



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA**

ALCIMARA DOS SANTOS GUIMARÃES

**ANÁLISES CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE *Pterygoplichthys
pardalis* (Castelneau, 1855) (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): UMA
ESPÉCIE NATIVA DA BACIA AMAZÔNICA E INVASORA EM OUTROS
PAISES**

SANTARÉM, PARÁ

ALCIMARA DOS SANTOS GUIMARÃES

ANÁLISES CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneau, 1855) (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): UMA ESPÉCIE NATIVA DA BACIA AMAZÔNICA E INVASORA EM OUTROS PAISES

Artigo de dissertação apresentado à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejo dos Ecossistemas Amazônicos. Linha de pesquisa: Genética e Conservação da Biodiversidade.

Orientador: Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

SANTARÉM, PARÁ

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

G963a Guimarães, Alcimara dos Santos

Análises cromossômicas e molecular de *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneau, 1855) (Siluriformes: Loricariidae): uma espécie nativa da Bacia Amazônica e invasora em outros países. / Alcimara dos Santos Guimarães. – Santarém, 2022.

30 p. : il.

Inclui bibliografias.

Orientador: Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

1. Acari. 2. Bioinvasão. 3. COI. I. Rodrigues, Luís Reginaldo Ribeiro, *orient.*
II. Título.

CDD: 23 ed. 639.3

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

ALCIMARA DOS SANTOS GUIMARÃES

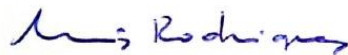
ANÁLISES CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneau, 1855) (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): UMA ESPÉCIE NATIVA DA BACIA AMAZÔNICA E INVASORA EM OUTROS PAISES

Artigo de dissertação apresentado à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

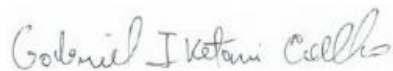
Área de concentração: Estudos e Manejo dos Ecossistemas Amazônicos. Linha de pesquisa: Genética e Conservação da Biodiversidade.

Conceito: 9,7

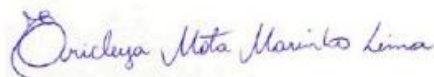
Data de Aprovação: 16/07/2021



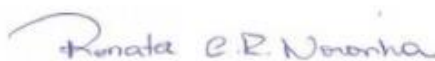
Presidente/Orientador: Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE PARÁ – UFOPA/PPGRNA



Examinador 1: Dr. Gabriel Iketani Coelho
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE PARÁ – UFOPA/PPGRNA



Examinador 2: Dra. Ericleya Mota Marinho Lima



Examinador 3: Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de misericórdia e força.

Ao meu orientador pela paciência, boa vontade e humanidade ao lidar com as minhas limitações.

Aos colegas de laboratório que me auxiliaram nas análises e rotinas laborais.

Aos professores e colegas de mestrado pela cooperação e disseminação de conhecimentos.

Aos meus filhos pela paciência em me esperar todas as vezes que não pude atendê-los por conta da vida acadêmica – amo vocês mais que tudo!

Ao PPGRNA que sempre foi sensível as demandas e estruturação dos alunos.

A UFOPA pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade no oeste paraense.

A capes pela bolsa que possibilitou dedicação à pesquisa e o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Pterygoplichthys pardalis é uma das 15 espécies que compõem o gênero *Pterygoplichthys* Família Loricariidae, Ordem Siluriformes. Esse grupo de peixes é nativo da América do Sul, porém existe registro de introdução em cinco continentes e populações exóticas de *P. pardalis* já se estabeleceram em 16 países. Apesar da importância comercial e socioambiental *P. pardalis* ainda é pouco estudada sob o enfoque genético. Neste trabalho, descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *P. pardalis* e comparamos indivíduos de populações nativas e exóticas através do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI). Foram analisados 10 indivíduos coletados no Lago Pacoval e Lago Arapixuna, margem direita do rio Amazonas. O cariótipo apresentou número diploide $2n=52$ e $NF=100$ sem variação morfológica entre machos e fêmeas. A localização das regiões organizadoras de nucléolo e do marcador ribossomal 18S foram coincidentes no par 14, enquanto o sítio 5S foi detectado em posição intersticial do par 13. A heterocromatina constitutiva é restrita e localizada na região telomérica de apenas quatro pares, dos quais três registraram sinais CMA3 positivo na mesma localização. Marcações teloméricas foram observadas apenas nas extremidades dos cromossomos. A espécie *P. pardalis* divergiu de outros congêneres por variação na fórmula cariotípica. A variação molecular do gene COI revelou cinco mutações que diferenciam quatro haplótipos. O haplótipo 1 é o mais frequente e compartilhados por indivíduos de populações nativas e exóticas. A população exótica das Filipinas é a mais diversa e pode representar o evento original de introdução de *P. pardalis* no sudeste asiático.

Palavras-chave: Acari. Bioinvasão. COI. Cariótipo. Peixe ornamental

ABSTRACT

Pterygoplichthys pardalis is one of the 15 species that make up the genus *Pterygoplichthys* Family Loricariidae, Order Siluriformes. This group of fish is native to South America, but there is a record of introduction in five continents and exotic populations of *P. pardalis* have settled in 16 countries. Despite its commercial and socioenvironmental importance, *P. pardalis* is still poorly studied from a genetic perspective. In this work, we describe for the first time the karyotype of *P. pardalis* and compare individuals from native and exotic populations through the mitochondrial gene Cytochrome oxidase I. Ten individuals collected in Lake Pacoval and Lake Arapixuna, on the right bank of the Amazon River, were analyzed. The karyotype showed diploid number $2n=52$ and $NF=100$ with no morphological variation between males and females. The location of the nucleolus organizer regions and the 18S ribosomal marker were coincident in pair 14, while the 5S site was detected in the interstitial position of pair 13. The constitutive heterochromatin is restricted and located in the telomeric region of only four pairs, of which three recorded positive CMA3 signals at the same location. Telomeric markings were observed only at the ends of chromosomes. The species *P. pardalis* diverged from other congeners due to variation in the karyotype formula. The molecular variation of the Cytochrome oxidase I gene revealed five mutations that differentiate four haplotypes. Haplotype 1 is the most frequent and shared by individuals from native and exotic populations. The exotic population of the Philippines is the most diverse and may represent the original introduction event of *P. pardalis* into Southeast Asia.

Key words: Acari. Bioinvasion. COI. Karyotype. Ornamental fish.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	7
Amostragem e área de estudo	7
Preparação cromossômica	8
Análise de cariótipo	8
Marcadores Cromossômicos	8
Métodos moleculares	10
RESULTADOS	11
Citogenética de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	11
Análise do marcador mitocondrial COI em <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	14
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXOS	27

ANÁLISES CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneau, 1855) (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): UMA ESPÉCIE NATIVA DA BACIA AMAZÔNICA E INVASORA E OUTROS PAISES

Alcimara dos Santos Guimarães¹ Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues²

1 Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia - PPGRNA, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Av. Mendonça Furtado, 1º Andar, Nº 2440, Bairro Aparecida CEP: 68040-050, Santarém, PA, Brasil. **2** Laboratório de Genética e Biodiversidade - LGBio, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Rua Vera Paz, s / n, Salé, 68035-110, Santarém, PA, Brasil.

