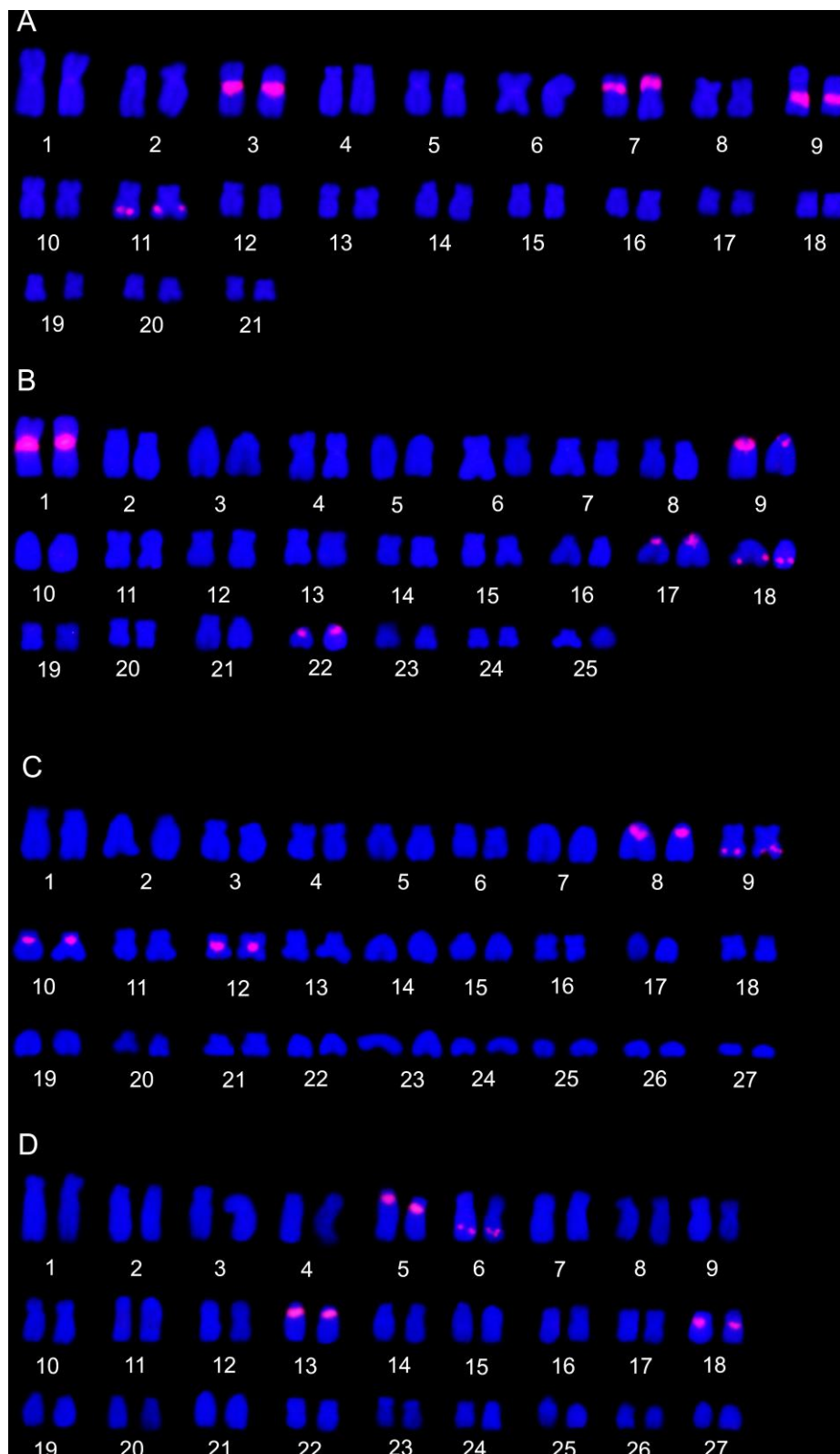
Figura 6. FISH com sonda de DNAr 18S nas quatro espécies estudadas. Todas as espécies apresentaram marcação DNAr 18S coincidente com a marcação obtida pela técnica de Ag-RO-N. A: *Ancistrus* sp. 1 “cupim”; B: *Ancistrus* sp. 2 “cupim”; C: *Ancistrus* sp. “mutuca”; D: *Ancistrus* sp. “soberbo”.



Fonte: Elaborada pela autora.

O DNAr 5S foi encontrado em diferentes pares e localizações cromossômicas. A espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim” apresentou DNAr 5S distribuído por 4 pares de cromossomos, estando localizado na região centromérica dos pares 3 e 9, e na região terminal dos pares 7 e 11 (Figura 7 A). *Ancistrus* sp. 2 “cupim” apresentou marcação de DNAr 5S em 5 pares de cromossomos, localizado na região centromérica dos pares 1, 9, e 22, e na região terminal do par 18 (Figura 7 B). *Ancistrus* sp. “mutuca” possui DNAr 5s na região centromérica dos pares 8, 10 e 12 e na região terminal do par 9 (Figura 7 C). Na espécie *Ancistrus* sp. “soberbo” o DNAr está distribuído em 4 pares, localizado na região centromérica do par 5, 13 e 18, e na região terminal do par 6 (Figura 7 D).

Figura 7. Cariótipos das quatro espécies estudadas com marcações de DNAr 5S. A: *Ancistrus* sp. 1 “cupim” 4 pares de cromossomos marcados; B: *Ancistrus* sp. 2 “cupim” 5 pares de cromossomos marcados; C: *Ancistrus* sp. “mutuca” 4 pares de cromossomos marcados; D: *Ancistrus* sp. “soberbo” 4 pares de cromossomos marcados.

