

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)**

**JULIANE VIDA LEMOS DE OLIVEIRA**

**DESCRIÇÃO DE UMA NOVA VARIANTE CARIOTÍPICA E CARACTERIZAÇÃO  
DO MITOGENOMA E SATELITOMA DE *Rineloricaria lanceolata*  
(SILURIFORMES, LORICARIDAE)**

**PONTA GROSSA  
2022**

**JULIANE VIDA LEMOS DE OLIVEIRA**

**DESCRIÇÃO DE UMA NOVA VARIANTE CARIOTÍPICA E CARACTERIZAÇÃO  
DO MITOGENOMA E SATELITOMA DE *Rineloricaria lanceolata*  
(SILURIFORMES, LORICARIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

**PONTA GROSSA  
2022**

O48

Oliveira, Juliane Vida Lemos de

Descrição de uma nova variante cariotípica e caracterização do mitogenoma e satelitoma de *Rineloricaria lanceolata* (Siluriformes, Loricaridae) / Juliane Vida Lemos de Oliveira. Ponta Grossa, 2022.

67 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

1. Rineloricaria lanceolata. 2. Mitogenoma. 3. DNA satélite. 4. Polimorfismo. 5. Satelitoma. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.T.

CDD: 576



*Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva  
Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta  
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e  
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste  
(Departamento de Ciências Biológicas)*



PPG - Biologia Evolutiva

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N°. 05/2022/UEPG**

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata Juliane Vida Lemos de Oliveira.

Aos vinte e seis dias de agosto de dois mil e vinte e dois, sob a presidência do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da aluna **Juliane Vida Lemos de Oliveira**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos(as): Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello (PPG-BioEvol/UEPG), Profa. Dra. Daniela Aparecida Matoso (UFA) e Prof. Dr. Jonathan Pena Castro (SEED) - Suplente. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "DESCRIBÇÃO DE UMA NOVA VARIANTE CARIOTÍPICA E CARACTERIZAÇÃO DO MITOGENOMA E SATELITOMA DE *Rineloricaria lanceolata* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 26 de agosto de dois mil e vinte e dois.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Profª. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG)

Profª. Dra. Daniele Aparecida Matoso (UFAM)

Dedico esse trabalho ao meu pai (*in memoriam*), que foi um dos meus maiores incentivadores, e mesmo depois de sua partida continua sendo a minha força. Com todo meu amor e gratidão!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me sustentou nesses anos árduos de pesquisa. À minha família que foi sem dúvidas a minha base e refúgio, minha mãe Mara seu exemplo de mulher forte me inspirou todos os dias. Meu pai Junio, seu zelo e amor pela família foram fundamentais para que eu sempre me sentisse amada e a minha irmã Julia por todo amor e amizade.

Ao meu marido Érike, pela paciência, compreensão, amor e companheirismo que teve comigo durante esses dois anos de mestrado.

À minha querida e eterna orientadora Margarida Maria, serei eternamente grata. Primeiramente porque foi a primeira pessoa na graduação que acreditou no meu potencial, e teve uma participação ímpar na minha formação.

Ao meu orientador de mestrado Roberto Artoni, pela confiança que depositou em mim e por toda a paciência durante a pesquisa, mesmo quando tudo parecia não dar certo, ele sempre tinha uma solução.

À professora Daniele Matoso, pelas colaborações e contribuições, como também pela amizade.

Ao professor Geovane que sempre esteve disposto para ajudar nas coletas.

A todos os professores do PPG-BioEvol que foram fundamentais na minha formação, sempre buscando o melhor mesmo nesse momento delicado de pandemia.

À minha querida amiga Hallana, que em tão pouco tempo se tornou uma das pessoas mais importantes para mim, fazendo os dias em Ponta Grossa mais suportáveis.

Ao pessoal do laboratório de citogenética, Luz, Jhon, Raylen, Fernanda, Franciele, Beatriz, Augusto e Vanessa que foram por vezes amigos, compartilharam seus conhecimentos e sempre dispostos a ajudar.

Às colegas de pós-graduação Glauciele e Flávia, as quais construí uma grande amizade, embora nunca tenhamos nos vistos pessoalmente, estiveram sempre mandando energias positivas.

Faça um plano, tenha objetivos. Trabalhe para alcançá-los, mas de vez em quando, olhe ao seu redor e aproveite, porque é isso. Tudo pode acabar amanhã.

-Meredith Grey

## RESUMO

Dentre os peixes neotropicais, o gênero *Rineloricaria* é caracterizado por possuir uma grande diversidade cariotípica. São peixes popularmente conhecidos como bagres blindados. Os dados citogenéticos para o gênero mostram um polimorfismo evidente nessas espécies, com diferentes números diploides e fórmulas cariotípicas, que podem ter a sua origem a partir de rearranjos cromossômicos, como fissões, fusões ou translocações. Neste sentido, os avanços das tecnologias de sequenciamento de genomas e a bioinformática, tem fornecido ferramentas e abordagens para estudos genéticos nesses organismos. Nessa dissertação, exploramos dados obtidos do sequenciamento de Nova Geração (NGS) de *Rineloricaria lanceolata* e utilizamos uma série de ferramentas de bioinformática. Com isso, objetivamos evidenciar o polimorfismo cariotípico em *Rineloricaria lanceolata* e explorar os dados obtidos pelo sequenciamento do genoma da espécie, na intenção de levantar hipóteses sobre o surgimento da variação cariotípica no grupo. O mitogenoma parcial foi obtido e a anotação funcional realizada, sendo possível estabelecer o primeiro mitogenoma parcial descrito para o gênero *Rineloricaria*. O satelitoma de *R. lanceolata* evidenciou 40 sequências de DNAs repetitivos para a espécie classificadas em diferentes famílias. Com a descoberta das sequências, sugerimos a confecção de marcadores citogenéticos para as sequências mais abundantes no genoma da espécie. A caracterização citogenética da amostra de uma população de *R. lanceolata* também revelou diferenças significativas nos cariótipos, como uma nova variante ainda não observada para a espécie. Por fim, concluímos que abordagens *in silico* é um importante complemento para futuras técnicas *in situ* como FISH, sendo essenciais para responder possíveis questões que cercam a espécie. Portanto, o trabalho atual é um ponto de partida para novas abordagens cario-evolutivas envolvendo o gênero.

**Palavras-chave:** *Rineloricaria*; Satelitoma; Mitogenoma; Polimorfismo.



## ABSTRACT

Among the Neotropical fishes, the genus *Rineloricaria* is characterized by a great karyotypic diversity. These are fishes popularly known as armored catfish. Cytogenetic data for the genus show an evident polymorphism in these species, with different diploid numbers and karyotypic formulas, which may have their origin from chromosomal rearrangements, such as fissions, fusions, or translocations. In this sense, advances in genome sequencing technologies and bioinformatics have provided tools and approaches for genetic studies in these organisms. In this dissertation, we explore data obtained from Next-Generation Sequencing (NGS) of *Rineloricaria lanceolata* and use a series of bioinformatics tools. With this, we aimed to highlight karyotypic polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* and explore the data obtained by sequencing the genome of the species, with the intention of raising hypotheses about the emergence of karyotypic variation in the group. The partial mitogenome was obtained and functional annotation performed, and it was possible to establish the first partial mitogenome described for the genus *Rineloricaria*. The satellitome of *R. lanceolata* showed 40 sequences of repetitive DNAs for the species classified in different families. With the discovery of the sequences, we suggest the confection of cytogenetic markers for the most abundant sequences in the genome of the species. Cytogenetic characterization of the sample from a population of *R. lanceolata* also revealed significant differences in the karyotypes, such as a new variant not yet observed for the species. Finally, we conclude that *in silico* approaches are an important complement to future *in situ* techniques such as FISH, and are essential to answer possible questions surrounding the species. Therefore, the current work is a starting point for new karyo-evolutionary approaches involving the genus.

**Keywords:** *Rineloricaria*; Satellitome; Mitogenome; Polymorphism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da organização de diferentes classes de sequências de DNA repetitivos em Eucariotos (Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 2011).....	16
Figura 2 – Exemplar de <i>Rineloricaria lanceolata</i> , coletado no córrego da Onça-MS. Comprimento padrão (CP) de 6,2 cm.....	25
Figura 3 – Local de coleta, Córrego da Onça.....	25
Figura 4 – Mapa de localização do córrego da Onça. A estrela indica o ponto de coleta dos exemplares de <i>Rineloricaria Lanceolata</i> .....	26
Figura 1.1 – Representação evidenciando o polimorfismo encontrado em espécies do gênero <i>Rineloricaria</i> em diferentes localidades do Brasil.....	31
Figura 1.2 – Cariótipo A de <i>R. lanceolata</i> , evidenciando variação no par submetacêntrico e um cromossomo pequeno acrocêntrico com um dos homólogos ausente .....	33
Figura 1.3 – Cariótipo B de <i>R. lanceolata</i> , evidenciando ausência de um dos homólogos dos pares metacêntricos 1 e 2, variação no par submetacêntrico com a ausência de um dos homólogos e a ausência de um dos homólogos dos pares acrocêntricos 12 e 21 .....	33
Figura 1.4 – Cariótipo C de <i>R. lanceolata</i> evidenciando variação no par submetacêntrico com ausência de um dos homólogos do par 2 e 3 e ausência de um dos homólogos acrocêntricos do par 8, 25 e 26.....	34
Figura 1.5 – Cariótipo D de <i>R. lanceolata</i> evidenciando variação no par submetacêntrico grande 2 e médio 3, ausência de um dos homólogos do par de metacêntricos 1 e ausência de um dos homólogos do par de acrocêntricos 13 .....	35
Figura 1.6 – Cariótipo E de <i>R. lanceolata</i> evidenciando variação no par submetacêntrico com ausência de um dos homólogos do par grande 2 e médio 3 e ausência de um dos homólogos acrocêntricos do par 11 e 25.....	35
Figura 1.7 – Cariótipo F de <i>R. lanceolata</i> evidenciando variação no par submetacêntrico com ausência de um dos homólogos do par médio 2 e ausência de um dos homólogos acrocêntricos do par 6 e 24.....	36
Figura 1.8 – <b>A.</b> O idiograma representa o cariótipo padrão estabelecido no trabalho de Porto <i>et al.</i> (2014) para a espécie, com $2n= 48$ , fórmula cariotípica: $4m + 2st + 42a$ , $NF= 54;13$ <b>B.</b> Variação encontrada no cariótipo 2, com a ausência de um dos homólogos do par 2 de metacêntricos e a presença de um cromossomo acrocêntrico	

pequeno; **C.** No cariótipo 3, a ausência de um dos homólogos do par 2 de metacêntricos, presença de um par de submetacêntricos médio, ausência de um dos homólogos do par 10 e 24 de acrocêntricos e a presença de um cromossomo acrocêntrico pequeno; **D.** cariótipo 4, um cromossomo submetacêntrico médio e a ausência de um dos homólogos do par 10 e 24 de acrocêntricos; **E.** cariótipo 5, ausência de um dos homólogos do par 2 do metacêntrico, um cromossomo submetacêntrico médio, ausência de um dos homólogos do par de acrocêntricos 10 e 24 e um cromossomo pequeno .....37

Figura 1.9 – **F.** Variação encontrada no cariótipo 6, um submetacêntrico médio, e a ausência de um dos homólogos do par de acrocêntricos 10 e 24 e um par de cromossomos pequenos acrocêntricos; **G.** Cariótipo 7, um par de cromossomos submetacêntricos médio, e a ausência dos pares de cromossomos homólogos acrocêntricos 10 e 24; **H.** Cariótipo 8, ausência de um dos homólogos do par 2 de metacêntrico, um par de submetacêntricos médio, ausência do par de homólogos acrocêntricos 10 e 24 e um cromossomo acrocêntrico pequeno; **I.** Cariótipo 9, um par de cromossomos submetacêntricos médio, ausência dos pares homólogos dos cromossomos acrocêntricos 10 e 24, e a presença de um par de acrocêntricos pequenos; **J.** Cariótipo 10, um cromossomo submetacêntrico grande e um médio, ausência de um dos homólogos do par 10 de acrocêntricos, e ausência dos pares homólogos 10 e 24.....38