Introdução

O gênero *Pterygoplichthys* (Gill, 1858) (Siluriformes, Loricariidae) constitui-se atualmente por 15 espécies válidas (Fricke et al. 2021) com ampla distribuição nas bacias hidrográficas da América do Sul, dentre as quais oito espécies foram registradas na Bacia Amazônica: *Pterygoplichthys disjunctivus* (Weber 1991), *P. gibbiceps* (Kner 1854), *P. joselimaianus* (Weber 1991) *P. lituratus* (Kner 1854), *P. pardalis* (Castelneau 1855), *P. punctatus* (Kner 1854), *P. weberi* (Armbruster & Page 2006), *P. xinguensis* (Weber 1991).

Pterygoplichthys pardalis ocorre naturalmente em ambientes de lagos marginais e planícies alagadas ao longo da calha principal do rio Amazonas e zonas de confluência (Reis et al. 2003). Entretanto, populações exóticas dessa espécie se estabeleceram em vários países ao redor do mundo, causando severo desequilíbrio ecológico no México e em alguns países do sudeste asiático (Chavez et al. 2006; Amador-del Ángel & Wakida-Kusonoki, 2014; Orfinger & Goodding 2018). Há indícios de que o escape de indivíduos *P. pardalis* em ambientes aquáticos fora de sua área de ocorrência natural tenha associação com o mercado internacional de peixes ornamentais para aquarismo e aquicultura de espécies exóticas (Page & Robins 2006).

O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão da revista Comparative Cytogenetics (exceto a disposição das figuras que encontram-se no corpo do texto para melhor compreensão). As normas indicadas para a redação de artigos pela revista estão disponíveis no link: <https://compcytogen.pensoft.net/about#Author-Guidelines>

No Brasil, *P. pardalis* é um importante recurso pesqueiro, sendo uma das 10 espécies mais comercializadas nos portos de desembarque ao longo do baixo Amazonas (Ruffino et al. 2003). Devido sua relevância econômica nos setores de pesca e aquarismo, *P. pardalis* foi avaliada como uma espécie candidata visando-se a domesticação e produção em sistema de aquicultura (Moroni et al. 2015). A demanda por dados genéticos associados a espécie foi definida como um dos fatores de alta prioridade na implementação de um programa de domesticação de *P. pardalis* (Moroni et al. 2015). Adicionalmente, tendo em vista a inerente perda de biodiversidade associada a degradação dos ecossistemas aquáticos e sobreexploração, a pesquisa genética é importante para o manejo eficiente e conservação de estoques pesqueiros na natureza (Hilsdorf et al. 2006).

A correta identificação taxonômica é um conhecimento básico requerido para sustentar o manejo genético de estoques naturais de espécies exploradas comercialmente (Ward 2000). Estudo citogenéticos e de marcadores moleculares de DNA são amplamente utilizados na caracterização genética de diferentes grupos de peixes visando a resolução de questões taxonômicas (Kavalco et al. 2005; Pansonato-Alves et al. 2013; Majtánová et al. 2019) e monitoramento da variabilidade genética de estoques pesqueiros (Ghigliotti et al. 2008; Vitorino et al. 2015).

No gênero *Pterygoplichthys* algumas espécies já foram caracterizadas citogeneticamente (Artoni et al. 1999; Alves et al. 2006; Oliveira et al. 2006; Fernandes et al. 2015) e demonstram o número diplóide como marcador conservativo do gênero além da descrição dos demais marcadores citotaxonômicos, desta forma o presente estudo visa contribuir com a descrição de dados inéditos que agregam tanto a citogenética clássica como a molecular a fim de gerar informações relevantes para o entendimento da evolução cromossômica no grupo.

Material e Métodos

Amostragem e área de estudo

Foram estudados o total de dez exemplares (tabela 1 anexos), sendo N=7 (4 machos e 3 fêmeas) oriundos do lago Pacoval (-2.30748, - 54.66434 ou 2°18'26.9"S 54°39'51.6"W), e N=3, (2 Machos e 1 Fêmea) do lago Arapixuna (-2.23588, -54.83357 ou 2°14'09.2"S 54°50'00.9"W) ambas localidades situadas na margem direita do rio Amazonas. Os peixes foram coletados por pescadores artesanais locais com auxílio

de rede de pesca. Após a coleta, foram transportados vivos para o Laboratório de Genética e Biodiversidade da UFOPA em Santarém–PA, onde foram aclimatados e estimulados com injeção de leveduras para a proliferação mitótica durante o período de 24h (Oliveira et al. 1988). Para as preparações citogenéticas os animais foram anestesiados e eutanasiados conforme os procedimentos recomendados pelo Concea (Concea, 2018). Os peixes foram medidos, pesados, fotografados e fixados em formol 10% para posterior depósito em coleção científica.

Preparação cromossômica

As preparações citogenéticas seguiram o protocolo adaptado de Bertollo et al. (1978) que consiste basicamente na administração de injeção de colchicina (0,0125%) 1 ml para cada 100g de peso animal na região intra-abdominal por 30 min (protocolo *in vivo*) após a eutanásia, o tecido renal é retirado e macerado em 6 ml de solução hipotônica de KCl (0,075 M, 5,6 g/L), centrifugado e incubado a 37 °C por 20 min e depois fixada com solução fresca de metanol-ácido acético (3: 1 v/v).

Análise de cariótipo

As lâminas com as preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio Zeiss Axioskop 40 em coloração convencional com Giemsa a 5% (tampão fosfato pH 6,8), para se estabelecer o número diploide (2n). As melhores metáfases foram fotografadas e editadas com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6. Os cromossomos foram pareados e classificados segundo Levan et al. (1964) para montagem do cariótipo. A determinação do número fundamental (NF) deu-se através da contagem dos braços cromossômicos, sendo considerados de dois braços os metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st), já os acrocêntricos (a), foram considerados como portadores de apenas um braço.

Marcadores Cromossômicos

Para os marcadores cromossômicos foi realizada a detecção das regiões organizadoras de nucléolo – NOR através de nitrato de prata segundo Howell & Black (1980). As regiões de heterocromatina (Banda C) foram detectadas segundo Sumner (1972) com adaptação na etapa de coloração segundo Lui et al. (2012).

Seguindo o protocolo de Schweizer (1976), detectou-se as regiões sítio-específicas por meio da coloração com fluorocromos DAPI, que marca sítios ricos em pares de bases A-T, e cromomicina A3 que detecta os sítios ricos em G-C.