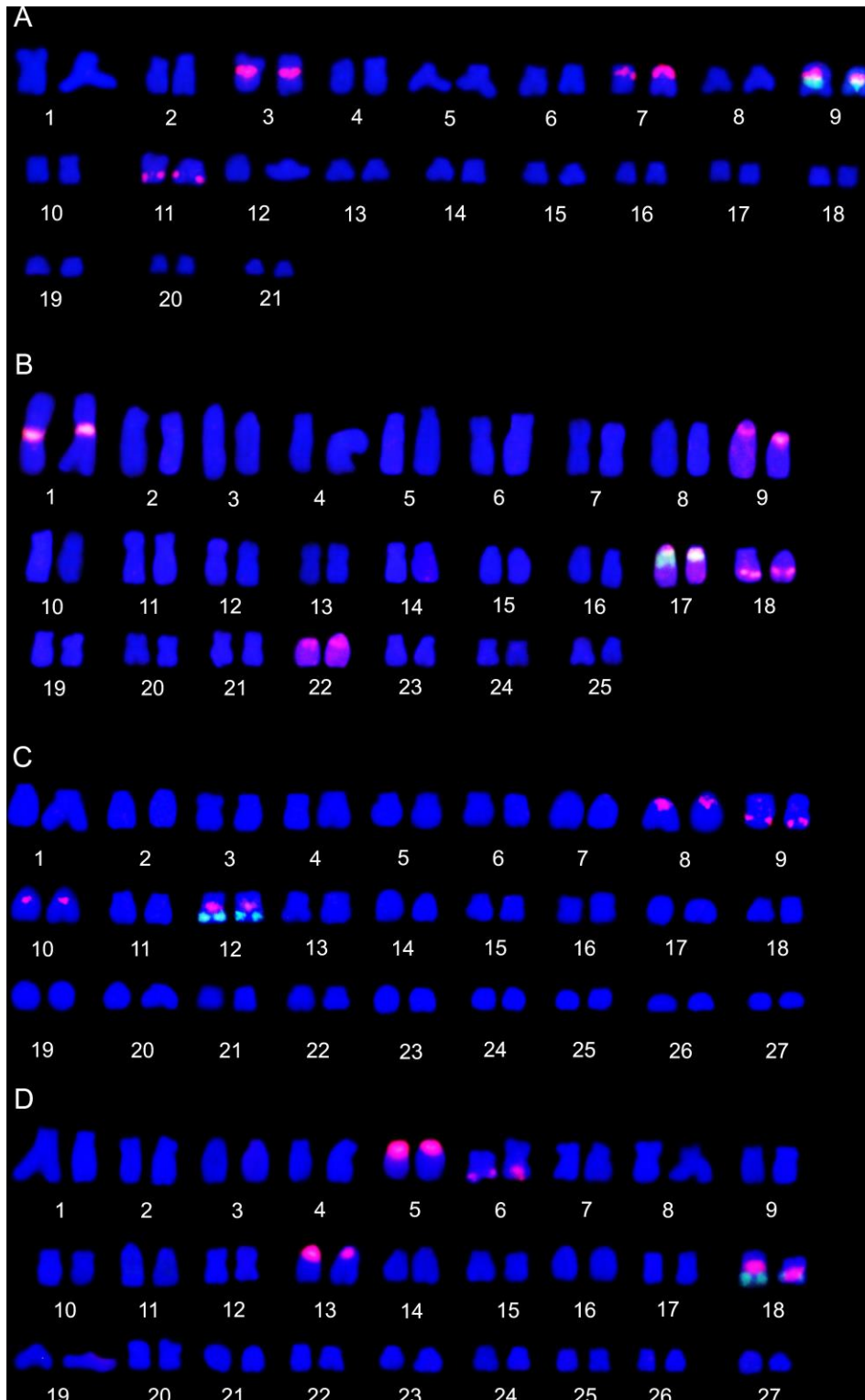


Fonte: Elaborada pela autora.

O *double FISH* utilizando sonda de DNAr 18S e 5S mostrou que nas quatro espécies o par portador do sítio de DNAr 18S, também possui sítio de DNAr 5S, entretanto esses genes não estão co-localizados. Esses sítios estão no par 9 da espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim” (Figura 8 A), no par 17 em *Ancistrus* sp. 2 “cupim” (Figura 8 B), no par 12 em *Ancistrus* sp “mutuca” (Figura 8 C) e no par 18 em *Ancistrus* sp. “soberbo” (Figura 8 D). Vale ressaltar que estes genes apesar de não estarem co-localizados, estão no mesmo braço cromossômico, localizados muito próximos um do outro.

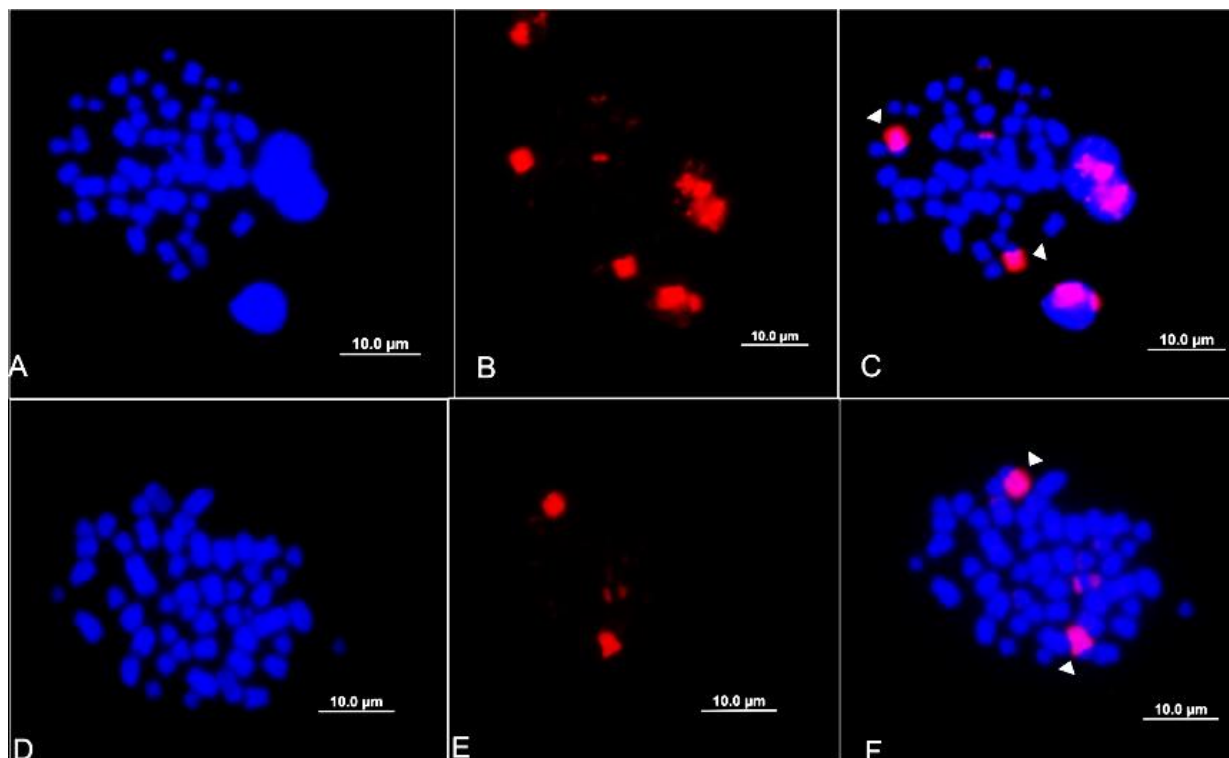
Foram observadas um total de 360 metáfases de FISH das espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” e *Ancistrus* sp. “soberbo”. Do total de metáfases observadas, 141 mostraram resultados diferentes dos descritos acima, tanto para FISH 5S (Figura 9 e 10: A, B e C) como para o FISH 18S (Figura 9 e 10: D, E e F) e para o *Double FISH* (Figura 11). Neste caso, tanto a sonda de 18S quanto a de 5S hibridaram nos blocos grandes de heterocromatina encontrados nessas espécies. Os produtos de PCR foram sequenciados, as sequências amplificadas foram colocadas no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e os genes amplificados eram mesmo de DNAr 18S e 5S. Após várias repetições da técnica, foram observados os dois resultados, sendo que em algumas lâminas havia metáfases com DNAr localizado em blocos de heterocromatina e em outras os resultados não mostraram marcações nos blocos de heterocromatina.

Figura 8. *Double FISH* com as sondas de DNAr 18S e 5S nas espécies de *Ancistrus*. As quatro espécies apresentaram par de cromossomos portador de DNAr 18S (verde) com sítio de DNAr 5S (vermelho) e esses genes não estão co-localizados, contudo estão no mesmo braço cromossômico.