Figura 2.1 – Mitogenoma completo de *Rineloricaria lanceolata*.....43

Figura 3.1 – Gráfico evidenciando os perfis de abundância e divergência dos satélites extraídos do genoma de *R. lanceolata*.....51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos dados citogenéticos disponíveis na literatura para o gênero <i>Rineloricaria</i> .....	18
Tabela 2.1 – Resumo dos dados brutos oriundos do sequenciamento NGS de <i>R. lanceolata</i> .....	43
Tabela 2.2 – Características do genoma mitocondrial de <i>R. lanceolata</i> . As letras (L) e (H) indicam respectivamente, cadeia leve ( <i>light</i> - L) e cadeia pesada ( <i>heavy</i> - H)....	43
Tabela 3.1 – Principais características presentes nos 40 satélites identificados em <i>R. lanceolata</i> . RUL: <i>Repeat unit length</i> (comprimento da unidade de repetição) .....	49

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	AMOSTRAGEM DOS INDIVÍDUOS DE <i>RINELORICARIA LANCEOLATA</i> .....	24
4.2	ANÁLISES CITOGENÉTICAS.....	26
4.3	COLORAÇÃO CONVENCIONAL COM GIEMSA.....	26
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	27
4.5	SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO (NGS).....	27
4.6	MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL.....	27
4.7	CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA .....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>29</b>
5.1	DESCRIÇÃO DE UMA NOVA VARIANTE CARIOTÍPICA EM <i>Rineloricaria lanceolata</i> (SILURIFORMES, LORICARIDAE) .....	29
5.1.1	Introdução .....	29
5.1.2	Material e Métodos .....	31
5.1.3	Resultados .....	32
5.1.4	Discussão .....	36
5.1.5	Conclusões .....	39
5.2	MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL PARCIAL DE <i>Rineloricaria lanceolata</i> (SILURIFORMES, LORICARIDAE) .....	39
5.2.1	Introdução .....	40
5.2.2	Material e métodos .....	41
5.2.3	Resultados .....	41
5.2.4	Discussão .....	44
5.2.5	Conclusões .....	45
5.3	CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO <i>IN SILICO</i> DO SATELITOMA DE <i>Rineloricaria lanceolata</i> (SILURIFORMES, LORICARIDAE) .....	46
5.3.1	Introdução .....	46
5.3.2	Material e métodos .....	48
5.3.3	Resultados .....	49

5.3.4	Discussão .....	52
5.3.5	Conclusões .....	53
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A grande diversidade de organismos em ambientes de água doce no Brasil, se deve a presença dos grandes sistemas hidrográficos, que possuem uma importante distinção faunística. E essa distinção é formada devido à restrição do fluxo gênico, pelo isolamento geográfico na formação dos grandes sistemas hidrográficos. Grande parte dos peixes que habitam esses ambientes de água doce, pertencem ao grupo dos Actinopterygii, que é composto por cinco grandes ordens (Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Gymnotiformes), abrangendo 95% das espécies conhecidas no Brasil (ROSA; LIMA, 2008).

Os Siluriformes estão entre as maiores ordens de peixes com 3.707 espécies válidas, pertencentes à 412 gêneros e 39 famílias. Também, possuem uma ampla distribuição, abrangendo todos os continentes, exceto na Antártica. Apesar do grande número de espécies, apenas duas famílias são representantes marinhos Ariidae (água doce e marinha) e Plotosidae (marinha), o restante das famílias são restritas às águas doces, embora também existam espécies com a capacidade de invadir águas salobras (NELSON, 1994). A família Loricariidae representa a maior riqueza de espécies que compõem a ordem, com 970 espécies descritas e 100 gêneros. Até o momento, é composta por oito subfamílias, sendo elas Hypoptopomatinae, Neoplecostominae, Delturinae, Lithogeninae, Rhinelepineae, Otothyrinae, Hypostomina e Loricariinae. As espécies que compõem a família são comumente conhecidas como bagres blindados, pois possuem como característica predominante uma boca modificada em forma de disco de sucção (ARMBRUSTER, 2003; ARTONI; BERTOLLO, 2001; ESCHMEYER; FONG, 2016,2018; LUJAN et al., 2015).

A organização cariotípica desses peixes ainda é subexplorada. Grande parte dos estudos citogenéticos realizados na família, estão focados em espécies da subfamília Hypostominae. Embora, os grupos já estudados apresentam uma variação no número diploide ( $2n$ ) de  $2n=36$  na subfamília Loricariinae, *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998), a  $2n= 80$  na subfamília Hypostominae, *Hypostomus topavae* (BUENO et al., 2011). Essa variação cromossômica tem sido usada para caracterizar a família. Possivelmente, essa diversidade indica que ocorrem vários rearranjos cromossômicos, que são características comuns entre os loricarídeos e podem acabar levando a diversificação cariotípica. Com isso, torna-se cada vez mais

complexo traçar uma tendência evolutiva para o grupo (ALVES et al., 2003; ARTONI; BERTOLLO, 1999; 2001; KAVALCO, 2005).

A subfamília Loricariinae é o um dos grupos mais especiosos entre as subfamílias de Loricariidae, até o momento com 252 espécies válidas, que estão amplamente distribuídas (COVAIN et al., 2016; FRICKE et al., 2020; LUJAN et al., 2015). Assim também, o gênero *Rineloricaria* constitui o grupo mais rico em espécies da subfamília Loricariinae, constituído por 74 espécies válidas e muitas outras não descritas ainda e estão distribuídos por toda a América do Sul (FERRARIS, 2003; FRICK; ESCHMEYER, 2020; VERA-ALCARAZ, 2012).

O gênero apresenta uma diversidade cariotípica predominante, com o  $2n$  que pode variar de 36-70 cromossomos. Do mesmo modo, são caracterizados por apresentarem alterações cromossômicas e eventos de polimorfismos. Esses polimorfismos podem ser numéricos ou estruturais, e essa é outra peculiaridade para o gênero (CIUS et al., 2017), como já relatado em *R. lanceolata* (PORTO, 2014), *R. latirostris* (GIULIANO-CAETANO 1998), *R. lima* (ROSA et al., 2012) e polimorfismo numérico com a presença de cromossomo B em *R. pentamaculata* (ERRERO-PORTO, 2007). Essas variações encontradas no número diplóide e na fórmula cariotípica do gênero *Rineloricaria*, estão resumidas na tabela 1. Logo, a provável explicação para essa variação no número diplóide pode ser devido a eventos de inversões pericêntricas, translocações robertsonianas e/ou fissões cêntricas (ROSA et al., 2011).

Algumas hipóteses foram abordadas sobre as possíveis causas dessas variações, e alguns autores sugerem que possivelmente, a origem destes diferentes citótipos seriam devido às translocações robertsonianas ou fusões cêntricas. Segundo Porto *et al.* (2011) espécies desse gênero parecem estar mais susceptíveis a esses rearranjos robertsonianos. Adicionalmente, ROSA *et al.* (2012) estudaram populações de *R. lima* e observaram vestígios de rearranjos cromossômicos, por meio de hidridizações *in situ*, utilizando a sequência telomérica (TTAGGG), onde foram verificadas sequências ITS (*Intrachromosomal Telomeric Sequences*) e 5S rDNA juntos em locais de fusão cromossômica, sugerindo que essas duas sequências de DNA repetitivos poderiam atuar como locais de fusão cromossômica. Logo, essas sequências de DNAs repetitivos, podem ser agentes ativos na evolução cromossômica, como também moldar esses rearranjos cromossômicos.

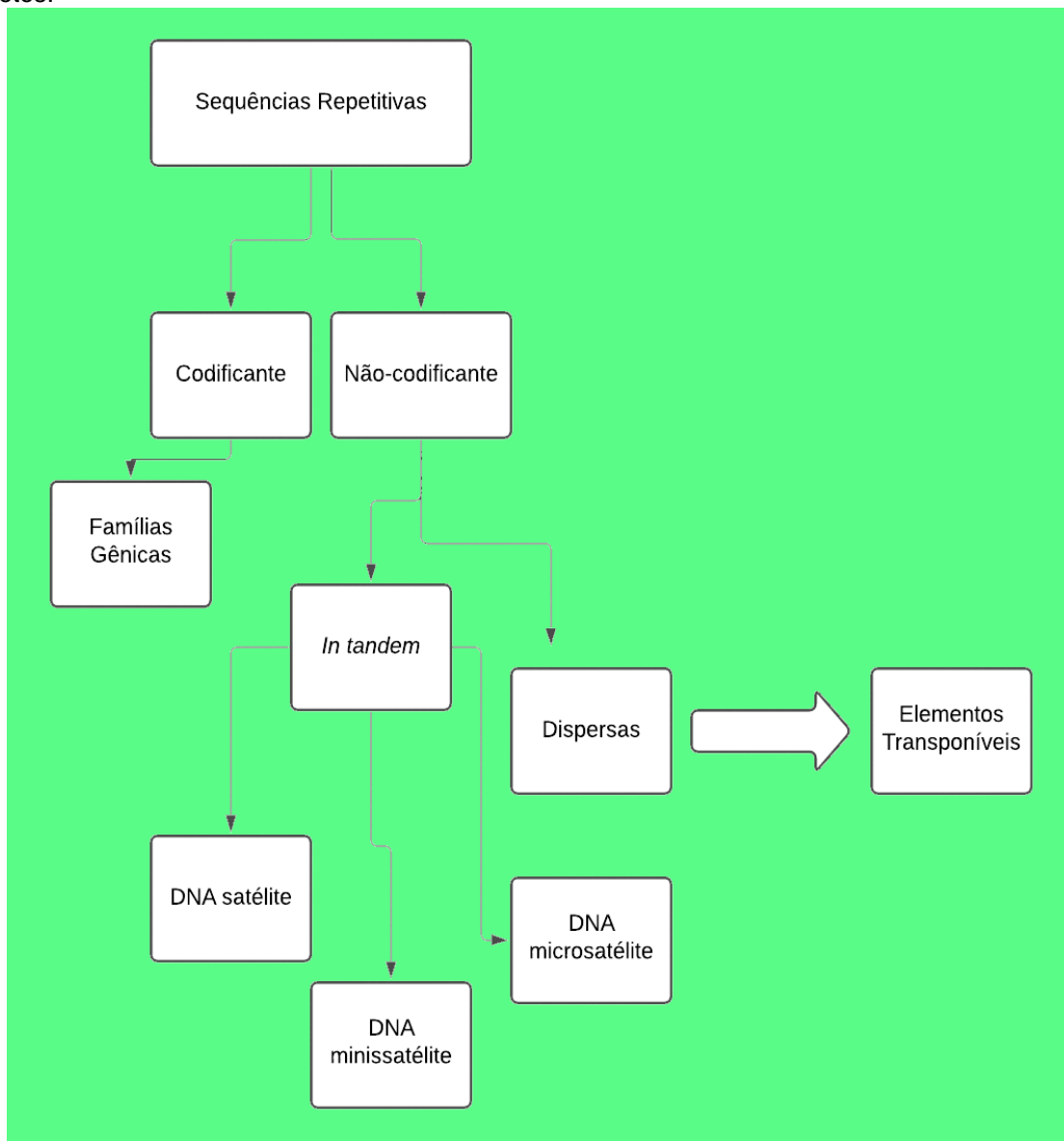


A presença de sequências de DNA repetitivos é comum no genoma de eucariotos, e são caracterizados por possuírem diversas famílias repetitivas. Como também, podem ser heterogêneas, sendo classificadas em duas categorias de acordo com características individuais da sua organização genômica, como elementos intercalados ou matrizes *in tandem* (BISCOTTI et al., 2015; YUAN et al., 2018). Os elementos intercalados são constituídos pelos elementos transponíveis (TEs) como transposons e retrotransposons, esses estão distribuídos por todo o genoma. Devido ao seu mecanismo de transposição, são capazes de se amplificar e se reinserir no genoma nuclear. Entretanto, alguns TEs mostram uma concentração em particular, em regiões cromossômicas específicas, como nos centrômeros ou sítios subtelo méricos (BISCOTTI et al., 2015; CADUCCI et al., 2020; WICKER et al., 2007).

Os TEs são divididos em duas classes, com base no seu intermediário de transposição, RNA ou DNA. Os retrotransposons ou classe I, se amplificam por meio de um RNA intermediário, e também são considerados a principal fonte de aumento de frações repetitivas. Os transposons de DNA ou classe II, são elementos transponíveis, que se movem e amplificam através do DNA (TOLLIS; BOISSINOT, 2012).

As sequências arranjadas *in tandem* incluem as sequências codificantes, famílias multigênicas, como RNA ribossômicos (rRNA), genes de histonas e não-codificantes, como os DNA satélites (micro e minissatélites), que estão esquematizados na figura 1. As unidades de repetições *in tandem* são organizadas em *clusters* e geralmente esses estão localizados em porções teloméricas ou pericentroméricas, podendo estar presente em um ou mais pares de cromossomos (LOPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Além disso, o genoma eucarioto é capaz de apresentar diferentes coleções de famílias de DNA satélites (satDNA), que são designadas como “satelitoma”. Outra característica geral sobre as famílias satDNAs é que elas diferem uma das outras por sua localização, comprimento de unidade de repetição, abundância e sequência de nucleotídeos. Como também, as famílias de satDNAs não são consideradas conservadas e algumas são específicas de determinadas espécies (RUIZ-RUANO et al., 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017).