Realizou-se ainda, a detecção dos sítios de DNA ribossomal 5S, 18S e regiões teloméricas através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) pelo protocolo de Pinkel et al. (1986). Os primers utilizados foram: 5S A 5'TACGCCCGATCTCGTCCGATC3'B 5'CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC3' Komia & Takemura, (1979). 18S IpF 5'CCGCTTTGGTGACTIONCTTGAT3' IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA3' Martins & Vicari (2012) e Telômeros F (5'TTAGGG3')5 R (5'CCCTAA3')5 Ljdo et al. (1991).

As reações de PCR foram compostas em volume de 25µL, contendo: 12.5 µL de PCR mastermix 2X (Fermentas), 0.5 µL de cada primer (5 mM); 1 µL de DNA genômico; 0.25 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL) (KAPA Biosystems) e 10.25 µL de água ultrapura estéril com os ciclos de amplificação as seguintes etapas: a) 5S: 1 minuto a 94°C (desnaturação inicial); [1 minuto a 95°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C] ciclagem por 35 ciclos; 5 minutos a 72 °C (extensão final); b) 18S: 1 minuto a 95°C (desnaturação inicial); [1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C] ciclagem por 35 ciclos; 5 minutos a 72°C (extensão final). As reações foram processadas no termociclador PxE 0.2 (ThermoScientific). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gel Red (Biotium-Uniscience) e nas reações positivas, foram marcados com biotina-14-dATP por nick translation usando-se o kit Bionick Labeling System (Invitrogen) e digoxigenina com o kit DigNick (Roche) seguindo-se as instruções do fabricante. Os sinais de hibridização foram detectados usando os anticorpos Avidina-FITC para sondas marcadas com biotina, e antidigoxigenina conjugada com Rodamina para sondas marcadas com digoxigenina. As metáfases foram contracoradas com DAPI. As melhores metáfases foram fotografadas digitalmente com auxílio do programa Nikon NIS-Elements usando-se um microscópio de epifluorescência Nikon EclipseCsl dotado de câmera CCD monocromática. A montagem dos cariótipos e ajustes de brilho e contraste foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

Métodos moleculares

O DNA genômico de seis indivíduos (PML-27, PML-30, APX-01, APX-02, APX-04, APX-05) foi extraído a partir de tecido muscular usando-se protocolo salting-out (Aljanabi & Martinez, 1993; Vitorino et al. 2015). Os produtos da extração foram visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium) para inspeção de qualidade.

O marcador mitocondrial gene citocromo oxidase subunidade I (COI) foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando-se primers FishF1 e FishR1 (Ward et al. 2005) em reações de 25 µL contendo 15 µL de H₂O ultrapura e estéril, 2,8 µL de dNTP mix (1,25 mM), 2,5 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH = 8,4) + 500 mM KCl), 0,5 µL de cada primer (5 pmol), 2,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 1 µL de DNA genômico. As reações foram processadas no termociclador Pxe 0.2 Thermal Cycler conforme o seguinte perfil: Passo 1) desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, Passo 2) desnaturação por 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, repete-se o passo 2 por 35 ciclos; Passo 3) extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de reações foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com GelRed™ (Biotium).

As reações de PCR positivas foram purificadas com protocolo de polietilenoglicol 20% (Dunn & Blattner 1987) e sequenciadas no analisador ABI3500 usando o kit *ABI PRISM Big Dye Terminator V.3 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)* conforme instruções do fabricante.

As sequencias foram editadas visualmente e alinhadas com auxílio do programa BioEdit (Hall, 1999). O banco de dados foi complementado com 62 sequencias do gene *COI* de *P. pardalis* obtidas no repositório genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O conjunto de sequencias representa indivíduos de populações naturais do Brasil e Colômbia, e populações exóticas de seis países asiáticos. A variação molecular foi analisada com auxílio do programa DNAsp v.5 (Librado & Rozas, 2009) e a relação evolutiva entre indivíduos de populações nativas e exóticas foi visualizada por meio de uma rede de haplótipos usando o método *median joining* implementado no programa Network 10.2.0.0 (Fluxus Technology Ltd). A distância genética entre os indivíduos foi avaliada pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*) implementado no programa Mega X (Kumar et al. 2018).

Resultados

Citogenética de Pterygoplichthys pardalis

O cariótipo de *P. pardalis* da região do baixo Amazonas apresentou número diploide $2n=52$ cromossomos sendo a fórmula cariotípica $20m+20sm+8st+4a$ e número fundamental $NF=100$ (Figura 1A). Não observamos variação da morfologia cariotípica entre machos e fêmeas. As regiões de heterocromatina constitutiva reveladas por bandas C foram observadas somente nos pares 4, 14, 25 e 26, sendo que no primeiro a marcação foi bitelomérica e no último a banda foi subterminal no braço longo (Figura 1B).

A NOR foi detectada na região subterminal do braço longo do par submetacêntrico 14 (Figura 2A). Nessa mesma localização observamos a marcação fluorescente da sonda rDNA 18S (Figura 2A, caixa). O gene ribossomal 5S foi detectado na região proximal do submetacêntrico par 13 (Figura 2B). Sítios ricos em pares GC foram evidenciados por CMA3 na porção distal do par 14, coincidente com a posição da NOR, e nos pares acrocêntricos 25 e 26 sendo que no primeiro a marcação é fraca e pouco evidente (Figura 3A). Sequências repetidas (TTAGGG) foram detectadas somente nas regiões teloméricas de todos os cromossomos, sem indícios da presença de repetições teloméricas intersticiais (Figura 3B).

Figura 1 - Cariótipo de *Pterygoplichthys pardalis* em coloração convencional (A) e bandeamento C (B). Cromossomos com bandas C positivas são mostrados em destaque nas caixas.