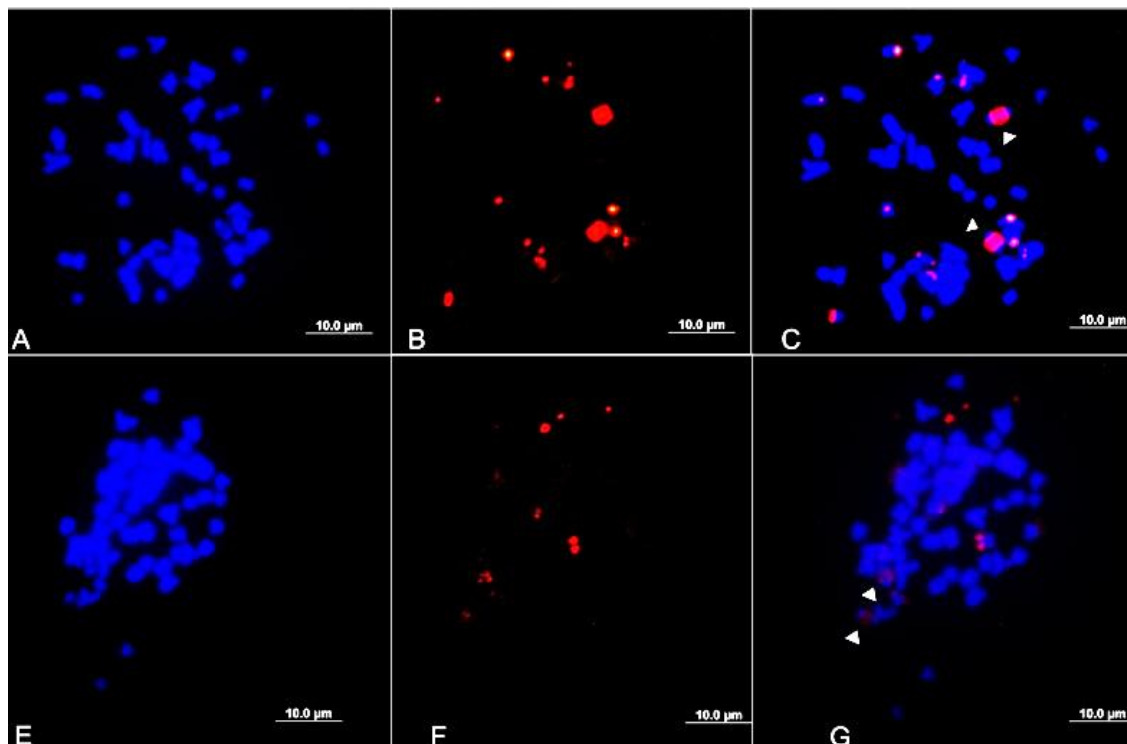
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9. FISH 5S (A, B e C) e 18S (D, E e F) na espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” com marcações em blocos de heterocromatina (cabeça de seta).



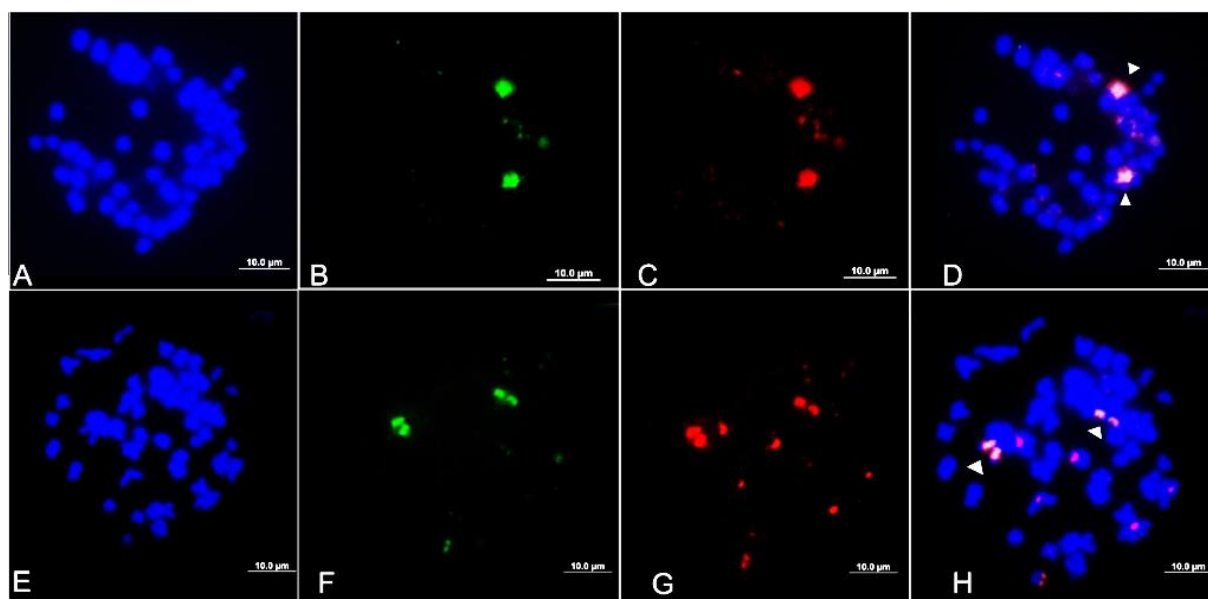
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10. FISH 5S (A, B e C) e 18S (D, E e F) na espécie *Ancistrus* sp. “soberbo” com marcações em blocos de heterocromatina (cabeça de seta).



Fonte: Elaborada pela autora.

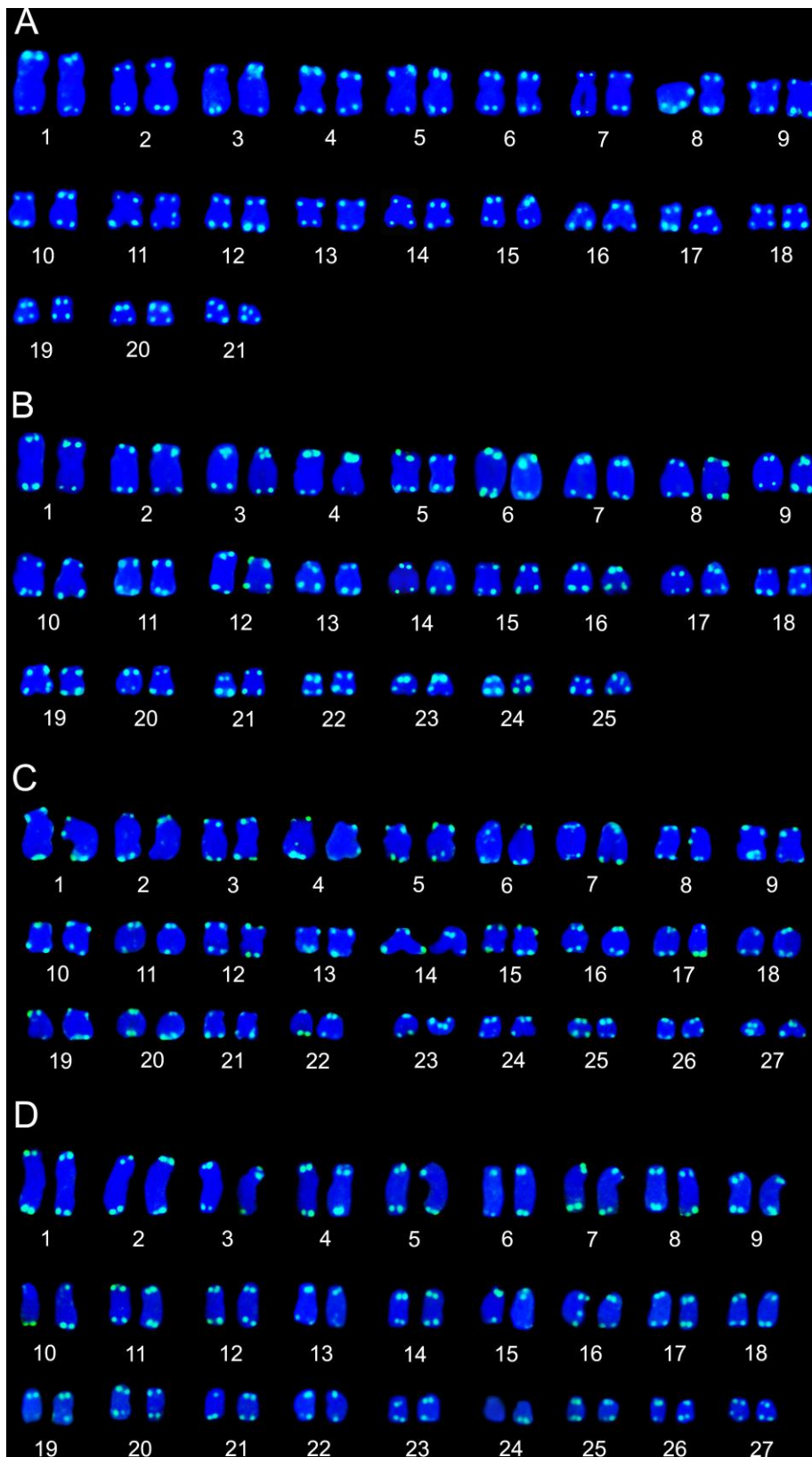
Figura 11. Double FISH com sondas de DNAr 18S (verde) e 5S (vermelho) nas espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” (A, B, C e D) e *Ancistrus* sp. “soberbo” (E, F, G e H), ambas as espécies apresentaram DNAr localizado em blocos de heterocromatina (cabeça de seta).