Figura 1 - Esquema da organização de diferentes classes de seqüências de DNA repetitivos em Eucariotos.



Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 2011.

Em genomas que foram completamente sequenciados esses elementos repetitivos são considerados lacunas, devido a sua dificuldade na identificação correta da sua posição dentro da matriz do genoma. Com isso, a função desses elementos repetitivos por muito tempo permaneceu desconhecida, sendo considerados como DNA lixo. Entretanto, nos últimos anos uma série de estudos, permitiram com que essa definição mudasse, devido a descoberta de regiões que eram transcritas dentro desses elementos repetitivos, e o seu envolvimento nas funções genômicas, demonstrando que essas seqüências são importantes para a organização estrutural e funcional do genoma (GARRIDO-RAMOS, 2015).

Devido a capacidade que essas sequências repetitivas apresentam, de se transformarem rapidamente ao longo da evolução dos organismos, são considerados como potenciais marcadores citogenéticos, que podem ser capazes de rastrear rearranjos cromossômicos (MASCONE et al., 2007; SCHWARZACHER, 2003). Com isso, a técnica de hibridização *in situ* (FISH) tem contribuído significativamente para os avanços na caracterização de um satDNA, permitindo a sua localização e determinação de sequências de interesse. Logo, essas investigações sobre a distribuição cromossômica de DNAs repetitivos em genomas de peixes, demonstram ser uma ferramenta propícia para as análises de organização genômica e evolução dos peixes (ARTONI et al., 2015).

Com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento de Nova Geração (NGS) nos últimos anos, foi possível o sequenciamento do genoma de diferentes espécies, inclusive, espécies consideradas não-modelo. Pois, não necessitam de um genoma de referência. Logo, essas abordagens facilitaram o isolamento e obtenção dessas sequências repetitivas. Do mesmo modo, o uso dessas abordagens de NGS aliado a ferramentas de bioinformática como o *software Repeat Explorer* (NOVÁK et al., 2013), e o protocolo de alto rendimento apresentado por Ruiz-Ruano et al. (2016), permitiram uma análise com elevado desempenho para a caracterização e montagem de famílias de satDNAs (AFGAN et al., 2018; NOVÁK et al., 2013; RODRIGUES et al., 2019).

Entre os dados que compõem os resultados do sequenciamento do genoma de uma espécie, o DNA mitocondrial (mtDNA) pode ser recuperado. O mtDNA tem como característica uma molécula de fita dupla e circular. Além disso, é geralmente compacto, possuindo de 15 a 20Kb, que se organiza em 37 genes (2 rRNAs, 22 tRNAs, 13 genes codificadores de proteínas e uma região não codificadora) (ANDERSON et al., 1981). A montagem do mitogenoma também aliado a ferramentas de bioinformática, se mostra promissora em análises filogenéticas moleculares, estudos populacionais, assim como na estruturação genética de diferentes populações (AVISE et al., 2000; VIEIRA; PRODOXIMI, 2019; SONG et al., 2016). Embora exista diversos estudos na literatura com descrições de genoma mitocondrial completo, não há nenhum dado disponível para *Rineloricaria*.

Tabela 1 - Resumo dos dados citogenéticos disponíveis na literatura para o gênero *Rineloricaria*

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>2n</b>	<b>Fórmula Cariotípica</b>	<b>Autor</b>
<i>R. lanceolata</i>	Córrego da Onça, Taquari, Coxim-MS.	45	4m+ 2sm+ 2st+ 37a	PORTO et al. (2014)
		46	4m+ 2sm+ 2st+ 38a	
		47	4m+ 1sm+ 2st+ 40a	
		47	3m+ 1sm+ 2st+ 41a	
		48	3m+ 2st+ 43a	
<i>R. pentaculata</i>	Bacia do rio Paraná	56	8m/sm+ 4st/a	PORTO & PORTELA-CASTRO (2011)
	Ribeirão Tauá-PR	56	9m/sm+ 47st/a	PORTO & PORTELA-CASTRO (2011)
	Rio Barra Grande e Juruba-SC	56	4m+ 10sm+42st/a	PRIMO et al. (2017)
		54	6m+ 4sm+ 44st/a	
	Rio Tatupeba	56	8m/sm+ 48st/a	PORTO et al. (2011)
	Rio Jacucaca- PR	56	8m/sm+ 48st/a	MAIA et al. (2010)
	<i>R. lima</i>	Rio Açungui- PR	66	1m <sup>1</sup> + 1m <sup>3</sup> +1m <sup>5</sup> + 1st <sup>1</sup> + 60a
66			2m <sup>1</sup> + 1m <sup>3</sup> + 1m <sup>5</sup> + 2st+ 60a	
Rio Ribeira e Rio Açungui- PR		68	1m <sup>3</sup> + 1m <sup>5</sup> + 2sm <sup>1</sup> + 2st+ 62a	

Tabela 1 - Resumo dos dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Rineloricaria*

(Continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>2n</b>	<b>Fórmula Cariotípica</b>	<b>Autor</b>
<i>R. lima</i>	Rio Areia e Rio Açungui- PR	68	2m <sup>2</sup> + 2st+ 64a	ROSA et al. (2012)
		69	1m <sup>5</sup> +1sm <sup>1</sup> + 2st+ 65a	
		69	1m <sup>1</sup> + 2st+ 66a	
		70	2m <sup>4</sup> + 2st+ 66a	
		70	2st+ 68a	
<i>R.aff. langei</i>	Rio Iguçu-PR	65	3m+ 62st/a	CIUS et al. (2017)
		65	4m+ 61st/a	
		66	3m+ 63st/a	
		67	3m+ 64st/a	
<i>Rineloricaria</i> n.sp.	Rio Betari-SP	70	20m+ 18sm+ 18st/a	ALVES & FORESTI (2012)
<i>R. cadeae</i>	Rio Itapocu-SC	66	2m+ 64st/a	ALVES & FORESTI (2012)
	Lago Guaíba-RS	64	2m/sm+ 62st/a	MAIA et al. (2010)
		66	2m/sm+ 64st/a	ALVES et al. (2003)
<i>R. kronei</i>	Rio Forquetinha-RS	64	64 st/a	VENTURELLI et al. (2021)
	Rio Itapocu -SC	64	6m/sm+ 58st/a	ALVES et al. (2003)

Tabela 1 - Resumo dos dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Rineloricaria*

(Continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>2n</b>	<b>Fórmula Cariotípica</b>	<b>Autor</b>
<i>R. latirostris</i>	Rio Passa-Cinco-SP	44	16m/sm+ 28st/a	GIULIANO-CAETANO (1998)
		45	15m/sm+ 30st/a	
		46	14m/sm+ 32st/a	
		47	13m/sm+ 34st/a	
	Rio Mogi-Guaçu-SP	36	24m/sm+ 12st/a	GIULIANO-CAETANO (1998)
		37	23m/sm+ 14st/a	
		38	22m/sm+ 16st/a	
		39	21m/sm+ 18st/a	
		40	20m/sm+ 20st/a	
	Rio Laranjinha-PR	46	10m+ 4sm+ 32st/a	PRIMO et al. (2016)
	Rio Barra Grande-SC	46	10m+ 4sm+ 32st/a	GLUGOSKI et al. (2018)
	Rio Pedras-MG	46	10m+ 4sm+ 32st/a	GLUGOSKI et al. (2018)
	Rio Piumhi-MG	48	6m+ 6sm+ 36st/a	GLUGOSKI et al. (2018)
	Rio Três Bocas-PR	43	17m/sm+ 26st/a	GIULIANO-CAETANO (1998)
		44	16m/sm+ 28st/a	
		46	14m/sm+ 32st/a	
		47	13m/sm+ 34st/a	
		48	12m/sm+ 26st/a	

Tabela 1 - Resumo dos dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Rineloricaria*

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>2n</b>	<b>Fórmula Cariotípica</b>	<b>Autor</b>
<i>R. parva</i>	Rio Miranda-MS	60	6m/sm+ 54st/a	TAKAGUI et al. (2020)
<i>R. capitonía</i>	Rio Uruguai- Bacia do rio Uruguai	64	4m+ 2sm+ 58st/a	PRIMO et al. (2017)
<i>R. stellata</i>	Rio Uruguai- Bacia do rio Uruguai	54	6m+ 14sm+ 34st/a	PRIMO et al. (2016)
<i>R. malabarbai</i>	Rio Forquetinha- Bacia do Atlântico Sul	64	4m/st+ 60st/a	VENTURELLI et al. (2021)
<i>R. aequalicuspes</i>	Rio Marquine- Bacia do Atlântico Sul	68	68 st/a	VENTURELLI et al. (2021)
<i>R. microlepdogaster</i>	Rio Forquetinha- Bacia do Atlântico Sul	68	68 st/a	VENTURELLI et al. (2021)
<i>R. quadrensis</i>	Lagoa Quadros- Bacia do Atlântico Sul	70	6m/sm+ 64st/a	VENTURELLI et al. (2021)
<i>R. longicauda</i>	Lagoa Cerquinha- Bacia do Atlântico Sul	70	8m/sm+ 58st/a	VENTURELLI et al. (2021)
<i>R. strigilata</i>	Rio Forquetinha-RS	68	6m/sm+ 62st/a	MAIA et al. (2010)

## 2 JUSTIFICATIVA

Os representantes da família Loricariidae são conhecidos por apresentarem uma grande diversidade cariotípica, sendo compostos por diversos casos de rearranjos cromossômicos nas espécies que compõem a família. Como exemplo mais emblemático, têm-se o polimorfismo cariotípico que ocorre em *Rineloricaria*. Os DNAs repetitivos são conhecidos por estarem relacionados a sítios frágeis, ou *hotspots* que podem facilitar quebras e rearranjos cromossômicos, e esses podem ser os responsáveis por essas modificações observadas nesse gênero.

Destaque-se que poucos são os estudos que buscam relacionar DNAs repetitivos aos rearranjos cromossômicos. Entretanto, a maioria dos estudos estão frequentemente relacionados a localização de ITs por FISH ou esporadicamente a prospecção de transposons. Nenhum estudo massivo foi ainda realizado na caracterização de famílias de DNA repetitivos em *Rineloricaria*. Diante do panorama descrito acima, tem-se a importância de elucidar os mecanismos pelo qual podem estar ocorrendo esses polimorfismos. Por meio da exploração dos dados oriundos do sequenciamento de baixa cobertura do genoma da espécie *Rineloricaria lanceolata* e da mineração desses dados inéditos, espera-se obter um cenário mais amplo e resolutivo para explicar a diversidade cariotípica nesses peixes.



### 3 OBJETIVO GERAL

Evidenciar o polimorfismo cariotípico com uma amostra de uma população de *Rineloricaria lanceolata* e explorar os dados originados a partir do sequenciamento do genoma da espécie, visando levantar hipóteses sobre o surgimento da variação cariotípica no grupo.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprofundar a caracterização do polimorfismo cariotípico em *Rineloricaria lanceolata*;
- Extrair dos dados oriundos do sequenciamento NGS o genoma mitocondrial da espécie;
- Realizar a anotação estrutural desse mitogenoma;
- Caracterizar e comparar o mitogenoma montado de *R. lanceolata* com outros mitogenomas de peixes disponíveis;
- Caracterizar o satelitoma da espécie;
- Prospectar *in silico*, sequências genômicas que possam se tornar possíveis marcadores citogenéticos, que supostamente estejam envolvidos em rearranjos cromossômicos;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAGEM DOS INDIVÍDUOS DE *RINELORICARIA LANCEOLATA*

Os exemplares da espécie *Rineloricaria lanceolata*, visualizado na figura 2, foram coletados no Córrego da Onça visualizado na Figura 3 e no mapa de localização na figura 4, onde a estrela vermelha indica o ponto em que a coleta foi realizada. O córrego é um dos afluentes do Rio Taquari, e está localizado ao norte do estado do Mato Grosso do Sul, no município de Coxim. Situado no distrito de Silviolândia (18° 30' 23,9" S e 54° 40' 39,3" W). Para a captura dos peixes foram utilizadas peneiras ou redes de arrasto, os exemplares eram transportados vivos em baldes que continham água do próprio ambiente em que foram coletados, até o laboratório da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, onde eram transferidos para aquários aerados. Após todas as coletas os exemplares foram transportados em baldes com a oxigenação adequado e foi feita a troca da água, com oito horas de viagem até o destino final, a Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram colocados em aquários. E as análises decorrentes foram realizadas no Laboratório de Genética e Evolução-UEPG.