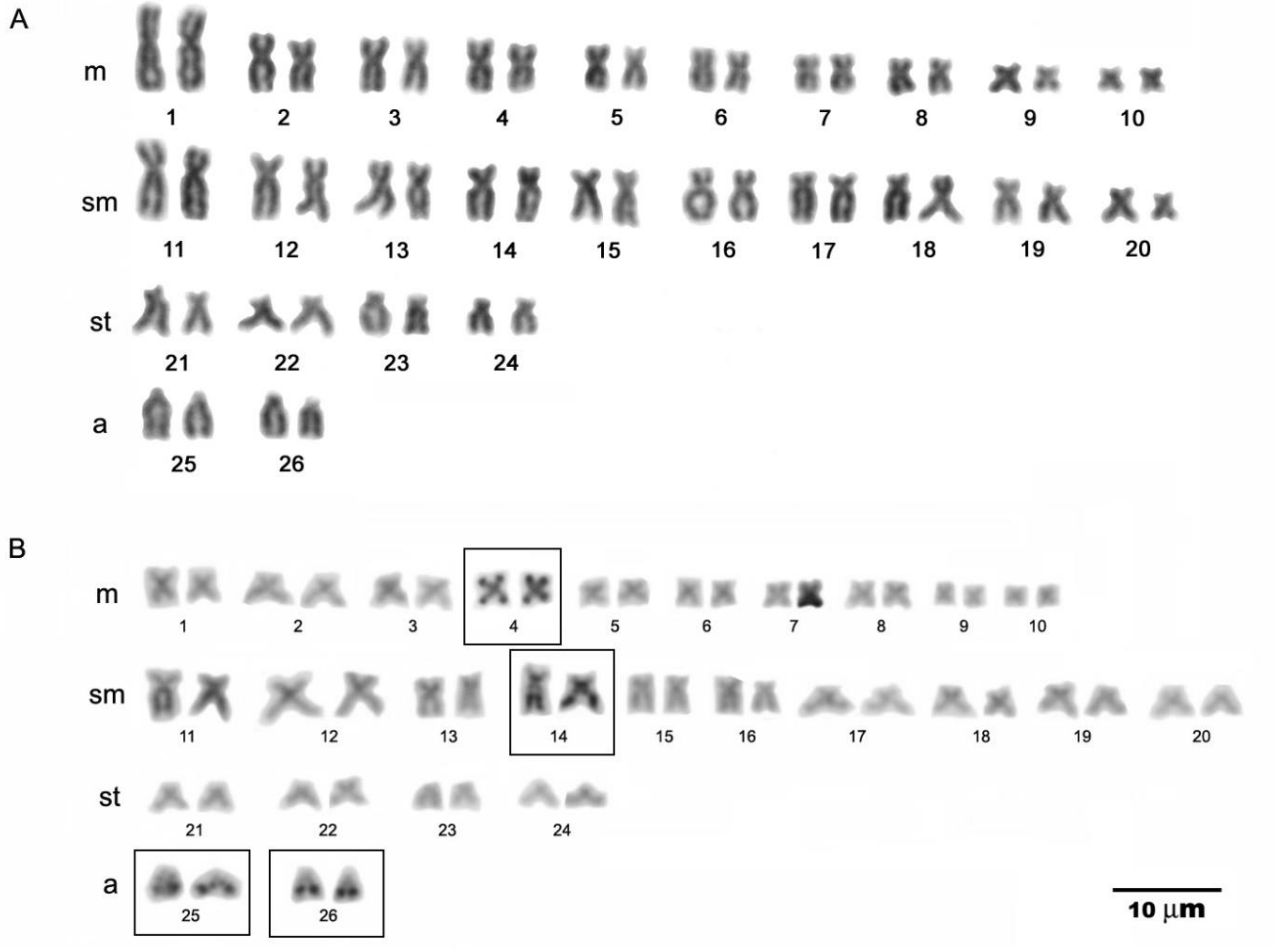


Figura 2 – Cariótipo de *Pterygoplichthys pardalis* evidenciando a localização da Região Organizadora de Nucléolo por impregnação de Nitrato de Prata e sítios ribossomais 18S por FISH no par 14 (A). O gene ribossomal 5S foi mapeado no par 13 (B).