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a FISH telomérica, todas as espécies apresentaram marcações nos telômeros (Figura 12 A, B, C e D), com exceção da espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” que mostrou marcações teloméricas e marcação pericentromérica no par 3 (Figura 12 B).

Figura 12. FISH telomérica das quatro espécies de *Ancistrus*: A: *Ancistrus* sp. 1 “cupim”; B: *Ancistrus* sp. 2 “cupim”; C: *Ancistrus* sp. “mutuca”; D: *Ancistrus* sp. “soberbo”, evidenciando apenas marcações nos telômeros e marcação pericentromérica no par 3 da espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” (B).



Fonte: Elaborada pela autora

5 Discussão

Os resultados obtidos evidenciam uma grande variação cariotípica para as espécies de *Ancistrus*, tanto em relação ao número diploide ($2n=42$ a $2n=54$) como no número fundamental, na distribuição das regiões de heterocromatina constitutiva e no número e localização de sítios de DNAr 18S e 5S. Outras espécies de *Ancistrus* da bacia do Paraguai já foram estudadas por Mariotto (2008) que também relatou variações cariotípicas, porém algumas das espécies estudadas pela autora apresentaram números diploides semelhantes aos encontrados no presente trabalho como, por exemplo, *Ancistrus claro*, *Ancistrus* sp. 03 e *Ancistrus* sp. 01 que mostraram número diploide de $2n=54$ e *Ancistrus cf. dubius* com $2n=42$.

No presente trabalho foi observado que a morfologia dos cromossomos variou de acordo com o número diploide, sendo que as espécies com maiores números diploides mostraram maior número de cromossomos acrocêntricos, enquanto que a espécie $2n=42$ apresentou predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Comparando os resultados do presente trabalho com aqueles descritos por Mariotto (2008) para espécies de *Ancistrus* da bacia do Paraguai, percebe-se que essa diferença na morfologia dos cromossomos em relação ao número diploide é característica para as espécies desta região.

Trabalhos realizados até 2003 evidenciavam espécies de *Ancistrus* com no máximo $2n=52$ cromossomos e predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (ARTONI; BERTOLO, 2001; SOUZA, 2003; de OLIVEIRA, 2006). No presente trabalho foi mostrada a existência de espécies com números diploides maiores, como o de $2n=54$ indicando a ocorrência de possíveis rearranjos dos tipos fusões ou fissões cêntricas, contribuindo para a redução ou aumento do número diploide. Nas espécies com $2n=54$ observa-se a presença de cromossomos acrocêntricos, que não estão presentes na espécie com $2n=42$. Uma hipótese para tal fato seria a ocorrência de fusão centromérica dos cromossomos acrocêntricos levando a uma redução no número diploide. Contudo, ao observar a fórmula cariotípica destas espécies, apenas a fusão cêntrica de cromossomos acrocêntricos não levaria a um cariótipo com número diploide $2n=42$. Desta forma outros rearranjos cromossômicos podem estar envolvidos na redução no número diploide da espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim”.

As quatro espécies estudadas no presente trabalho, apresentaram NOR única, porém foram localizadas em diferentes posições de diferentes pares cromossômicos. Nenhuma dessas espécies apresentou NOR intersticial, sendo que a maioria das espécies de *Ancistrus* já

estudadas apresentam NOR intersticial. De Oliveira e colaboradores (2009) sugeriram que a NOR na região intersticial das espécies de *Ancistrus* pode ter sido resultado de vários rearranjos cromossômicos, principalmente de fusões cêntricas, que possivelmente ocorreram na evolução cromossômica das espécies.

Ao comparar os resultados da localização da NOR obtidos no presente trabalho com as espécies da Bacia do Paraguai estudadas por Mariotto (2008), observa-se a ocorrência de possíveis rearranjos do tipo fusão e inversão, uma vez que as espécies do presente trabalho com $2n=54$ apresentam NOR terminal em um par de cromossomos metacêntricos e as espécies estudadas por Mariotto (2008) com número diploide $2n=54$ possuem NOR intersticial em cromossomos acrocêntricos.

A espécie *Ancistrus* sp. “mutuca” possui número diploide $2n=54$ com NOR na região terminal e foi coletada no córrego Mutuca localizado na Chapada dos Guimarães. A espécie *Ancistrus claro* possui o mesmo número diploide e foi estudada por Mariotto e colaboradores (2011), sendo que esta espécie também foi coletada na Chapada dos Guimarães contudo no córrego Coxipó, e os autores a consideram como sendo basal. Uma das diferenças da espécie estudada no presente trabalho e da espécie estudada por Mariotto e colaboradores (2011) é a localização do DNAr 18S e 5S, onde em *Ancistrus* sp “mutuca” foi encontrado na região terminal e região pericentromérica, respectivamente, em um par de cromossomos metacêntricos, enquanto que em *Ancistrus claro* os genes foram co-localizados na região intersticial de um par de cromossomos acrocêntricos. Comparando as duas espécies, podemos criar uma possível hipótese de rearranjos cromossômicos que podem ter ocorrido em relação a localização da NOR. Pode ter ocorrido fusão cromossômica do par portador da NOR com outro par de cromossomos acrocêntricos da espécie *Ancistrus claro* gerando um par de cromossomos metacêntricos, seguida de inversão paracêntrica do sítio do DNAr 18S originando a localização na região terminal, assim como encontrada na espécie *Ancistrus* sp. “mutuca”, vale ressaltar que outros rearranjos cromossômicos podem estar envolvidos na evolução cariotípica destas espécies.

Além da diferença na localização e no par de cromossomos portadores da NOR, também é possível observar um heteromorfismo de tamanho da região organizadora de nucléolo em um dos homólogos das quatro espécies estudadas, tendo como consequência um heteromorfismo de tamanho deste homólogo. Este tipo de heteromorfismos de tamanho já foi observado também em outras espécies de *Ancistrus*, como *Ancistrus ranunculus* (de OLIVEIRA et al., 2007) e em

quatro espécies de *Ancistrus* da bacia do Paraguai estudadas por Mariotto e colaboradores (2011).