A captura dos peixes na natureza e transporte estão de acordo com a licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade autorização do ICMBio (Licença permanente para coleta de material zoológico, Número: 15115-1) (ANEXO 1). Os procedimentos foram submetidos e autorizados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, (Processo CEUA: 0769342/2021 e Protocolo UEPG: 21.000060874-2) (ANEXO 2).

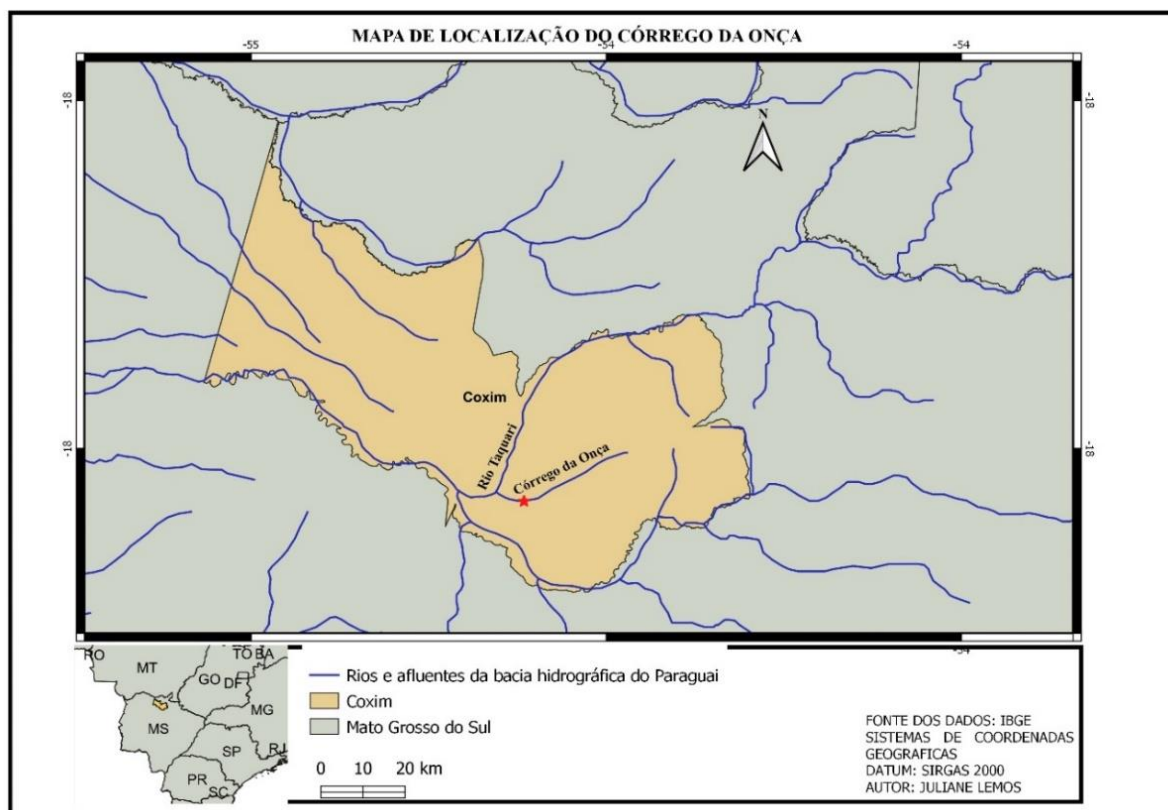
Figura 2 - Exemplar de *Rineloricaria lanceolata*, coletado no Córrego da Onça-MS. Comprimento padrão (CP) de 6,2 cm



Figura 3 - Local de coleta, Córrego da Onça



Figura 4 – Mapa de localização do Córrego da Onça. A estrela indica o ponto de coleta dos exemplares de *Rineloricaria Lanceolata*.



Fonte: O autor.

## 4.2 ANÁLISES CITOGENÉTICAS

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células de nadadeiras em regeneração, segundo o protocolo de Kalous *et al.*, (2010) (ANEXO 3), essa metodologia permite estimular o índice mitótico sem que necessite o sacrifício do animal. Após a fixação e montagem das lâminas, as suspensões celulares foram analisadas em microscópios de campo claro Olympus® Bx41 e as imagens foram capturas utilizando câmera CCD DP71 12mp com o software DP Controller (Olympus®). ]

## 4.3 COLORAÇÃO CONVENCIONAL COM GIEMSA

Para a verificação do número diplóide e montagem de cariótipos dos indivíduos de *Rineloricaria lanceolata*, as preparações cromossômicas previamente fixadas nas lâminas foram coradas por 20 minutos com solução de Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6,8) e em seguida são lavadas em água corrente e secas ao ar.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para a extração do DNA genômico, foram utilizados pedaços de amostras de fígado, que estavam preservados em álcool 90%. Utilizou-se da técnica de extração com solução salina (NaCl) (BRUFORD et al., 1992), (ANEXO 4) para obter-se as amostras de DNA, após os procedimentos os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose a 1%.

#### 4.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

Foi utilizado uma amostra de DNA total de um indivíduo de *Rineloricaria lanceolata* para a realização do sequenciamento massivo de nova geração (NGS), na plataforma BGISEQ-500 da BGI (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China) (*paired-end* 2x150pb).

#### 4.6 MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL

Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando a pipeline FastQC, posteriormente as amostras foram pré-processadas no Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USABEL, 2014). Para a montagem da sequência do genoma mitocondrial de *R. lanceolata*, foi utilizado o programa *get organelle* (JIN et al., 2020), utilizando como referencia o genoma mitocondrial completo das espécies: *Ancistrus temminakii* (NC 051963), *Hiptoptopoma incognitum* (NC 028072), *Hypostomus ancistroides* (NC 05270), *Hypostomus francisci* (NC 045188) retirados do Genbank. Em seguida, a anotação do genoma foi realizada no servidor MitoAnnotator (IWASAKI et al., 2013) do MitoFish (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>). E a composição de bases foi calculada pelo MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA

As análises *in silico* dos satDNA foram realizadas utilizando as ferramentas RepeatExplorer e Tandem Repeat analyzer (TAREAN), presentes na plataforma Galaxy (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010; NOVÁK; NEUMANN; PECH, 2013).

Como também, o protocolo de bioinformática SatMiner, descrito por Ruiz-Ruano *et al.* (2016) (<https://gitlab.com/fjruizruano/satminer/-/blob/master/README.md>).

Posteriormente, foi realizado uma análise de qualidade das sequências com o Trimmomatic (BOLGER; LOHSE e USABEL, 2014) selecionando *reads* par a par com  $Q > 20$  para todos os nucleotídeos. Posteriormente selecionado aleatoriamente 2x 200.000 *reads*. Em seguida, a análise dos clusters com estrutura típica de satDNA foi realizada utilizando o RepeatExplorer2 (NOVAK *et al.*, 2013) e TAREAN (NOVAK *et al.*, 2017) (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>) com 2 x 400.000 *reads*. Concluído a análise, foi possível o *download* dos satDNA putativos de baixa e alta confiança. Os *contigs* identificados pelo RepeatExplorer2 foram filtrados das bibliotecas originais com o uso do software DeconSeq (SCHIMIEDER; EDWARDS, 2011).

As demais sequências foram clusterizadas em RepeatExplorer2, do qual foram duplicadas o número de *reads* na segunda corrida (2x 400.000), gerando 2x 800.000 *reads*. Esse processo de agrupamento e filtragem foi repetido até que nenhuma nova sequência de satDNA fosse localizada, mantendo o número de leituras a cada interação.

A análise de abundância e divergência de cada variante foi realizada utilizando o *software* RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 2017), assim como a estimativa de abundância de cada satDNA no genoma com base no número de nucleotídeos alinhados dentro do número de leituras totais. Os satDNA foram nomeados seguindo a descrição de Ruiz-Ruano *et al.* (2016).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados estão organizados em três capítulos correspondentes aos artigos científicos.

### 5.1 DESCRIÇÃO DE UMA NOVA VARIANTE CARIOTÍPICA EM *Rineloricaria lanceolata* (SILURIFORMES, LORICARIDAE)

#### Resumo

O gênero *Rineloricaria* é um grupo monofilético que apresenta uma grande diversidade cariotípica com o número diploide que pode variar de 36 a 70 cromossomos. Essa variação observada no gênero é relacionada a rearranjos cromossômicos, especialmente fusões cêntricas. No presente estudo, exemplares de uma população de *Rineloricaria lanceolata*, do Córrego do Onça-MS, foi estudada citogeneticamente visando ampliar a caracterização do polimorfismo cariotípico observado na espécie. Os citótipos aqui encontrados confirmam a variação para o número diploide de 45, 46 e 47 cromossomos. Além disso, foi observada uma nova variante cromossômica, com um cromossomo metacêntrico relativamente grande que ainda não havia sido relatado para a espécie. Com isso, é possível supor a ocorrência de novas variações e que os cromossomos envolvidos nos rearranjos ainda devem ser completamente mapeados.

Palavras-chave: *Rineloricaria*; polimorfismo cromossômico; Variante cromossômica.

#### 5.1.1 Introdução

Os peixes representam cerca de 50% de todos os vertebrados, e os Siluriformes estão entre as maiores ordens com 3.707 espécies válidas, pertencentes à 412 gêneros e 39 famílias. Possuem uma ampla distribuição, abrangendo todos os continentes, exceto Antártica (NELSON, 1994). Os Siluriformes encontram-se em uma posição primitiva do seu grupo filogenético, podendo ser utilizados como um excelente modelo para estudos evolutivos, permitindo à compreensão da origem e diversificação dos vertebrados (NELSON, 2006). Aproximadamente 40% do grupo ocorre na região Neotropical, com um número elevado de espécies ocorrendo na região amazônica (LOPEZFERNANDEZ; ALBERT, 2001; NELSON, 1994).

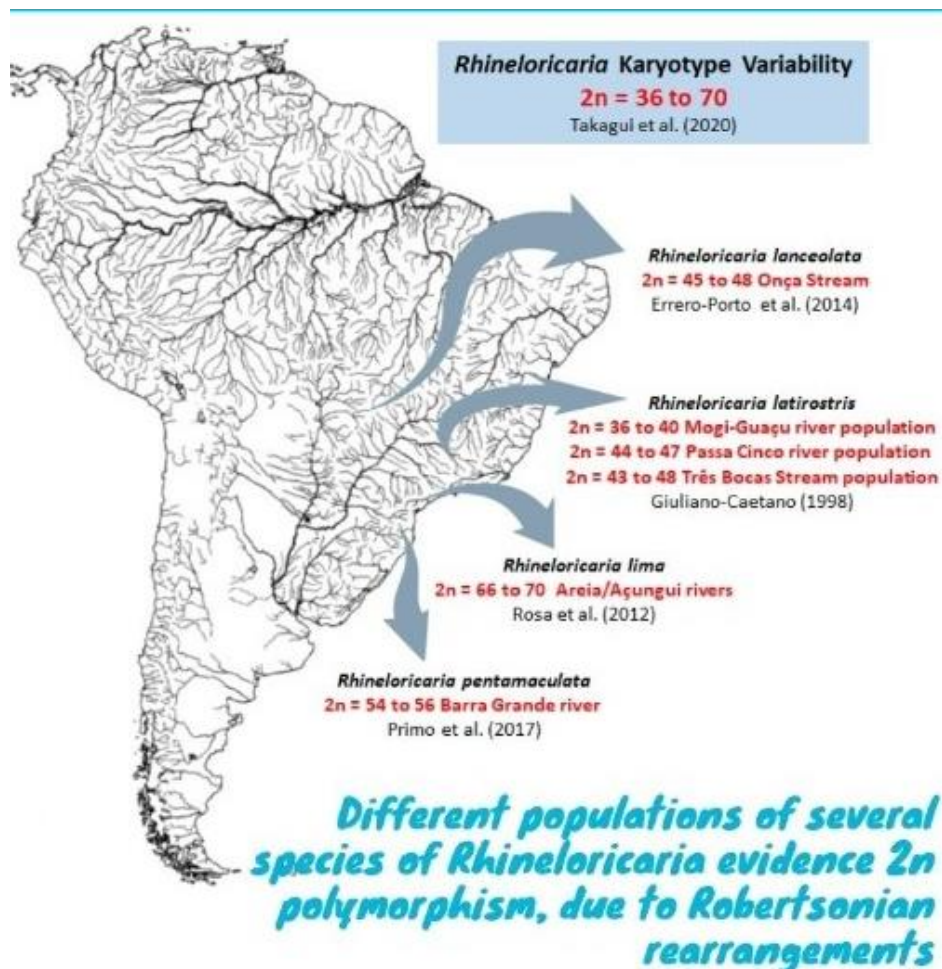
A família Loricariidae compõe a ordem Siluriformes, e é considerada a família com maior riqueza de espécies, conhecidos como bagres blindados devido a suas

placas ósseas e boca modificada em forma de disco de sucção (ARMBRUSTER, 2003; ARTONI; BERTOLLO, 2001; ESCHMEYER; FONG, 2016,2018; LUJAN et al., 2015). Sobre as características citogenéticas dessa família, os grupos estudados citogeneticamente apresentam uma variação no número diploide ( $2n$ ) de  $2n=36$  cromossomos em *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998), a  $2n=80$  cromossomos para *Hypostomus topavae* (BUENO et al., 2011) e essa variação cromossômica tem sido usada para caracterizar a família (ALVES, 2003).