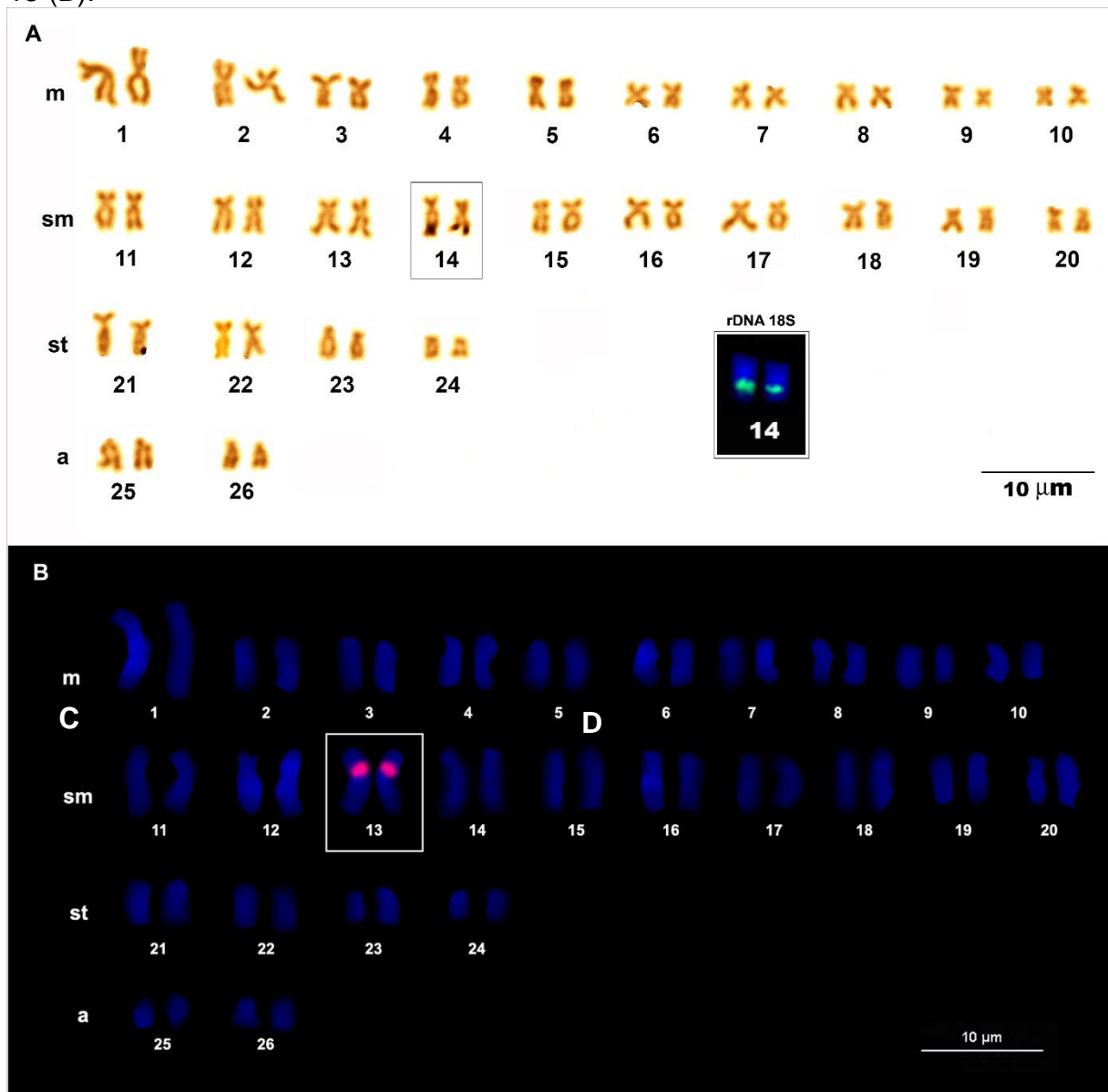
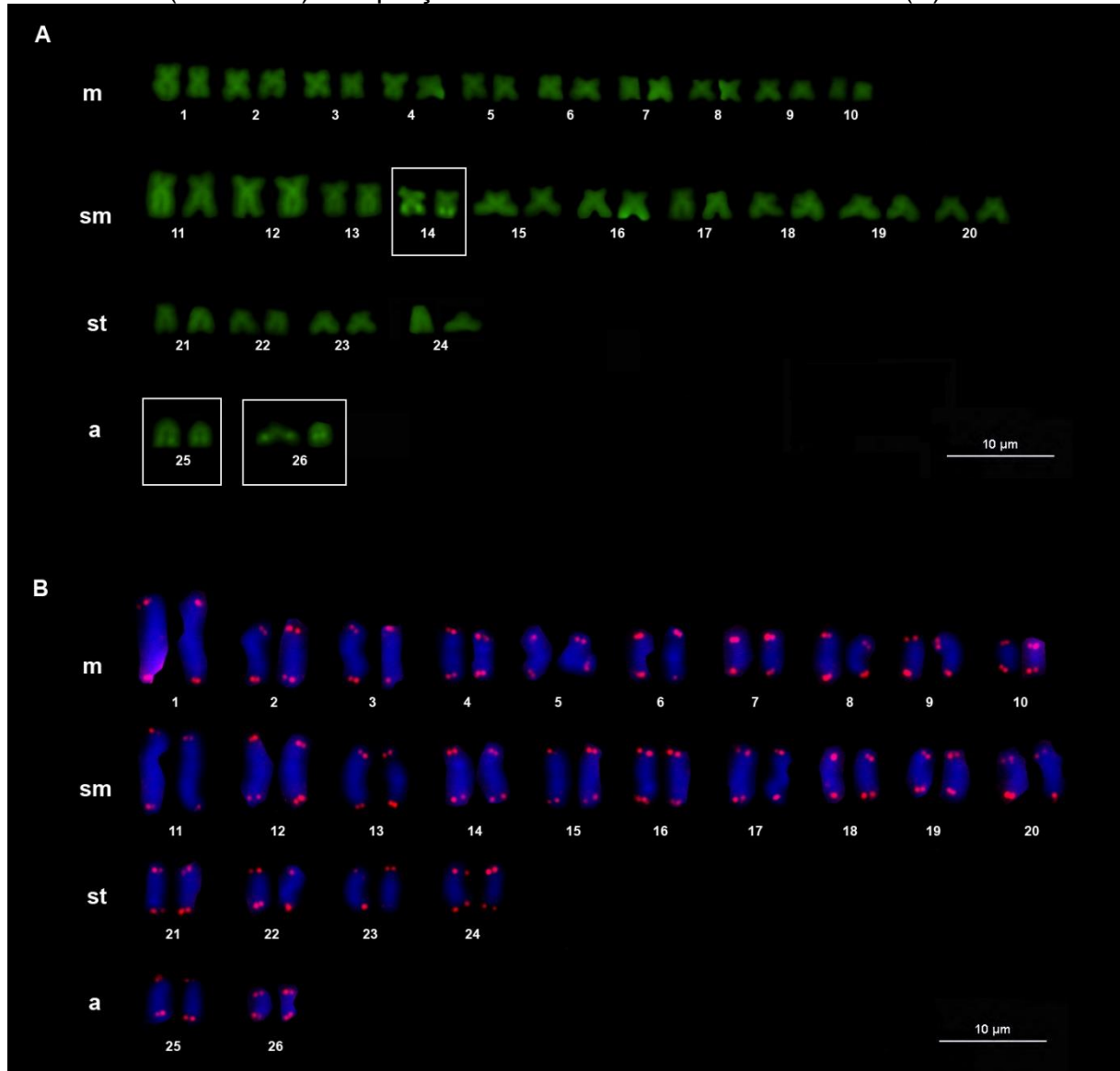


Figura 3 - Cariótipos de *Pterygoplichthys pardalis* evidenciando a localização de sítios ricos em nucleotídeos GC nos pares 14, 25 e 26 (A). Localização dos sítios teloméricos (TTAGGG)_n na porção distal de todos os cromossomos (B).



Análise do marcador mitocondrial COI em Pterygoplichthys pardalis

Foram analisadas 68 sequências parciais (560pb) do gene COI na região conhecida como DNA barcoding. O conteúdo G+C foi 0,418 e foram observados cinco sítios variáveis que resultaram em quatro haplótipos e diversidade haplotípica $Hd=0,141$. O haplótipo um foi observado em 63 indivíduos, enquanto que os demais haplótipos foram raros (Haplótipo 3, $n=3$) ou únicos (Haplótipos 2 e 4) Figura 4. A população exótica das Filipinas mostrou maior diversidade genética com três haplótipos distintos,

seguida pela população exótica da Tailândia com dois haplótipos. O haplótipo três (H3) é o mais diferenciado e diverge de H4 por três passos mutacionais, de H1 por quatro passos e de H2 por cinco passos. A estimativa de distância genética mostrou uma elevada similaridade entre os indivíduos, o que resultou na formação de um grupo maior que inclui indivíduos de populações naturais da América do Sul e populações exóticas de países asiáticos. Outros dois pequenos grupos foram formados, sendo que um deles juntou 3 indivíduos das Filipinas, enquanto que o outro reuniu um indivíduo das Filipinas e outro da Colômbia (Figura 5). A distância par-a-par entre os indivíduos variou de 0 a 0.007.

Figura 4 - Rede de haplótipos do gene mitocondrial Citocromo oxidase I em populações nativas e exóticas de *Pterygoplichthys pardalis*.