No presente trabalho, os resultados obtidos pela técnica de FISH usando a sonda de DNAr 18S foram iguais aqueles obtidos pela técnica de Ag-RON, porém o FISH mostrou com maior clareza o heteromorfismo de tamanho observado principalmente nas espécies *Ancistrus* sp. 1 “cupim”, *Ancistrus* sp. “mutuca” e *Ancistrus* sp. “soberbo”.

Polimorfismos de tamanho da região organizadora de nucléolo são comuns em peixes neotropicais (FORESTI et al., 1981) e já foram bastante relatados para espécies da família Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 1996; ALVES et al., 2003). Uma possível explicação para esse heteromorfismo seria rearranjos cromossômicos, como por exemplo, duplicação em tandem das sequências de DNAr em um dos homólogos, gerando um heteromorfismo da NOR e consequentemente aumentando o tamanho do cromossomo portador desse heteromorfismo (GOLD, 1984).

As espécies estudadas no presente trabalho mostraram também variação na quantidade e na localização da heterocromatina constitutiva, mostrando que este marcador pode ser utilizado para diferenciar espécies de *Ancistrus*. As espécies *Ancistrus* sp. 1 “cupim” ($2n=42$) e *Ancistrus* sp. “mutuca” ($2n=54$) estudadas no presente trabalho apresentaram baixa quantidade de heterocromatina, desta forma em *Ancistrus* não há um padrão entre número diploide e quantidade de heterocromatina. Espécies de *Ancistrus* com número diploide alto e pouca heterocromatina já foi observado por Mariotto e colaboradores (2013). Em um trabalho realizado por Artoni e Bertollo (1999) com *Hypostomus*, foram observados dois padrões de distribuição de heterocromatina. Os autores associaram espécies com maior número diploide com maior quantidade de heterocromatina e as espécies com menor número diploide com menos heterocromatina, sugerindo uma relação entre heterocromatina e número diploide.

As espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” e *Ancistrus* sp. “soberbo” apresentaram dois grandes blocos de heterocromatina no braço longo dos cromossomos do par 6 e par 11, respectivamente, tanto nos machos quanto nas fêmeas, mostrando um padrão de distribuição de heterocromatina ainda não descrito para nenhuma outra espécie de *Ancistrus*. A presença desses blocos de heterocromatina pode estar associada à diferenciação de cromossomos sexuais ou pode ser também utilizada como um par macardor para estas espécies.

Várias espécies de *Ancistrus* já mostraram a presença de cromossomos sexuais do tipo simples e múltiplos (Tabela 1). *Ancistrus cf. dubius*, por exemplo, tem um sistema sexual do tipo XX/XY, sendo que o macho é heteromórfico e esse heteromorfismo foi observado a partir

do resultado de bandamento C, que nos machos um dos cromossomos, provavelmente o Y, mostra um bloco grande de heterocromatina em um dos homólogos (MARIOTTO; MYAZAWA, 2006). De Oliveira (2006), descreveu a presença de cromossomos sexuais do tipo XX/XY em *Ancistrus* sp. 5 “Rio Branco”, observando a presença desses cromossomos na meiose, uma vez que no bandamento C esses cromossomos não se mostraram heterocromáticos. Nesse caso, o par sexual apresentou um heteromorfismo de tamanho cromossômico nos machos.

Sistema sexual do tipo ZZ/ZW também já foi descrito para espécies do grupo dos *Ancistrus*. *Ancistrus* cf. *dubius* mostra um acúmulo de heterocromatina no cromossomo Z, enquanto que o W aparece bem menor comparado ao Z e em relação a heterocromatina (MARIOTTO et al., 2004). Já em *Ancistrus ranunculus*, o cromossomo W possui o braço longo quase todo heterocromático e o Z apresenta um pequeno bloco de heterocromatina na região centromérica (de OLIVEIRA, 2007).

Apenas um exemplar fêmea da espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim”, estudado no presente trabalho, apresentou o braço longo de um dos homólogos quase todo heterocromático de um par de cromossomos subtelocêntricos, enquanto que os machos não apresentaram blocos de heterocromatina (Figura 4 D1), esse resultado pode indicar a ocorrência de polimorfismo cromossômico nesta espécie.

Mariotto e colaboradores (2011) acreditam que as espécies da bacia do Paraguai sejam mais derivadas por possuírem mais heterocromatina e presença de sistemas de cromossomos sexuais, como já descrito em *Ancistrus* cf. *dubius* e *Ancistrus* sp. 08. Apesar da região organizadora de nucléolo e a heterocromatina constitutiva serem importantes marcadores citotaxonômicos para *Ancistrus*, a grande variabilidade e distribuição entre as espécies prejudica o uso desses marcadores em estudos de reconstrução filogenética (de OLIVEIRA et al., 2009).

A Hibridação *in situ* tendo como sonda o DNAr 5S mostrou diferentes resultados para as espécies estudadas, tanto em pares cromossômicos diferentes, quanto na sua localização. Nas quatro espécies estudadas foram observadas marcações centroméricas e terminais em diferentes pares cromossômicos, distribuído entre 4 pares e 5 pares de cromossomos. A distribuição do DNAr 5S se mostra diversificada entre as diferentes espécies de *Ancistrus* já estudadas, podendo ser encontrado em 2 pares de cromossomos em *Ancistrus* sp. 13 (MARIOTTO et al., 2011) até 13 pares de cromossomos em *Ancistrus dolichopterus* (FAVARATO et al., 2016). A localização do gene ribossomal 5S em vários sítios já foi descrita em outros grupos de peixes,

como em *Astyanax scabripinnis* (FERRO et al., 2001) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (DINIZ; BERTOLLO, 2003). A localização de um único cromossomo portador do DNAr 5S parece ser uma característica ancestral em peixes (PENDÁS et al., 1994; MARTINEZ et al., 1996).

De acordo com nossos resultados, o DNAr 5S localizado em regiões centroméricas e terminais nos permite fazer inferências sobre possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na distribuição desse gene. Poderia ter ocorrido fusão cêntrica nos pares de cromossomos acrocêntricos portadores do DNAr 5S na região centromérica, ocasionando a origem de cromossomos metacêntricos com marcações centroméricas. Outra hipótese seria a ocorrência de inversões pericêntricas onde o cromossomo com marcação na região terminal do braço curto daria origem a marcação na região terminal do braço longo, e inversões paracêntricas nos cromossomos com marcações centroméricas, dando origem a marcações terminais.

Mariotto e colaboradores (2011) hibridaram sondas dos genes 5S e 18S em espécies de *Ancistrus* de três bacias hidrográficas do Mato Grosso e os resultados evidenciaram rearranjos cromossômicos nas espécies de *Ancistrus* sp. da bacia do Paraguai. Algumas espécies de *Ancistrus* sp. apresentaram marcações cromossômicas do gene 18S em regiões intersticiais. Outras espécies de *Ancistrus* sp. apresentaram marcações cromossômicas terminais do gene 18S, sugerindo que ocorreram possíveis fusões cromossômicas nestas espécies. Além da variação de marcação do gene 18S, as espécies envolvidas no estudo apresentaram variação nas marcações do DNAr 5S, que foram localizadas em vários pares de cromossomos. Além disso, algumas espécies apresentaram sintonia entre o DNAr 18S e 5S. Neste estudo os autores propõem que a espécie *Ancistrus claro* ($2n=54$) seja primitiva e que ocorreram inúmeros rearranjos cromossômicos, como fusão, inversão, deleção e duplicação que contribuíram para a redução no número diploide das espécies de *Ancistrus*.