O gênero *Rineloricaria* pertence a subfamília Loricariinae, e é considerado o grupo mais rico em espécies da subfamília (FERRARIS, 2003; VERAALCARAZ, 2012). O gênero apresenta uma ampla diversidade cariótipica com o número diploide que pode variar de 36-70 cromossomos, como também são caracterizados por apresentarem alterações cromossômicas e polimorfismos (CIUS et al., 2017). Os polimorfismos cariotípicos encontrados nas diferentes espécies estão representados na figura 1.1. O presente estudo caracteriza citogeneticamente uma amostra de uma população de *Rineloricaria lanceolata*, objetivando ampliar o conhecimento sobre a variabilidade cariotípica da espécie.



Figura 1.1 - Representação evidenciando os polimorfismos cariotípicos já descritos em populações do gênero *Rhineloricaria* em diferentes localidades do Brasil.



Fonte: O autor.

### 5.1.2 Material e Métodos

Foram estudados citogeneticamente seis exemplares de *Rineloricaria lanceolata*, coletados no córrego do Onça, afluente do rio Taquari, Bacia do rio Paraguai, no município de Coxim-MS ( $18^{\circ} 30' 23,9''$  S e  $54^{\circ} 40' 39,3''$  W). A coleta e o transporte dos peixes estão de acordo com a licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade autorização do ICMBio (Licença permanente para coleta de material zoológico, Número: 15115-1). Os procedimentos foram submetidos e autorizados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, (Processo CEUA: 0769342/2021 e Protocolo UEPG: 21.000060874-2. O índice mitótico foi obtido a partir da regeneração incompleta da nadadeira dorsal dos animais, seguindo o protocolo de Kalous *et al.* (2010). Para a

identificação do número, tamanho e morfologia dos cromossomos, as lâminas obtidas foram coradas pelo método convencional com Giemsa. As análises cariotípicas foram realizadas em microscópio de campo claro Olympus® Bx41, as metáfases eram fotografadas e os cariótipos montados no programa Adobe Photoshop versão demo.

### 5.1.3 Resultados

Diante do pequeno número amostral de exemplares de *Rineloricaria lanceolata*, a utilização da técnica adaptada de Kalous *et al.* (2010), auxiliou na obtenção do índice mitótico, sem a necessidade de sacrificar o animal, sendo possível a obtenção de metáfases de boa qualidade.

Foi realizada a montagem dos cariótipos dos seis indivíduos de *R. lanceolata*, para identificação de quais variações cariotípicas esses possuíam. Foram observadas variações interindividuais do número diploide entre  $2n=45$ ,  $46$  e  $47$ , e o NF variando entre  $48-52$ . Diante dessas variações foi possível estabelecer seis citótipos diferentes, onde três indivíduos possuem  $2n=47$  cromossomos, um indivíduo com  $2n=45$  cromossomos e dois indivíduos com  $2n=46$  cromossomos.

Três indivíduos apresentaram um número diploide de  $2n=47$  cromossomos e entre estes, três citótipos diferentes foram determinados: Cariótipo A com  $2m + 2sm + 2st + 41a$ , NF=51 (FIGURA 1.2); Cariótipo B com  $4m + 1sm + 2st + 40a$ , NF=52 (FIGURA 1.3); Cariótipo C com  $2m + 2sm + 2st + 41a$ , NF=51 (FIGURA 1.4). No cariótipo B foi observado a presença de um cromossomo metacêntrico de tamanho grande relativo aos demais cromossomos do complemento, que ainda não havia sido descrito para os diferentes citótipos da espécie, possivelmente se tratando de uma nova variação cromossômica para a espécie.

Figura 1.2 - Cariótipo A de *R. lanceolata*, evidenciando variação no par submetacêntrico e um cromossomo pequeno acrocêntrico com um dos homólogos ausente.

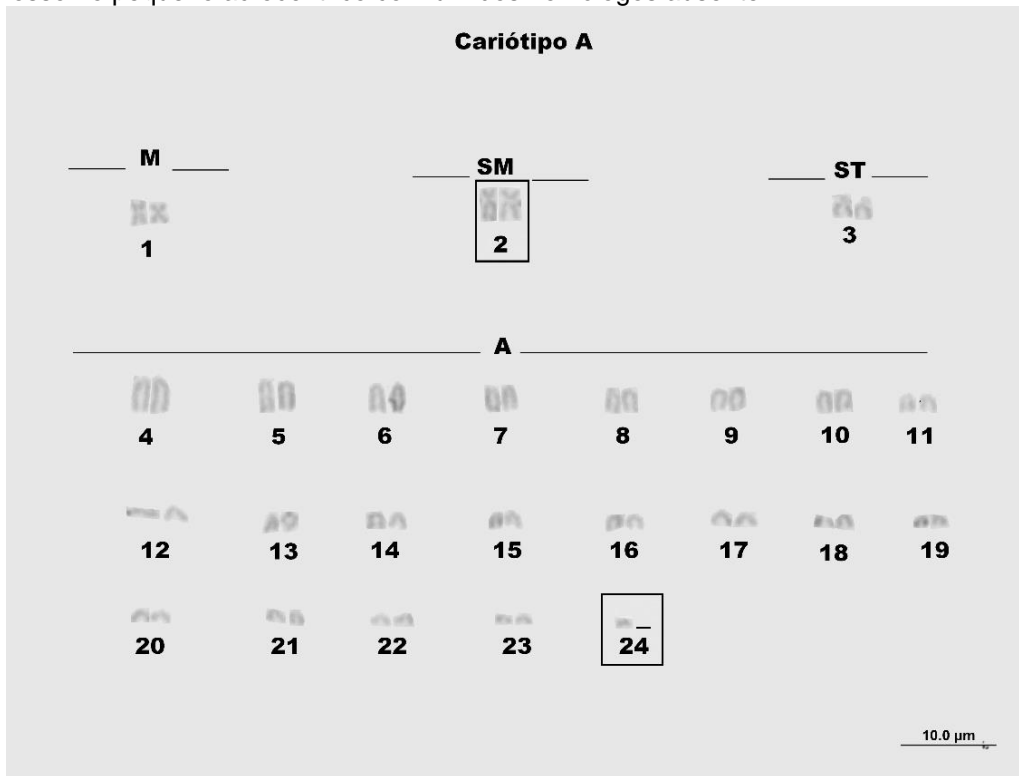


Figura 1.3 - Cariótipo B de *R. lanceolata*, evidenciando ausência de um dos homólogos dos pares metacêntricos 1 e 2, variação no par submetacêntrico com a ausência de um dos homólogos e a ausência de um dos homólogos dos pares acrocêntricos 12 e 21.

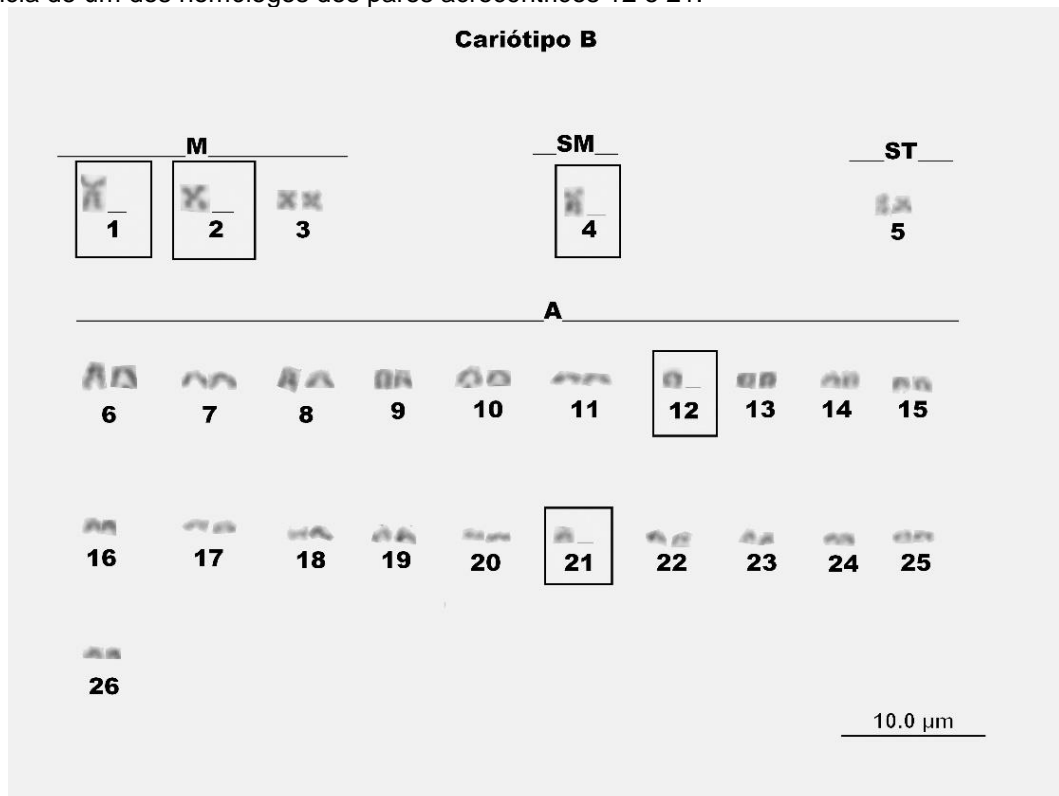
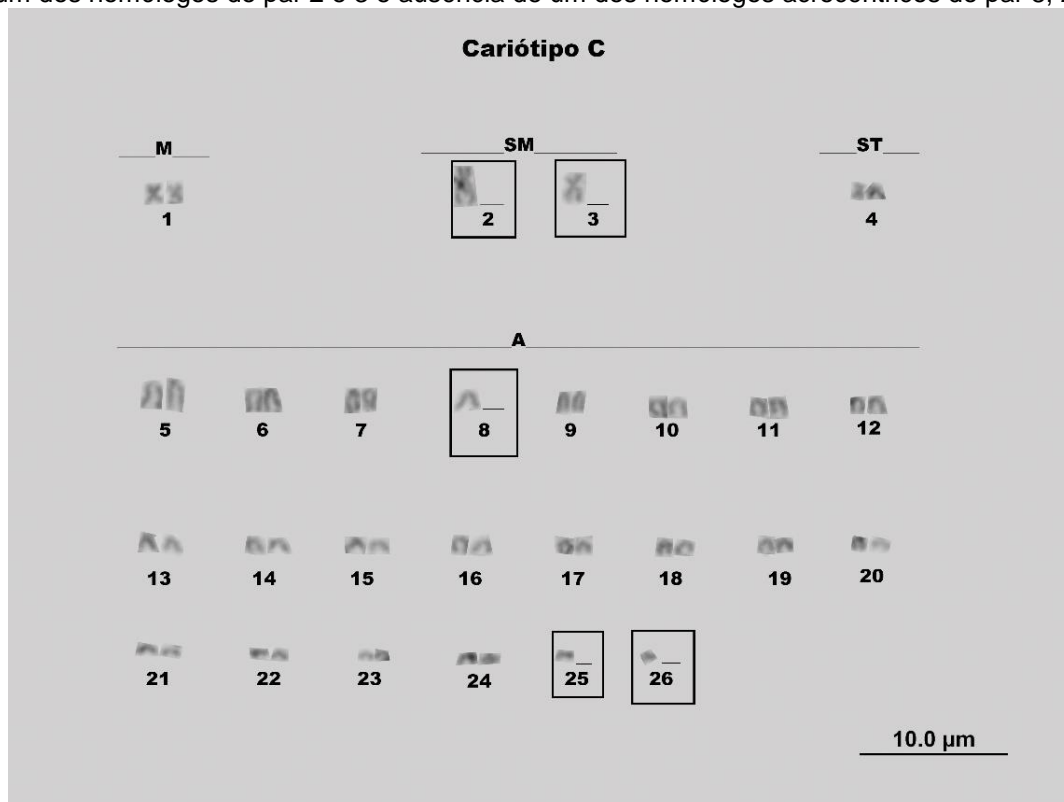


Figura 1.4 - Cariótipo C de *R. lanceolata* evidenciando variação no par submetacêntrico com ausência de um dos homólogos do par 2 e 3 e ausência de um dos homólogos acrocêntricos do par 8, 25 e 26.