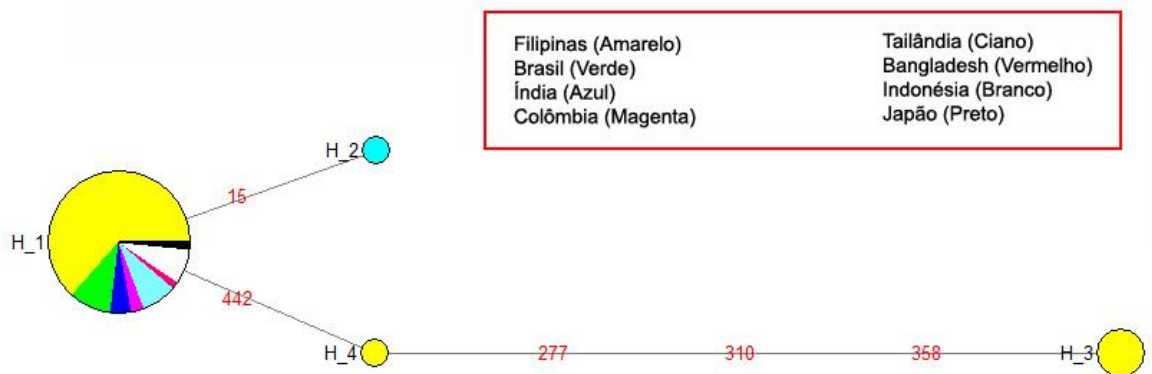
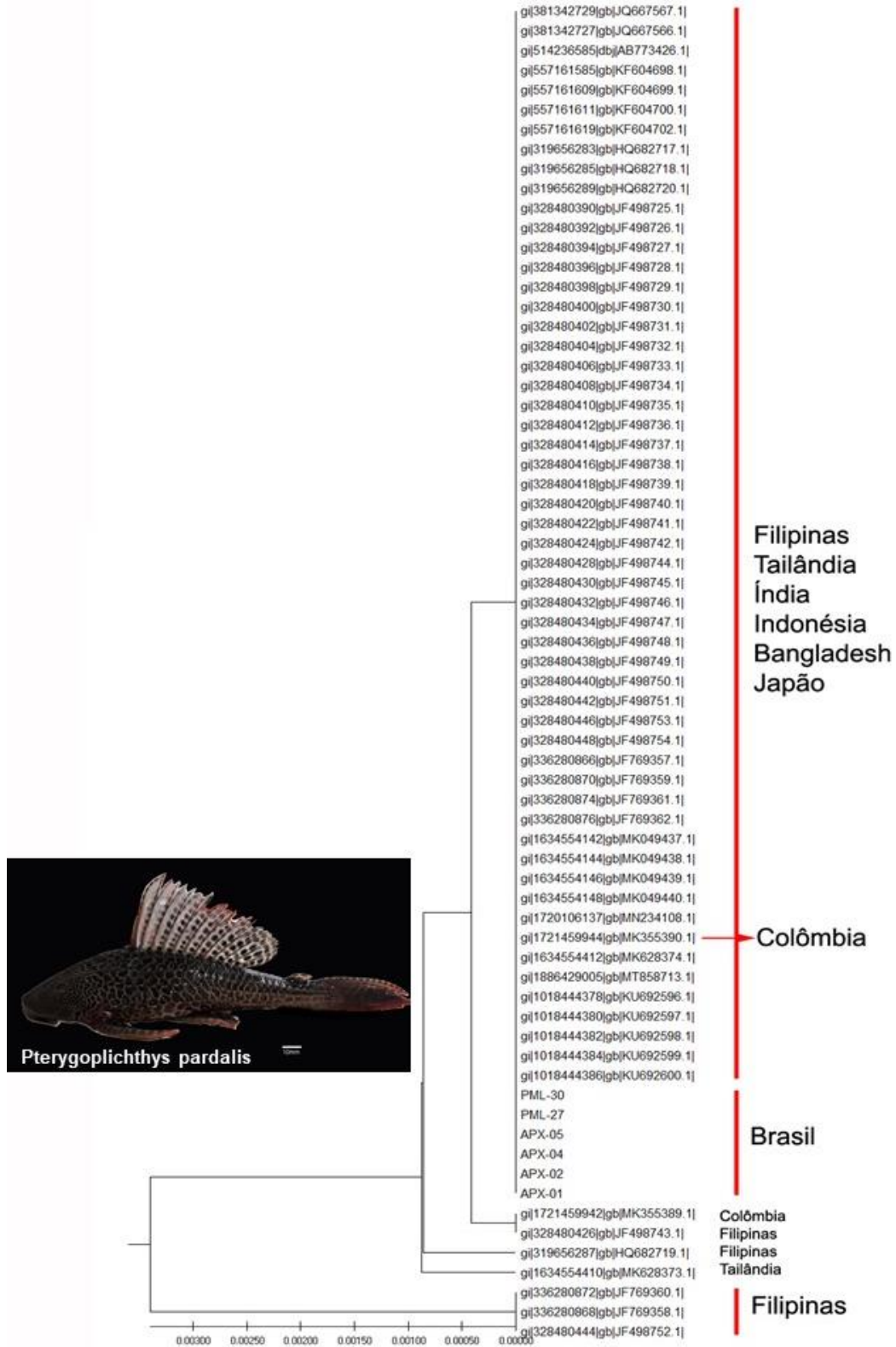


Figura 5 - Dendrograma de distância genética (UPGMA) baseada no gene mitocondrial Citocromo oxidase I de populações nativas e exóticas de *Pterygoplichthys pardalis*.



Discussão

O número diploide $2n=52$ observado em *P. pardalis* já foi registrado em outras espécies do gênero *Pterygoplichthys* e é considerado uma característica conservativa do grupo (Artoni et al. 1999; Oliveira et al. 2006; Alves et al. 2006; Fernandes et al. 2015). Por outro lado, a morfologia dos cromossomos varia entre espécies, o que torna a fórmula cariotípica (FC) diferente (tabela 2 anexo). O cariótipo de *P. pardalis* divergiu de *P. multiradiatus* (Alves et al. 2006), de *P. anisitsi* (Artoni et al. 1999; Alves et al. 2006; Fernandes et al. 2015) e de *P. joselimaianus* (Oliveira et al. 2006) por variações na FC. Essas mudanças na morfologia dos cromossomos são sugestivas de que mecanismos tipo inversão pericêntrica e/ou adição heterocromática esteja atuando na evolução cromossômica do grupo levando a manutenção do número diplóide de cromossomo e variação da morfologia quanto a posição do centrômero (Fernandes et al. 2015).

Os sítios de heterocromatina constitutiva de *P. pardalis* são restritos em alguns pares cromossômicos e ocorrem na posição distal. Uma pequena variação deste padrão heterocromático já foi observada em *P. anisitsi* que além de bandas C distais mostrou dois pares com bandas biteloméricas e um com banda C intersticial (Fernandes et al. 2015). Artoni et al. (1999) observaram três pares cromossômicos portadores de heterocromatina constitutiva em *P. anisitsi* do Rio Preto, cujo padrão parcialmente semelhante ao de *P. pardalis* com bandas C nos pares 14 e 25.

Ainda não se entende perfeitamente os mecanismos que determinam o padrão de distribuição da heterocromatina no genoma dos peixes, em muitos táxons existe uma forte relação com a diferenciação sexual (Oliveira et al. 2019) o que não foi evidenciado nessa espécie; já em outros, é importante fator evolutivo no polimorfismo interpopulacional (Traldi et al. 2012) o que pode contribuir para futuros processos de especiação.