Em um trabalho realizado por Favarato e colaboradores (2016), foram localizados os genes de DNAr 45S e 5S em espécies de *Ancistrus* da região Amazônica, do Pará e de Roraima. Com os resultados obtidos, os autores utilizaram a espécie *Ancistrus claro* (MARIOTTO et al., 2011) como basal para hipotetizar possíveis rearranjos cromossômicos em dois cenários evolutivos para o gênero *Ancistrus* relacionados a localização do 45S e 5S. No primeiro, algumas espécies estudadas apresentaram sintonia entre o DNAr 45S e 5S e outras não apresentaram essa sintonia, de forma que poderia ter ocorrido fusões cêntricas causando a redução do número diploide, onde várias espécies mantiveram a sintonia dos genes ribossomais. O outro cenário seria a quebra dessa sintonia caracterizando um sítio frágil no genoma.

As espécies estudadas no presente trabalho não apresentaram sintenia dos genes ribossomais 18S e 5S, contudo esses genes estão localizados em um mesmo par cromossômico e no mesmo braço. A sintenia de genes ribossomais nos cromossomos parece ser uma característica primitiva em Loricariidae (BERTOLLO et al., 1978). A ausência de sintenia dos genes de DNAr 18S e 5S e a redução no número diploide pode representar uma condição derivada para o grupo de *Ancistrus* (FAVARATO et al., 2016). A localização dos genes 18S e 5S em um mesmo par cromossômico corrobora com as hipóteses de que as espécies de *Ancistrus* sofreram intensos rearranjos cromossômicos gerando a enorme variedade de cariótipos encontrados entre as espécies.

A localização do DNAr 18S e 5S em regiões de blocos de heterocromatina já foi relatada para *Ancistrus abilhoai*, no qual tanto o DNAr 18S quanto o 5S estavam em sintenia e co-localizados em região heterocromática (RIBEIRO et al., 2015). No presente trabalho, os genes de DNAr 18S e 5S não mostraram co-localização e sintenia entre si, na maioria dos resultados, no entanto em *Ancistrus* sp. 2 “cupim”, o par 1 possui marcação de heterocromatina na região centromérica e marcação de DNAr 5S nesta região.

Nos resultados em que esses genes apresentaram co-localização com blocos de heterocromatina nas espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” e *Ancistrus* sp. “soberbo” não é possível afirmar se realmente está correto, já que mostrou variação nos resultados. O que poderia estar ocorrendo é hibridação em alguma sequência parecida, e, para confirmação, será necessário a realização de FISH utilizando outras sondas de DNAr.

Os resultados de FISH utilizando sonda telomérica mostrou marcação pericentromérica no par 3 da espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim”. Em peixes ITSs pericentroméricas podem estar associados a regiões de heterocromatina constitutiva (MEYNE et al., 1990; GO et al., 2000; MILHOMEM et al., 2008; CIOFFI et al., 2010; SCACCHETTI et al., 2011; ROSA et al., 2012), contudo o par cromossômico que apresenta ITS pericentromérica estudado no presente trabalho, não possui heterocromatina constitutiva nessa região.

Caso semelhante foi observado em *Ancistrus dolichopterus* no qual o sítio de DNAr 5S hibridaram na região intersticial de cromossomos e também em co-localização com regiões de ITS, nos pares 1 e 8, Favarato e colaboradores (2016) sugerem que a localização dos genes de DNAr e sequências teloméricas atuaram como marcadores para a identificação de rearranjos cromossômicos nas espécies estudadas, e além disso, os autores propõem que os sítios com sequências repetitivas se tratam de pontos frágeis no genoma para a ocorrência de possíveis rearranjos cromossômicos. No presente trabalho, a espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” apresentou

ITS em região pericentromérica, porém este sítio não está co-localizado com o gene de DNAr 5S. No entanto, essa região de ITS pode indicar possível rearranjo cromossômico ocorrido no par de cromossomos, mesmo não estando co-localizado com outras sequências de DNA repetitivo.

Se os telômeros perdem sua função, mas continuam nas extremidades dos cromossomos, que sofreram fusões podem mostrar sequências teloméricas repetitivas nos pontos de fusão. Desta forma sequências teloméricas localizadas em regiões pericentroméricas e intersticiais são considerados como resquícios de rearranjos cromossômicos (MEYNE et al., 1990). A presença de ITS na região pericentromérica da espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” pode indicar um possível rearranjo do tipo fusão ou inversão.

A presença de sequências teloméricas apenas nos telômeros das outras espécies não significa que não houve rearranjos cromossômicos na evolução cariotípica. Pode ocorrer perda e degeneração de sequências teloméricas presentes nos sítios de fusão, levando ao encurtamento não funcional dessas sequências (SLIJEPCVIC, 1998). Desta forma, sequências ITSs muito curtas podem não ser identificadas pelas técnicas de FISH (OCALEWICZ, 2013).

O uso de técnicas de citogenética clássica e molecular nos permitiu caracterizar as quatro espécies de *Ancistrus* estudadas, e sugerir a ocorrência de possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica das espécies estudadas. Além disso, foi possível comparar os resultados obtidos com cariótipos de outras espécies de *Ancistrus* estudadas por Mariotto (2008) pertencentes a bacia do Paraguai e criar hipóteses de possíveis rearranjos cromossômicos ocorridos entre as espécies.

6 Considerações Finais

As espécies estudadas neste trabalho apresentaram grande variação cariotípica, tanto em relação ao número diploide de $2n=42$ a $2n=54$, quanto na morfologia dos cromossomos, onde as espécies com maior número diploide apresentaram cromossomos acrocêntricos e a espécie com $2n=42$ não apresentou cromossomos acrocêntricos. Esses resultados contribuem com as hipóteses de rearranjos cromossômicos do tipo fusão cêntrica estarem envolvidos na redução do número diploide nas espécies do gênero *Ancistrus*.

A espécie *Ancistrus* sp. “mutuca” apresentou pouca heterocromatina constitutiva tanto nos machos quanto nas fêmeas. O resultado observado na espécie *Ancistrus* sp. 1 “cupim” indica a ocorrência de polimorfismo cromossômico, pois apenas um exemplar apresentou bloco grande de heterocromatina em um dos cromossomos homólogos. Já nas espécies *Ancistrus* sp. 2 “cupim” e *Ancistrus* sp. “soberbo” podemos observar a ocorrência de um possível processo de diferenciação de sistemas de cromossomos sexuais, já que estas espécies apresentaram blocos grandes de heterocromatina, ou os blocos grandes de heterocromatina podem ser usados como marcadores para estas espécies.

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

O DNAr 5S mostrou estar distribuído em diferentes sítios cromossômicos sendo encontrado em 4 pares e 5 pares de cromossomos nas espécies estudadas. Essa característica reforça a ocorrência de rearranjos cromossômicos nessas espécies do tipo fusão cêntrica e inversões pericêntricas e paracêntricas.

O *double* FISH com as sondas de DNAr 18S e 5S mostrou que essas espécies não possuem co-localização e sintenia desses genes, contudo um padrão interessante observado é que todas as espécies apresentaram cromossomo portador do DNAr 18S com sítio de DNAr 5S no mesmo braço cromossômico. Esses resultados contribuem ainda mais com as hipóteses de rearranjos cromossômicos, juntamente com os dados obtidos com a sonda telomérica, que mostrou uma região de ITS na espécie *Ancistrus* sp. 2 “cupim” que pode estar envolvida em rearranjos cromossômicos do tipo fusão ou inversão.