Dois indivíduos apresentam um número diploide de  $2n=46$  cromossomos e entre estes, dois citótipos diferentes foram determinados: Cariótipo D com  $1m + 4sm + 2st + 39a$ ,  $NF=51$  (FIGURA 1.5); Cariótipo E com  $2m + 2sm + 2st + 40a$ ,  $NF=50$  (FIGURA 1.6). Apenas um indivíduo apresentou um número diploide de  $2n=45$  cromossomos com o cariótipo F,  $2m + 1sm + 2st + 40^a$ ,  $NF=48$  (FIGURA 1.7).

Figura 1.5 - Cariótipo D de *R. lanceolata* evidenciando variação no par submetacêntrico grande 2 e médio 3, ausência de um dos homólogos do par de metacêntricos 1 e ausência de um dos homólogos do par de acrocêntricos 13.

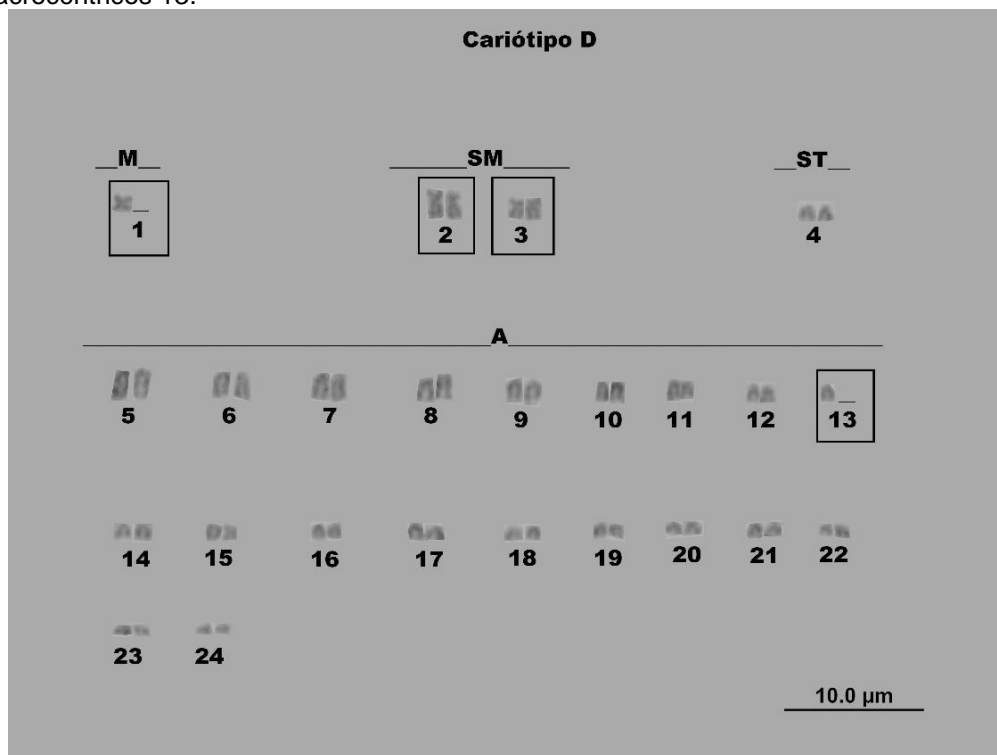


Figura 1.6 - Cariótipo E de *R. lanceolata* evidenciando variação no par submetacêntrico com ausência de um dos homólogos do par grande 2 e médio 3 e ausência de um dos homólogos acrocêntricos do par 11 e 25.

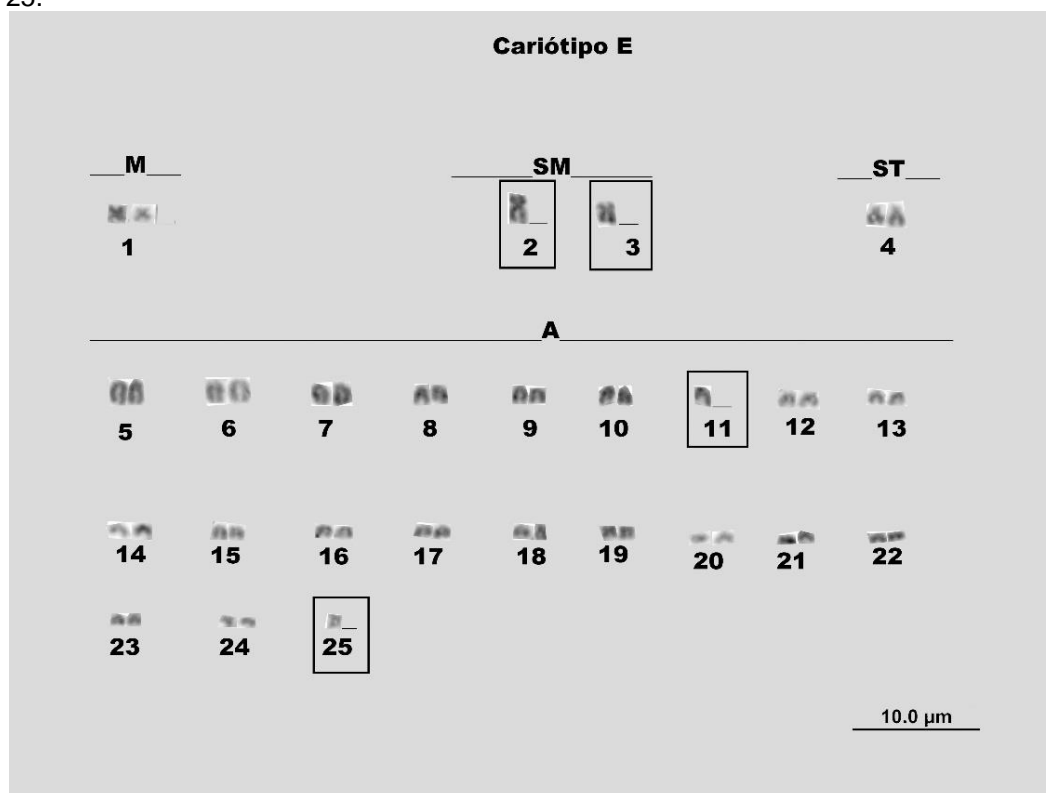
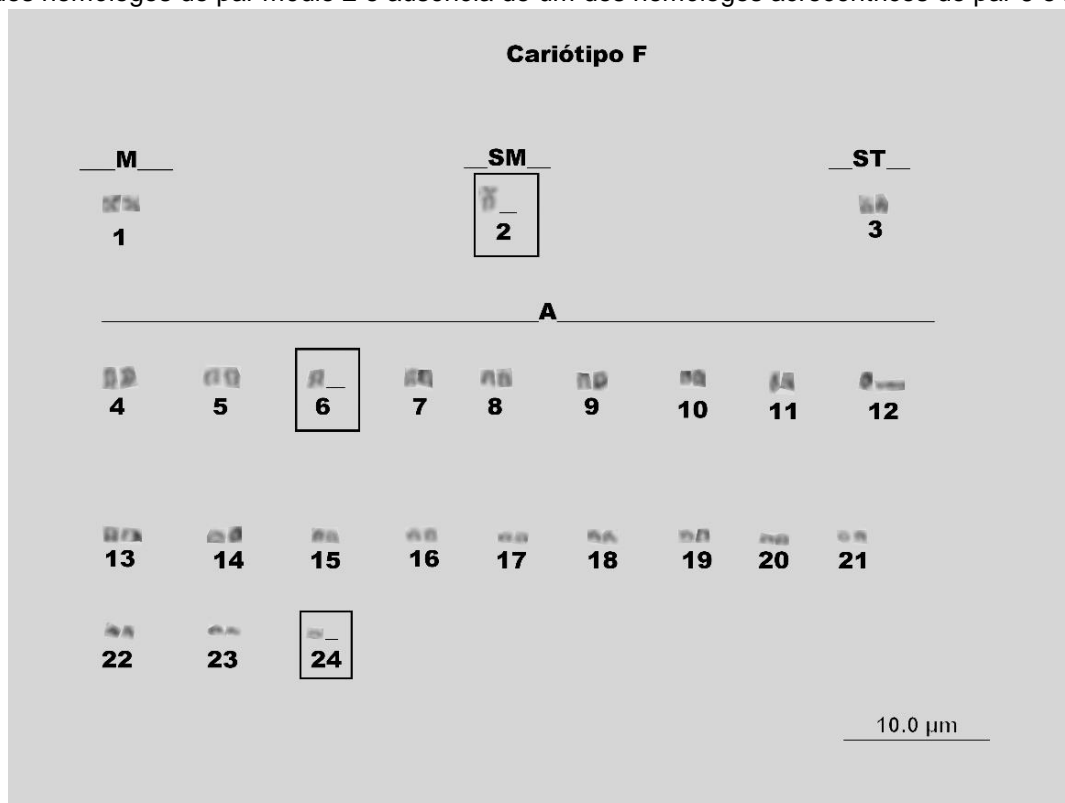


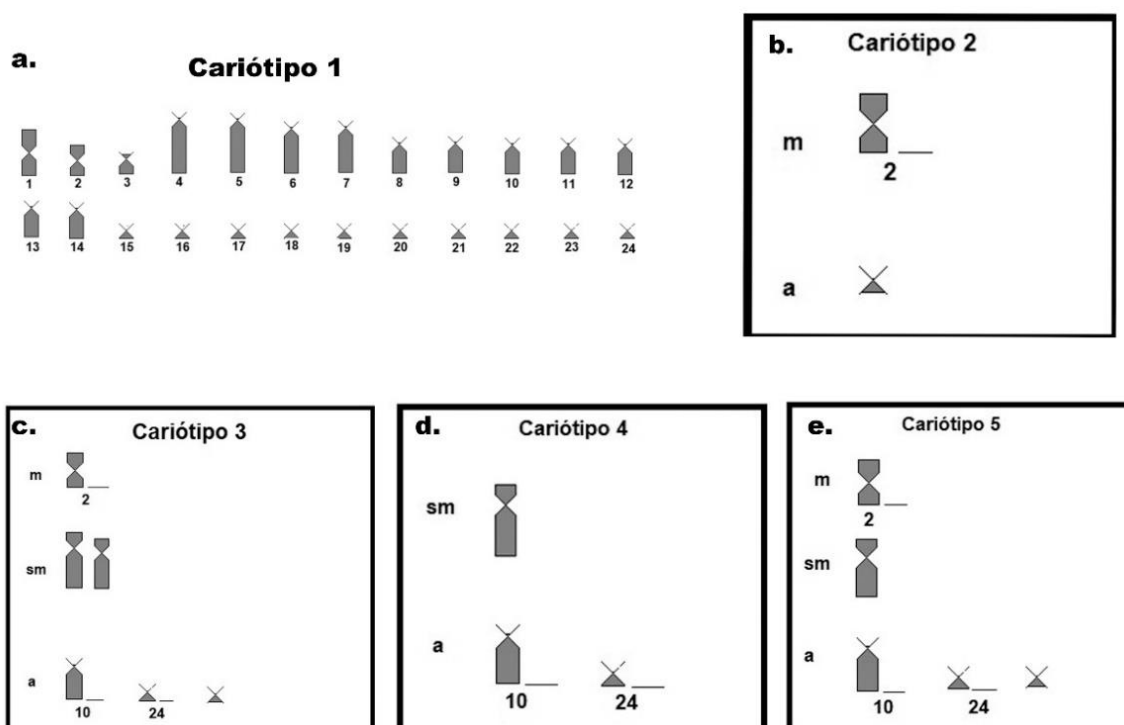
Figura 1.7 - Cariótipo F de *R. lanceolata* evidenciando variação no par submetacêntrico com ausência de um dos homólogos do par médio 2 e ausência de um dos homólogos acrocêntricos do par 6 e 24.