A localização da NOR em um único par cromossômico é uma característica compartilhada entre *P. pardalis* e outras espécies congêneres previamente investigadas. Entretanto, o par marcador e a posição da NOR variou entre diferentes espécies. Enquanto *P. pardalis* compartilha com *P. anisitsi* a NOR na região distal do braço longo de um submetacêntrico (Artoni et al. 1999; Alves et al. 2006; Fernandes

et al. 2015), diverge de *P. gibbiceps* com a NOR na posição distal do braço curto de um submetacêntrico (Alves et al. 2006) e de *P. multiradiatus* (Alves et al. 2006) e *P. joselimaianus* (Oliveira et al. 2006) que carregam a NOR na região distal de um par metacêntrico. Inversões pericêntricas e paracêntricas são prováveis mecanismos que atuam na variação da localização desse marcador entre as espécies relacionadas, uma vez que produzem rearranjos no cariótipo sem alteração no número diplóide (Oliveira et al. 2006). A ocorrência de NOR simples é uma condição plesiomórfica presente em vários grupos de peixes desde os actinoptérios primitivos (Gornung, 2013) e é também atribuída a família Loricariinae como característica basal, estando normalmente em posição distal e em cromossomos metacêntricos (Artoni & Bertollo 1996). A coincidência dos sinais de CMA3+ com os sítios de NOR está relacionado com a presença extensiva de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou ainda entre sequências de DNA repetitivos próximas das regiões organizadoras de nucléolo (Salvadori et al. 1995).

A localização do gene ribossomal 5S e o mapeamento de sequências teloméricas em *P. pardalis*, presente estudo, são os primeiros registros desses marcadores citogenéticos no gênero *Pterygoplichthys*. O rastreamento desses marcadores é essencial para uma melhor compreensão das relações evolutivas e alterações cromossômicas ocorridas na espécie, sondas teloméricas são capazes detectar rearranjo cromossômico do tipo ITS que são regiões intersticiais teloméricas internas, o que não foi evidenciado nesse táxon, uma vez que inversões e acúmulo de heterocromatina são os processos comumente descritos nos grupos que conservam características ancestrais para diversificação cariotípica da família Loricariidae (Mariotto et al. 2011). A marcação do gene 18S em um único par de cromossomo encontrado nesse trabalho se assemelham aos descritos por Alves et al. (2012) para *P. multiradiatus*, com a presença de dois sinais no par 10, região coincidente a NOR, sustentando a hipótese dessa característica ser condição basal nos loricarídeos.

A análise do marcador mitocondrial COI revelou uma baixa variação genética nesta amostra de *P. pardalis*. Populações de espécies introduzidas mostram comumente uma severa perda de diversidade genética associada ao processo de colonização decorrente de efeito fundador e deriva genética (Yonekura et al. 2007). Entretanto, o processo adaptativo ao novo ambiente pode resultar em aumento populacional e dispersão para novas áreas do ambiente colonizado (Sakai et al. 2000).

Populações invasoras de *P. pardalis* se estabeleceram no México (Amador del-Algel & Wakida-Kusunoki, 2014) e diversos países do sudeste asiático (Orfinger & Goodding 2018). No presente estudo observamos três haplótipos mitocondriais na população exótica das Filipinas, sendo que um deles (H1) é compartilhado com populações nativas da América do Sul, o que pode ser interpretado como um indício de que esse país pode ter recebido o evento original de colonização no sudeste asiático. O episódio de introdução de *P. pardalis* nas Filipinas é desconhecido, porém suspeita-se que os indivíduos fundadores foram importados dos Estados Unidos por meio do comércio internacional de peixes ornamentais para aquarioria (Chaves et al. 2006). Nas Filipinas também foi registrada a espécie congênere *P. disjunctivus* (Chaves et al. 2006).

A descrição cariotípica de *P. pardalis* e análise molecular do gene mitocondrial COI contribuem para a construção de uma base de dados genéticos necessária para subsidiar possíveis programas de domesticação e aquicultura, assim como para a conservação dos estoques naturais e mitigação de impactos das populações exóticas invasoras.

Conclusão

Pterygoplichthys pardalis da região do baixo Amazonas conserva o número diploide $2n=52$ mas diverge de outras espécies congêneres pela variação na fórmula cariotípica. Rearranjos do tipo inversão pericêntrica podem explicar as mudanças de morfologia cromossômica observadas no grupo. Com base na variação do gene mitocondrial COI populações nativas e exóticas de *P. pardalis* são altamente homogêneas e a população estabelecida nas Filipinas pode representar o local do evento original de introdução no sudeste asiático.

Referências

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25 (22): 4692-4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Alves AL, Borba RS, Pozzobon APB, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F (2012) Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with discussion on the Ag-NOR evolution. *Comparative Cytogenetics* 6 (3): 315–321. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v6i3.2667>
- Alves AL, Oliveira C, Nirchio M (2006) Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 128 (1-3):1-9. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-0715-1>
- Amador-del Ángel LE, Wakida-Kusunoki AT, Mendoza R, Koleff P (2014). Peixes invasores no sudeste do México. *Espécies aquáticas invasoras no México*, 25: 425-433. <https://www.researchgate.net/publication/259868683>
- Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC, Galetti Jr PM (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 22: 39-44. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000100009>
- Artoni RF, Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 81–90. <https://doi.org/10.1080/00087114.1996.10797353>

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genética 2:103–120.

Chavez JM, De La Paz RM, Manohar SK, Pagulayan RC, Carandang JR (2006) New Philippine record of South American sailfin catfishes (Pisces: Loricariidae). Zootaxa 1109: 57–68.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.1109.1.6>

Concea (2018) Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasil, Distrito Federal 54.
https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/4030569/do1-2018-02-22-resolucao-normativa-n-37-de-15-de-fevereiro-de-2018-4030565

Dunn IS, Blattner FR (1987) Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and ploystuffers. Nucleic Acids Research 15 (6): 2677–2698.
<https://doi.org/10.1093/nar/15.6.2677>

Fernandes CA, Alves DS, Guterres AR, Martins-Santos IC (2015) Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Parana River drainage) in Brazil. Comparative Cytogenetics 9 (1): 67–78.
<https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i1.8804>

Fricke R, Eschmeyer WN, Van der Laan R (2021) Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References.
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

[Versão eletrônica acessada 18 de junho de 2021].

Ghigliotti L, Mazzei F, Ozouf-Costaz C, Christiansen JS, Fevolden, SE, Pisano E (2008) First cytogenetic characterization of the sub-arctic marine fish

Mallotus villosus (Müller, 1776), Osmeriformes, Osmeridae. Genetics and Molecular Biology 31(1): 180-187.

Gornung E (2013) Twenty years of physical mapping of major ribosomal genes across the teleosts: a review of research. Cytogenet Genome 141: 90–102. <https://doi.org/10.1159/000354832>

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41: 95-98.