A técnica de FISH é bastante fidedigna, contudo mostrou diferença nos resultados, possivelmente alguma sequência muito parecida com DNA repetitivo da heterocromatina está

resultando nessa diferença de hibridação. Desta forma é necessário a hibridação de outras sondas de DNAr, como por exemplo 28S, para tentar descobrir qual sequência de DNA está hibridando nos blocos de heterocromatina.

Neste trabalho foi possível caracterizar quatro espécies de *Ancistrus*, 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.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Sistemas de informações hidrológicas**. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx>. Acesso em: março/2016.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; DANIEL-SILVA, M. F. Z.; LOPES, C. E.; TOLEDO-FILHO, S. A. Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in *Gymnotiformes*. **Chrom Res**, v. 8, p. 335–340, 2000.

ALVES, A. L. **Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial**. 2000. 129 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2000.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariidae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, p. 57-63, 2003.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.

ALVES, J. C. P.; SERRANO, E. A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 23, p. 477-489, 2013.

ARTONI, R. F. **Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Loricariidae, Hypostominae)**. 1996. 162 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1996.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v. 49, p. 81-90, 1996.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, v. 106, p. 209- 214, 1999.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, p. 201-210, 2001.

ARTONI, R. F.; FALCÃO, J. N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosom Res**, v. 9, p. 449–456, 2001.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; de ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 19, p. 393-401, 2009.

ASHLEY, T.; WARD, D. C. A ‘hot spot’ of recombination coincides with an interstitial telomeric sequences in *Armenian hamster*. **Cytogenet Cell Genet**, v. 62, p. 169–171, 1993.

BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; MARGARIDO, V. P. Cytogenetic identification of invasive fish species following connections between hydrographic basins. **Hydrobiologia**, v. 649, p. 347–354, 2010.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerationns on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet**, v. 1, v.103–120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 153–159, 1986.

BERTOLLO, L. A. C.; FONTES, M. S.; FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. The X1X1Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chrom. Res.**, v. 5, p. 493–499, 1997.

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; BERTOLLO, L. A. C.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 23, p. 127-134, 2013.

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; ARTONI, R. F.; ALMEIDA, M. C.; TRALDI, J. B.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. **Genetica**, v. 142, p. 119-126, 2014.

BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: janeiro/2016.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Poluição e piscicultura**. São Paulo: CibiPU, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense**. Brasília: EMBRAPA- SPI, 1999. p.184.

BURGESS, W. E. **An Atlas of freshwater and Marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes**. Canada: T.F.H. Publications, 1989.

CASTRO, J. P.; MOURA, M. O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R.; de ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 25. p. 231–244, 2015.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, p. 253-260, 2001.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, p. 118–128, 2005.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evol Biol**, v.10, p. 271, 2010a.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; VICARI, M. R.; REBORDINOS, L.; BERTOLLO, L.A. C. Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development**, v. 4, p. 176–185, 2010b.

CIOFFI, M. B.; MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BERTOLLO, L. A. C. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 80, p. 2125–2139, 2012.

DA CRUZ, V. P.; SHIMABUKURO-DIAS, C. K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype description and evidence of multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1X2Y in *Potamotrygon* aff. *motoro* and *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, p. 201-208, 2011.

DA SILVA, E. L.; BORBA, R. S. de; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia** 56:303-311, 2003.

DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica**, v. 133, p. 85–91, 2007.

ESCHMEYER, W. N. **Catalog of fishes**. Electronic publication in “World Wide Web”. Disponível em <http://www.collections.calacademy.org/ich/>. Acesso em: abril, 2016.

FAVARATO, R. M.; da SILVA, M., de Oliveira, R. R.; ARTONI, R. F.; FELDBERG, E.; MATOSO, D. A. Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini). **Zebrafish**, v. 13, p. 103-111, 2016.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. **Genetica**, v. 110, p. 55-62, 2001.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, v. 119, p. 147–153, 2003.

FISCH-MULLER, S. Subfamily Ancistrinae. In: REIS, R. E. ; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J., JR. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 729.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 31, p. 137-144, 1981.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810-813, 1993.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; CENTOFANTE, L. B. Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). **Cytologia**, v. 68, p. 403–411, 2003.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 261-264, 2008.

GALETTI JR, P. M. Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital. J. Zool.**, v. 65, p. 53-56, 1998.

GALETTI, P. M. JR; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenet Cell Genet**, v. 43, p. 43–46, 1986.

GARAGNA, S.; BROCCOLI, D.; REDI, C. A.; SEARLE, J. B.; COOKE, H. J.; CAPANNA, E. Robertsonian metacentrics of the mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. **Chromosoma**, v.103, p. 685–692, 1995.

GO, Y.; RAKOTOARISOA, G.; RANDRIANJAFY, A.; KOYAMA, N.; HIRAI, H.: PRINS analysis of the telomeric sequences in seven lemurs. **Chromosome Res**, v. 8, p. 57–65, 2000.

GOLD, J. R. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer

regions in North American cyprinid fishes. **Copeia**, p. 133–139, 1984.

HAAF, T. SCHMID, M. An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). **Chromosoma**, v. 89, p. 37–41, 1984.

HASHIMOTO, D. T.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 861–866, 2010.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions within a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, 1014–1015, 1980.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, v. 94, p. 180–186, 2005.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R. Aspectos biogeográficos de componentes da ictiofauna da América Central. **ConScientiae Saúde**, v. 6, p. 147–153, 2007.

KNER, R. Die Hypostomiden Zweite Hauptgruppe der familie der panzerfische (Loricatavel Goniodontes). **Naturwissen**, v. 31, p. 65–98, 1854.

KOEHLER, M. R.; DEHM, D.; GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; HAAF, T.; MOLINA, W. F.; GALETTI JR., P. M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae): 1. karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. **Chrom. Res.**, v. 5, p. 12–22, 1997.

ISBRUCKER, I. J. H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Versl. Tech. Gegevens**, v. 22, p. 1–181, 1980.

ISBRUCKER, I. J. H.; NIJSSEN, H. Sexualdimorphismus bei Harnischwelsen (Loricariidae). **Harnischwelse**, p. 19–33, 1992.

LARA, M. C. S. **Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia do Rio Paraná**. 1998. 52f. Dissertação de mestrado (Biologia Celular), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. 3 ed. São Paulo: Edusp, 1999.

MARIOTTO, S.; ARTONI, R. F.; MIYAZAWA, C. S. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 57, p. 327–331, 2004.

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C. S. *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of

sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 299–304, 2006.

MARIOTTO, S. **Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo Ancistrini (Siluriformes: Loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras**. 2008. 106f. Tese doutorado (Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

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

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetic**, v. 5, p. 289-300, 2011.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O. Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 125-131, 2013.

MARTINS, C.; GALETTI, P. M., JR. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res**, v. 7, p. 363-367, 1999.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chrom. Res.**, v. 8, p. 353–355, 2000.

MARTINEZ, J. L.; MÓRAN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A. M. Chromosomal localization of the major and 5S rDNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenet. Cell Genet**, v. 73, p. 149–153, 1996.

MESTRINER, C. A.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analysis of a sex system. **Chrom. Res.**, v. 3, p. 440–443, 1995.