#### 5.1.4 Discussão

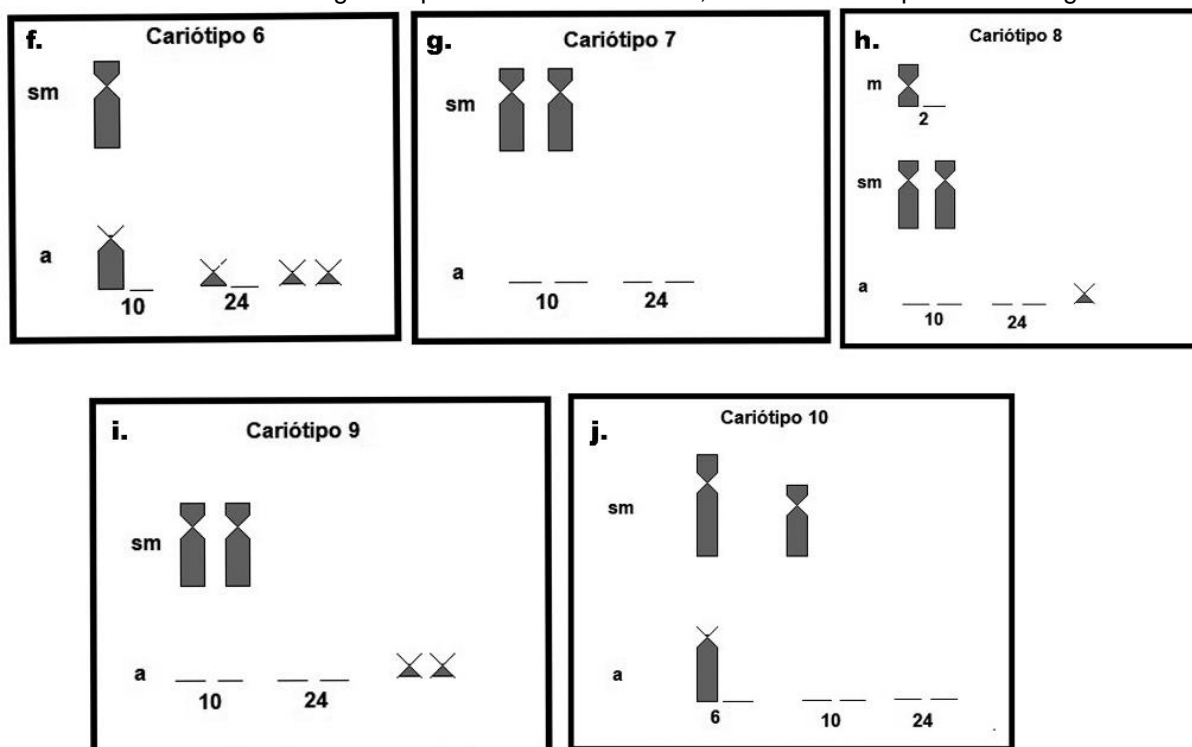
Com os resultados obtidos a partir da determinação do cariótipo da amostra de indivíduos de uma população de *Rineloricaria lanceolata* foram constatadas diferenças nas fórmulas cariotípicas, quando comparadas aos citótipos já descritos (FIGURA 1.8 e 1.9). Foram observados citótipos diferentes daqueles descritos no trabalho de Porto *et al.* (2014), sugerindo uma maior extensão para as variações cariotípicas, embora os números cromossômicos diploides encontrados não tenham diferido de  $2n = 45, 46$  e  $47$ . Isto sugere, o envolvimento de outros cromossomos do complemento sendo rearranjados devido a eventos robertsonianos.

Figura 1.8 - **A.** O idiograma representa o cariótipo padrão estabelecido no trabalho de Porto et al. (2014) para a espécie, com  $2n= 48$ , fórmula cariotípica:  $4m + 2st + 42a$ ,  $NF= 54;13$  **B.** Variação encontrada no cariótipo 2, com a ausência de um dos homólogos do par 2 de metacêntricos e a presença de um cromossomo acrocêntrico pequeno; **C.** No cariótipo 3, a ausência de um dos homólogos do par 2 de metacêntricos, presença de um par de submetacêntricos médio, ausência de um dos homólogos do par 10 e 24 de acrocêntricos e a presença de um cromossomo acrocêntrico pequeno; **D.** cariótipo 4, um cromossomo submetacêntrico médio e a ausência de um dos homólogos do par 10 e 24 de acrocêntricos; **E.** cariótipo 5, ausência de um dos homólogos do par 2 do metacêntrico, um cromossomo submetacêntrico médio, ausência de um dos homólogos do par de acrocêntricos 10 e 24 e um cromossomo pequeno.



Fonte: O autor.

Figura 1.9 - **F.** Variação encontrada no cariótipo 6, um submetacêntrico médio, e a ausência de um dos homólogos do par de acrocêntricos 10 e 24 e um par de cromossomos pequenos acrocêntricos; **G.** Cariótipo 7, um par de cromossomos submetacêntricos médio, e a ausência dos pares de cromossomos homólogos acrocêntricos 10 e 24; **H.** Cariótipo 8, ausência de um dos homólogos do par 2 de metacêntrico, um par de submetacêntricos médio, ausência do par de homólogos acrocêntricos 10 e 24 e um cromossomo acrocêntrico pequeno; **I.** Cariótipo 9, um par de cromossomos submetacêntricos médio, ausência dos pares homólogos dos cromossomos acrocêntricos 10 e 24, e a presença de um par de acrocêntricos pequenos; **J.** Cariótipo 10, um cromossomo submetacêntrico grande e um médio, ausência de um dos homólogos do par 10 de acrocêntricos, e ausência dos pares homólogos 10 e 24.



Fonte: O autor.

A variação estrutural e numérica aqui reafirmada para *R. lanceolata* é frequentemente relatada para outras espécies do gênero *Rineloricaria*, pertencentes a mesma região hidrográfica ou de regiões distintas, como em *R. candea* (ALVES; FORESTI, 2012; ALVES et al., 2003; MAIA et al., 2010), *R. kronei* (ALVES et al., 2003; VENTURELLI et al., 2021), *R. latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998; PRIMO et al., 2017; GLUGOSK et al., 2018), *R. lima* (ROSA et al., 2012) e *R. pentamaculata* (PRIMO et al., 2017).

Esses resultados indicam possíveis rearranjos cromossômicos ocorrendo na espécie. Segundo Kavalco *et al.* (2005) na subfamília Loricariinae translocações, fissões e fusões cêntricas e inversões pericêntricas são rearranjos cariotípicos comuns. E esses eventos possivelmente são os agentes responsáveis pela diversificação cariotípica do gênero (PORTO et al., 2011, 2014).



Com o citótipo B aqui estabelecido ficou evidenciado uma nova variante cariotípica que ainda não havia sido descrita para *R. lanceolata*, um cromossomo metacêntrico de tamanho grande com a ausência de seu homólogo. Com isso, é reforçado a hipótese de que a diversificação e evolução cariotípica do grupo são marcadas por diversos rearranjos, e esses rearranjos cromossômicos segundo Porto *et al.* (2014) conseguem se manter na população, devido a cruzamentos que possibilitem a formação de gametas equilibrados. Entretanto, gametas que apresentam uma duplicação de braços cromossômicos foram sugeridos para *R. lima* e parecem não afetar a viabilidade individual, mesmo diante da produção de gametas desequilibrados (ROSA *et al.*, 2012).

#### 5.1.5 Conclusões

O presente estudo caracterizou citogeneticamente uma amostra de uma população de *Rineloricaria lanceolata* do córrego da Onça-MS, que contribuiu para o aprofundamento do conhecimento sobre o polimorfismo apresentado para a espécie. Além disso, uma nova variação foi observada no cariótipo B, indicando que as variações podem ser ainda mais amplas nessa espécie.

## 5.2 MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL PARCIAL DE *Rineloricaria lanceolata* (SILURIFORMES, LORICARIDAE)

### Resumo

*Rineloricaria* é o maior gênero em riqueza de espécies da subfamília Loricariinae e estão distribuídos pela América do Sul. Embora, as relações filogenéticas do gênero ainda sejam incertas, com o avanço do sequenciamento do genoma mitocondrial, é possível realizar diversos estudos como taxonômicos, filogenéticos, genética de populações e na conservação das espécies. Diante da escassez de trabalhos com o mitogenoma completo de *Rineloricaria*, o presente estudo apresentou o primeiro mitogenoma parcial para o gênero. O comprimento total do mitogenoma é 16.791pb, contendo 13 genes codificadores de proteínas, 22 RNA transportadores e 2 RNA ribossômicos, e uma região D-loop incompleta. Entretanto, o mitogenoma da espécie apresenta a conformação típica de vertebrados com todos os genes sendo codificados na cadeia pesada, com exceção NADH6 e oito tRNAs.

Palavras-chave: *Rineloricaria*; Mitogenoma; Sequenciamento.

### 5.2.1 Introdução

Os Siluriformes estão entre as maiores ordens de peixes, com 412 gêneros e 34 famílias, sendo a família Loricariidae considerada a segunda maior família em riqueza de espécies da ordem Siluriformes (ARMBRUSTER, 2003). Atualmente a família é composta por oito subfamílias sendo elas Hypoptopomatinae, Neoplecostominae, Delturinae, Lithogeninae, Rhinelepininae, Otothyrinae, Hypostominae e Loricariinae. O gênero *Rineloricaria* pertence a subfamília Loricariinae, e as espécies do gênero constituem o grupo mais rico em espécies dessa subfamília, e estão distribuídos por toda a América do Sul (LUJAN et al., 2015).

Atualmente a família Loricariidae possui apenas sete descrições de mitogenomas completos, e essas informações sobre o sequenciamento de genomas permitem a obtenção de dados que podem ser úteis, para entender filogenias (SONG et al., 2016), como também podem ser utilizadas em estudos sobre evolução molecular, genética de populações, sistemática, filogeografia e conservação das espécies (AVISE et al., 2000; VIEIRA; PRODOXIMI, 2019).

Entre esses dados que compõem o genoma completo, as sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) podem ser recuperadas. O genoma mitocondrial tem como característica uma alta taxa evolutiva, baixa taxa de recombinação e herança uniparental, e esse conjunto de características fazem com que o mtDNA seja um marcador molecular eficiente, e uma importante ferramenta para identificação biológica (ROCHA-REIS et al., 2020). Devido aos avanços do sequenciamento de nova geração (NGS) aliado as ferramentas de bioinformática, tornou-se possível que as análises de mitogenomas fossem realizadas, inclusive em organismos considerados não-modelo (MARDINS, 2008). Embora a grande diversidade e riqueza de espécies da família Loricariidae, o gênero *Rineloricaria* não apresenta nenhuma descrição do mitogenoma, estando disponível apenas a descrição do mitogenoma da espécie *Hypoptopoma incognitum*, que se encontra na mesma subfamília Loricariinae (MOREIRA et al., 2015). Diante disso, objetivamos aqui, obter um mitogenoma de referência para estudos em Loricariinae, especialmente para o gênero *Rineloricaria*.

### 5.2.2 Material e métodos

Os espécimes de *Rineloricaria lanceolata*, foram coletados no córrego do Onça, afluente do rio Taquari, Bacia do rio Paraguai, no município de Coxim-MS (18° 30' 23,9" S e 54° 40' 39,3" W). A coleta estava de acordo com a licença ambiental do ICMBio (Licença permanente para coleta de material zoológico, Número: 15115-1). Os procedimentos foram submetidos e autorizados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, (Processo CEUA: 0769342/2021 e Protocolo UEPG: 21.000060874-2).

Para o sequenciamento do genoma, o DNA genômico total foi extraído a partir de tecido de fígado utilizando o protocolo de extração salina (BRUFORD et al., 1992). Após a extração, o material genético obtido foi preparado e enviado para o sequenciamento massivo de nova geração (NGS), na plataforma BGISEQ-500 da BGI (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China) com um comprimento de leitura de 150pb.