Hilsdorf AWS, Resende EK, Marques DKS (2006) Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. EMBRAPA, Documentos 82: 44. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783991/1/DOC82.pdf>

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver – staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1 – step method. Experientia 36: 1014 – 1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Heredity 94: 180–186. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800595>

Komiya H, Takemura S (1979). Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. J. Biochem 100: 369–374. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132601>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2): 201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lima EMM, Santos PRB, Braga TMP, McGrath DG (2019) A pesca de acari (*Pterygoplichthys pardalis*) na várzea do Baixo Amazonas, Pará, Brasil: Aspectos estruturais e socioeconômicos. *Gaia Scientia* 13 (4): 70-85. <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2019v13n4.48781>
- Ljdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19:17. <https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780>
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic and Histochemistry* 87: 433–438. <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.696700>
- Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RFA, Filho OM (2011) Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comparative Cytogenetics* 5 (4): 289–300. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v5i4.1757>
- Martins C, Vicari MR (2012). Hibridação in situ em cromossomos de peixes. In: Marcelo Guerra. (Org.). *Citogenética Molecular: Protocolos Comentados*. 1ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética 1: 59-88.
- Moroni FT, Ortega AC, Moroni RB, Mayag B, Jesus RS, Lessi E (2015) Limitations in decision context for selection of amazonian armoured catfish

acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) as candidate species for aquaculture. Int. J Fish and Aquacult, 7(8): 142-150. <https://doi.org/10.5897/IJFA15.0480>

Oliveira LC, Ribeiro MO, Costa GM, Zawadzki CH, Prizon-Nakajima AC, Borin-Carvalho LA, MartinsSantos IC, Portela-Castro ALB (2019) Cytogenetic characterization of *Hypostomus soniae* Hollanda-Carvalho & Weber, 2004 from the Teles Pires River, southern Amazon basin: evidence of an early stage of an XX/XY sex chromosome system. Comparative Cytogenetics 13(4): 411–422. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i4.36205>

Oliveira RR De, Souza IL, Venere PC (2006) Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. Neotropical Ichthyology 4: 93–97. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000100010>

Oliveira C, Almeida-Toledo, LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988). Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Caryologia 41: 227-236. <https://doi.org/10.1080/00087114.1988.10797863>

Orfinger Ab, Goodding Dd (2018) The global invasion of the suckermouth armored catfish genus *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae): annotated list of species, distributional summary, and assessment of impacts. Zool Stud 57:7. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-07>

Page LM, Robins RH (2006). Identification of sailfin catfishes (Teleostei: Loricariidae) in southeastern Asia. The Raffles Bulletin of Zoology 54: 455–457.

https://www.researchgate.net/publication/279600769_Identification_of_sailfin_catfishes_Teleostei_Loricariidae_in_Southeastern_Asia

Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F (2013) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal

variability. Review in Fish Biology and Fisheries 23: 477–489.
<https://doi.org/10.1007/s11160-013-9303-0>

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences 83: 2934–2938.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>

Reis RE, Kullander SO, Ferraris, CJJr (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Brasil. 742pp.
<https://books.google.com.br/books?id=9tiDHzxf9QC&printsec=copyright&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>

Ruffino, M. L. et al. Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará 2003. Manaus-IBAMA, ProVárzea, 2006.

Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, WithKA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG (2001) The population biology of invasive species. Annu RevEcol Syst 32: 305–332.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037>

Salvadori, S.; Deina, A. M.; Coloccia, E.; Rossi, E.; Zufardi (1995). Colocalization of (TTAGGG) telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic cels. Chromosome Research, Oxford 3: 54-58.
<https://doi.org/10.1007/BF00711162>

Schweizer, D (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. Chromosoma 58: 307-324.
<https://doi.org/10.1007/bf00292840>

- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, Artoni RF, Moreira-Filho O (2012) First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comparative Cytogenetics* 6 (2): 115–125. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v6i2.2595>
- Vitorino CA, Oliveira RCC, Margarido VP, Venere PC (2015) Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. *Neotropical Ichthyology* 13 (03): 557-568. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150037>
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of The Royal Society B* 359: 1847-1857. <https://doi.org/10.1098/srtb.2005.1716>
- Ward, R.D (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191–201. <https://doi.org/10.1023/A:1003928327503>
- Yonekura R, Kawamura K, Uchii K (2007) A peculiar relationship between genetic diversity and adaptability in invasive exotic species: bluegill sunfish as a model species. *Ecol Res* 22: 911–919. <https://doi.org/10.1007/s11284-007-0357-0>
- Zuzana Majtánová M, Moy KG, Unmack PJ, Ráb P, Ezaz T (2019) Characterization of the karyotype and accumulation of repetitive sequences in Australian Darling hardyhead *Craterocephalus amniculus* (Atheriniformes, Teleostei). *Peerj* 7: 7347. <http://doi.org/10.7717/peerj.7347>

Anexos

Tabela 1 – Metadados dos peixes utilizados nesse artigo. Identificação, local de coleta, peso, comprimento padrão e sexo.

Nº de campo	Local	Peso (g)	CP (mm)	Sexo
PML 16	Lago Pacoval, Rio Amazonas	240	245	Fêmea
PML 17	Lago Pacoval, Rio Amazonas	375	290	Macho
PML 26	Lago Pacoval, Rio Amazonas	470	270	Fêmea
PML 27	Lago Pacoval, Rio Amazonas	335	270	Macho
PML 28	Lago Pacoval, Rio Amazonas	317	260	Macho
PML 29	Lago Pacoval, Rio Amazonas	428	270	Fêmea
PML 30	Lago Pacoval, Rio Amazonas	287	260	Macho
APX 03	Arapixuna, Rio Amazonas	270	222	Fêmea
APX 04	Arapixuna, Rio Amazonas	301	250	Macho
APX 05	Arapixuna, Rio Amazonas	311	250	Macho

Tabela 2 – Dados citogenéticos em espécies do gênero *Pterygoplichthys*. Fórmula Cariotípica (FC) Bandeamento C (BC), Regiões organizadoras de nucléolo (NORs), Cromomicina (CMA3) e genes ribossomais 18S e 5S (FISH), metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st), acrocêntrico (a).

Espécie (Localidade)	FC	BC	NORs	CMA3	18S	5S	Referência
<i>P. anisitsi</i> (rio Tietê)	28m 12sm 8st 4a	-	16	-	-	-	Alves et al. 2006
<i>P. anisitsi</i> (rio Miranda)	8m 14sm 14st 16a	-	5	-	-	-	Alves et al. 2006
<i>P. anisitsi</i> (rio Iguatemi)	14m 26sm 8st 4a	9,10,15,17,25, 26	9	9,10	-	-	Fernandes et al. 2015
<i>P. anisitsi</i> (rio Preto)	16m 24sm 8st 4a	12,14,25	14	-	-	-	Artoni et al. 1999
<i>P. multiradiatus</i> (rio Orinoco)	22m 18sm 12st 0a	-	10	-	10	-	Alves et al. 2006/2012
<i>P. joselimaianus</i> (rio Araguaia)	28m 16sm 8st 0a	-	9	-	-	-	Oliveira et al. 2006
<i>P. pardalis</i> (rio Amazonas)	20m 20sm 8st 4a	4,14,25,26	14	14,25,26	14	13	Presente estudo