MEYNE, J., BAKER, R., HOBART, H., HSU, T.C., RYDER, O., WARD, O., WILEY, J., WURSTER-HILL, D., YATES, T.; MOYZIS, R. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99, p. 3–10, 1990.

MILHOMEM, S. R.; PIECZARKA, J. C.; CRAMPTON, W. G. R. DILVA, D. S.; SOUZA, A. C. P.; CARVALHO JR, J. R.; NAGAMACHI, C. Y. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). **BMC Genetics**, v. 9, p. 75, 2008.

MOLINA, W. F. **Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero Leporinus (Pisces, Anostomidae)**. 1995. 177f. Tese doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

MOLINA, W. F.; GALETTI JR., P. M. Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW). **Genetica**, v. 130, p. 153–160, 2007.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, P. M. JR. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, v. 46, p. 115–125, 1993.

MORITZ, C.; WORTHINGTON-WILMER, J.; PODE, L.; SHERWIN, W. B.; TAYLOR, A. C.; LIMPUS, C. J. Applications of genetics to the conservation and management of Australian fauna: four case studies from Queensland. In: SMITH, T. B., WAYNE, R. K. **Molecular Genetics Approaches to Conservation**. New York, Oxford University Press, 1996.

NANDA, I., FEICHTINGER, W.; SCHMID, M.; SCHRODER, J. H.; ZISCHLER, H.; EPPLER, J. T. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J. Mol. Evol.**, v. 30, p. 456–462, 1990.

NANDA, I. SCHMID, M. Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 65, p. 190–193, 1994.

NANDA, I.; SCHNEIDER-RASP, S.; WINKING, H.; SCHMID, M. Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. **Chromosome Res**, v.3, p. 399–409, 1995.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3 ed. New York: John Wiley and Sons, 1994.

OCALEWICZ, K.; WOZNICKI, P.; FURGALA-SELEZNIEW, G.; JANKUN, M. Chromosomal location of Ag/CMA3-NORs, 5S Rdn and telomeric repeats in two stickleback species. **Ital J Zool.**, v. 78, p. 12–19, 2011.

OCALEWICZ, K. Telomeres in Fishes. **Cytogenet Genome Res**, v. 141, p. 114–125, 2013.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, W. S.C. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiol Biochem**, v. 35, p. 81-100, 2009.

de OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. **Neotropical Ichthyology**, v. 4. p. 93-97, 2006

de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5. p. 301-306, 2007.

de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 134, p. 243-249, 2008.

- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2209-2225, 2009.
- PARISE-MALTEMPI, P. P.; DA SILVA, E. L.; RENS, W.; DEARDEN, F.; O'BRIEN, P. CM.; TRIFONOV, V.; FERGUNSON-SMITH, M. A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC Genetics**, v. 14, p. 60, 2013.
- PAZIAN, M. F.; SHIMABUKURO-DIAS, C. K.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **Genetica**, v. 141, p. 1–9, 2013.
- PENDÁS, A. M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal localization and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet. Cell Genet**, v. 67, p. 31-36, 1994.
- PHILLIPS, R. B.; IHSEN, P. E. Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenet Cell Genet**, v. 39, p. 14–18, 1985.
- PORTO, F. E.; VIEIRA, M. M. R.; BARBOSA, L. M.; BORIN-CARVALHO, L. A.; VICARI, M. R.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosomal Polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Gunther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population. **Zebrafish**, v. 11, p. 318-324, 2014.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J., JR. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 729, 2003.
- REIS, D. A. R.; BRANDÃO, K. O.; TOLEDO, L. F. A.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Localização física dos genes ribossomais 5S e 18S em *Ancistrus* sp. (Loricariidae: Ancistrini) de Angra dos Reis/RJ, Bacia dos Rios Costeiros. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 3, p. 39-44, 2012.
- RIBEIRO, M. O.; NOLETO, R. B.; LORSCHIEDER, C. A.; PORTO, F. E.; PRIZON, A. C.; ZAWADZKI, C. H.; OLIVEIRA, L. C.; PORTELA CASTRO, A. L. B. Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçu River basin, southern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 4051-4057, 2015.
- ROSA, R.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetica**, v. 128, p. 159-166, 2006.
- ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K.; de BARROS, A. V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 22, p. 739-749, 2012.

RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends Ecol. Evol.**, n.1, p.9-10, 1986.

SABAJ, M. H.; ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. Spawning in *Ancistrus* with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 10, p. 217-229, 1999.

SANTOS, N. M.; FERREIRA-NETO, M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BAKKALI, M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. A comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). **ZOOLOGIA**, v. 29, p. 159–166, 2012.

SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSONOMIA, R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus Linnaeus*, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. **Comp Cytogenet**, v. 5, p. 223–235, 2011.

SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, v. 107, p. 136–140, 1998.

SOLA, L.; NATILI, G. L.; CATAUDELLA, S. Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae), an Argentine species introduced in Italy. **Genetica**, v. 77, p. 217–224, 1998.

SOUZA, A. C. P. **Descrição cariotípica de peixes dos gêneros *Baryancistrus*, *Parancistrus*, *Peckoltia* e *Ancistrus* (Ancistrinae: Loricariidae) da Bacia Amazônica**. 2003. 130f. Dissertação mestrado (Zoologia), Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.

SOUZA, A. C. P.; NASCIMENTO, A. L.; CARVALHO, J. R.; BARROS, R. M. S.; FELDBERG, E.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C. Karyotypic analysis of *Baryancistrus aff. niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. **Caryologia**, v. 57, p. 219-223, 2004.

SULLIVAN, J.P., LUNDBERG, J. G, HARDAMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, p. 636–662, 2006.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Exptl. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TORRES, A. R.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Neotropical fish genetics. II. Molecular biology of Neotropical. **Ci. Biol. Saúde**, v. 10, p. 27-37, 2004.

UYENO, T.; MILLER, R. R. Second discovery of multiple sex chromosomes among fishes. **Experientia**, v. 28, p. 223–225, 1972.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. **Neotropical Ichthyology: An Overview**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998.

VENERE, P. C.; SOUZA, I. L.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C. Occurrence of ZZ/ZW sex chromosomes in *Thoracocharax stellatus* fish (Characiformes, Gasteropelecidae) from the Araguaia River, South America. **Genetica**, v. 133, p. 109–112, 2008.

VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 114, p. 163–168, 2006.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**, v. 134, p. 311–317, 2008.

VICARI, M. R.; PISTUNE, H. F. M.; CASTRO, J. P.; de ALMEIDA, M. C.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M.; ARTONI, R. F. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, p. 1073–1081, 2011.

VONO, V.; SILVA, L. G. M.; MAIA, B. P.; GODINHO, H. P. Biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de peixes neotrópicos: *Pimelodus maculatus* Lacépède (Siluriformes, Pimelodidae), *Leporinus amblyrhynchus* Garavell & Britski e *Schizodon nasutus* Kner (Characiformes, Anostomidae) do recém-formado Reservatório de Miranda, Alto Paraná. **Revta bras. Zool.**, v. 19, p. 819 - 826, 2002.

WHITE, M. J. D. **Animal Cytology and Evolution**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1973.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J.; INNIS, M. A. **PCR protocols: a guide to methods, applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

ZIEMNICZAK, K. **Estudo citogenético em espécies de Loricariidae (Pisces, Siluriformes) das nascentes dos rios Ribeira e Tibagi, Ponta Grossa-PR**. 2011. 95f. Dissertação de mestrado (Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; ROSA, K. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): Emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, p. 492-501, 2012.

ZUANON, J. A. S. **História Natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira**. 1999. 199f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.