Primeiramente, as sequências foram submetidas ao controle de qualidade via FastQC. Após as análises de qualidade, as amostras foram pré-processadas usando a pipeline Trimmomatic v0.39 (BOLGER et al., 2014). Para a montagem do genoma mitocondrial foi utilizado o kit de ferramentas de montagem *get organelle* v1.7.5.3 (JIN et al., 2020), utilizando mitogenomas disponíveis como referência: *Ancistrus temminakii* (NC 051963), *Hipoptopoma incognitum* (NC 028072), *Hypostomus ancistroides* (NC 05270), *Hypostomus francisci* (NC 045188). Posteriormente, as sequências foram anotadas no MitoAnnotator (IWASAKI et al., 2013) do MitoFish (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>) e MITOS 2 (DONATH et al., 2019). E a composição de bases foi calculada pelo *software* MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

### 5.2.3 Resultados

O sequenciamento completo resultou em 8 milhões de *reads paired ended* de 150pb de comprimento para *R. lanceolata* (Tabela 2.1). Dentro desses dados, o genoma mitocondrial completo da espécie possui 16.791pb de comprimento e é composto por 37 genes funcionais (Figura 2.1), dos quais 13 são genes codificadores de proteínas (PCGs), 22 genes de tRNA, 2 de rRNA e uma região controle incompleta, seguindo a ordem do que é esperado para mitogenomas de peixes. Todos os genes

PCGs encontram-se na cadeia pesada (H), com exceção do gene NADH<sup>6</sup>, que está na cadeia leve (L), também se encontram na mesma cadeia oito tRNAs (tRNA<sup>(Pro)</sup>, tRNA<sup>(Glu)</sup>, tRNA<sup>(Ser)</sup>, tRNA<sup>(Tyr)</sup>, tRNA<sup>(Cys)</sup>, tRNA<sup>(Asn)</sup>, tRNA<sup>(Ala)</sup>, tRNA<sup>(Gln)</sup>). Esses resultados estão apresentados na tabela 2.2.

O conteúdo de A+T representam 56,8% do mitogenoma. A composição das demais bases é de T 31,8%, C 14,8%, A 25,0% e G 28,4%. Adicionalmente, o mitogenoma de *R. lanceolata* apresenta 13 regiões intergênicas, totalizando 113pb, sendo a variação de nucleotídeos intergênicos de 1 a 38pb. Como também, apresentaram sobreposições que totalizaram 32pb (entre tRNA<sup>(Pro)</sup> e tRNA<sup>(Thr)</sup>-2bp; NADH<sup>6</sup> e NADH<sup>5</sup>-4pb; NADH<sup>4</sup> e NADH<sup>4L</sup>-7pb; tRNA<sup>(Arg)</sup> e NADH<sup>3</sup>-2bp; tRNA<sup>(Gly)</sup> e COIII-1bp; COIII e ATPase<sup>6</sup>-1pb; ATPase<sup>6</sup> e ATPase<sup>8</sup>-10bp; tRNA<sup>(Cys)</sup> e tRNA<sup>(Asn)</sup>-1bp; NADH<sup>2</sup> e tRNA<sup>(Met)</sup>-2bp; tRNA<sup>(Gln)</sup> e tRNA<sup>(Ile)</sup>-1bp; tRNA<sup>(Val)</sup> e 16S rRNA-1bp).

Todos os PCGs começam com um códon usual ATG, com exceção do gene COI que inicia com o códon GTG, e quatro genes codificadores de proteínas terminam com códon TAG (Cyt b, NADH<sup>6</sup>, NADH<sup>3</sup> e NADH<sup>2</sup>), seis terminam com códon TAA (NADH<sup>5</sup>, NADH<sup>4L</sup>, ATPase<sup>6</sup>, ATPase<sup>8</sup>, COI e NADH<sup>1</sup>). Os demais genes são terminados por códons de parada incompletos, TA (COIII) e T (NADH<sup>4</sup> e COII). Alguns tRNA exibiram códons atípicos como tRNA<sup>(Leu)</sup> UAG, tRNA<sup>(Ser)</sup> GCU, tRNA<sup>(Ser)</sup> UGA, tRNA<sup>(Leu)</sup> UAA.

A região controle ou D-loop de *R. lanceolata* foi montada parcialmente, possivelmente devido a sequências repetitivas *in tandem* nessa região, dificultando a montagem (HAHN et al., 2013; JIA et al., 2020; VODOLAZHSKIYA et al., 2008). Bem como, de acordo com o programa utilizado, os resultados atuais (quase completo), estão próximos do melhor que é possível obter a partir das leituras de sequenciamento. A região D-loop encontra-se entre o tRNA<sup>(Pro)</sup> e um tRNA<sup>(Phe)</sup>, possuindo um comprimento de 1184pb.

Tabela 2.1 - Resumo dos dados brutos oriundos do sequenciamento NGS de *R. lanceolata*.

Dados brutos do sequenciamento:	
Sequências Totais	8,017,725
Comprimento da Sequência	150pb
Proporção de Q20(%)	97,39
Conteúdo GC(%)	39,18



Tabela 2.2 - Características do genoma mitocondrial de *R. lanceolata*. As letras (L) e (H) indicam respectivamente, cadeia leve (light - L) e cadeia pesada (heavy - H).

(Conclusão)

Gene	Posição	Comprimento (bp)	Cadeia	Sobreposição	Códon de início	Códon de parada
<a href="#">tRNA<sup>(Asp)</sup></a>	7079-7152	74	H	4	-	-
COII	7158-7848	690	H	5	ATG	T-
<a href="#">tRNA<sup>(Lys)</sup></a>	7849-7922	74	H	0	-	-
ATPase <sup>8</sup>	7924-8088	164	H	1	ATG	TAA
ATPase <sup>6</sup>	8079-8761	681	H	-10	ATG	TAA
COIII	8762-9545	783	H	-1	ATG	TA
<a href="#">tRNA<sup>(Gly)</sup></a>	9546-9617	72	H	-1	-	-
NADH <sup>3</sup>	9618-9966	348	H	0	ATG	TAG
<a href="#">tRNA<sup>(Arg)</sup></a>	9967-10036	70	H	-2	-	-
NADH <sup>4L</sup>	10037-10333	296	H	0	ATG	TAA
NADH <sup>4</sup>	10327-11707	1380	H	-7	ATG	T-
<a href="#">tRNA<sup>(His)</sup></a>	11708-11776	69	H	0	-	-
<a href="#">tRNA<sup>(Ser)</sup></a>	11777-11843	67	H	0	-	-
<a href="#">tRNA<sup>(Leu)</sup></a>	11844-11916	73	H	0	-	-
NADH <sup>5</sup>	11917-13743	1826	H	0	ATG	TAA
NADH <sup>6</sup>	13740-14258	518	L	-4	ATG	TAG
<a href="#">tRNA<sup>(Glu)</sup></a>	14259-14326	68	L	0	-	-
Cyt b	14331-15464	1133	H	4	ATG	TAG
<a href="#">tRNA<sup>(Thr)</sup></a>	15466-15538	73	H	1	-	-
<a href="#">tRNA<sup>(Pro)</sup></a>	15537-15606	70	L	-2	-	-
D-loop	15607-16791	1184	-	-	-	-

#### 5.2.4 Discussão

Em síntese, a maioria dos mtDNAs sequenciados atualmente são de animais (SMITH et al., 2015) apesar disso, os estudos sobre mitogenomas completos para o gênero *Rineloricaria* são escassos. A organização do genoma mitocondrial de *Rineloricaria lanceolata* é semelhante ao que já é descrito para peixes (SATO et al., 2016). Além disso, trata-se da oitava descrição de mitogenoma para a família Loricariidae, e o segundo descrito da subfamília Loricariinae, e conseqüentemente é semelhante a essas espécies já descritas, com 13 PCGs, 22 tRNAs, 2 rRNA e uma região controle (MOREIRA et al., 2016; REIN et al., 2019; ROCHA-REIS et al., 2020).

Embora, todos os vertebrados apresentem além dos genes codificantes, uma pequena região controle não codificante, que comumente contém elementos essenciais envolvidos na replicação e transcrição A anotação dessa região conhecida

como D-loop ou região controle, não foi possível completamente em *R. lanceolata*. Essa região pode ser um problema para os algoritmos de montagem de sequências, devido as repetições, tornando-se complexa a montagem da região (HAHN et al., 2013; KORNIENKOE et al., 2019; PARK et al., 2021; TANG et al., 2014; ZHANG et al., 2016). Entretanto, a montagem do mitogenoma obteve sucesso em sua totalidade, exceto, pela região D-loop. Mais estudos ainda serão essenciais para entender essa região na espécie.

O tamanho total do mitogenoma de *R. lanceolata* está de acordo, quando comparado aos demais loricarídeos que variam de 16.497pb *Sturisomatichthys panamense* (REN et al., 2020) a 17.066pb em fêmeas de *Hypostomus aff. ancistrus* (ROCHA-REIS et al., 2020) como também, para outras espécies de peixes (SATO et al., 2016). Quanto a composição de bases, o alto valor de A+T é semelhante ao esperado para vertebrados (ASAKAWA et al., 1991). Adicionalmente, os códons de terminação incompletos normalmente são encontrados em mitogenomas de peixes, sendo complementados pelo processo de poliadenilação pós-transcricional (MOREIRA et al., 2016; OJALA et al., 1981). O gene COI assim como em outros peixes ósseos, iniciou com o códon GTC. As sobreposições observadas entre os genes codificadores de proteínas na mesma fita ou em fitas opostas, são casos semelhantes em grande parte dos vertebrados (VITTAS et al., 2011; ROCHA-REIS et al., 2020; SATO et al., 2016).

A maioria dos genes mitocondriais é codificada na fita pesada, com exceção de nove genes que são codificados na fita leve e isto é consistente em outros vertebrados (MA et al., 2014; YUE et al., 2006). Foram encontrados 2 genes de RNA ribossômicos de transferência, rRNA 12S (948pb) e rRNA 16S (1664pb) localizados em posições típicas entre tRNA<sup>(Phe)</sup> e tRNA<sup>(Leu)</sup> e separados por um tRNA<sup>(Val)</sup>, frequentemente observados (INOUE et al., 2000; PETRILLO et al., 2006).

### 5.2.5 Conclusões

Estabelecemos aqui apenas o segundo mitogenoma para Loricariinae. Contudo, o mapeamento gênico corrobora os mitogenomas descritos para peixes de modo geral. Desse modo, acreditamos que o mitogenoma de *R. lanceolata*, poderá auxiliar na taxonomia do grupo e estudos voltados a conservação desses loricarídeos.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DO SATELITOMA DE *Rineloricaria lanceolata* (SILURIFORMES, LORICARIDAE)

#### Resumo

Caracteriza-se no genoma dos eucariotos: DNAs disperso pelo genoma, os elementos transponíveis, e as repetições *in tandem*, denominados DNAs satélites (satDNA). O conjunto de satDNA, é denominado satelitoma. Essas sequências são consideradas marcadores citogenéticos importantes em estudos de evolução, identificação de rearranjos cromossômicos e organização do genoma. Dessa forma, o presente estudo buscou caracterizar o Satelitoma (satDNA) de *Rineloricaria lanceolata*, com o intuito de posteriormente validar e localizar por hibridização *in situ*, marcadores cromossômicos de DNA repetitivo que estão envolvidos em “hotspots” de rearranjos cromossômicos. Após as iterações foram encontradas 40 famílias de satDNA, totalizando 18.460 pares de bases e com o comprimento de “repeat unit lengths” (RUL), variando de 20 a 4715 pb. A busca por homologias revelou que a maioria das sequências de satDNA não apresenta similaridade com outras sequências em bancos de dados. O estudo apresentou a primeira caracterização de famílias de satDNA para o gênero *Rineloricaria*, contudo baseado no objetivo de caracterizar satDNA que estejam envolvidos em rearranjos cromossômicos, fica proposto a validação dessas sequências com a confecção de *primers* e validação via reação de cadeia em polimerase (PCR) e hibridizações *in situ* (FISH).

Palavras-chave: Satelitoma; satDNA; *Rineloricaria lanceolata*.

#### 5.3.1 Introdução

Grande parte do genoma dos eucariotos apresenta um conjunto de elementos repetitivos e essas sequências podem ser divididas em duas categorias: os elementos transponíveis (TEs), que podem estar dispersos por todo o genoma e as repetições *in tandem*, que incluem as famílias multigênicas ou DNA satélite (satDNA) (YUAN et al., 2018). Os satDNAs são formados por longas matrizes de sequências repetitivas *in tandem*, que estão localizadas comumente na heterocromatina, em regiões pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos. Essas sequências são formadas por famílias que apresentam variações na sua localização, constituição, tamanho da unidade e abundância (RUIZ-RUANO et al., 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017). Um genoma pode apresentar uma coleção diversificada de famílias de satDNA e esse conjunto é denominado “Satelitoma” (RUIZ-RUANO et al., 2016).

As sequências repetitivas vêm sendo associadas a diferentes funções, e essas funções podem estar relacionadas com diferentes papéis, como na estrutura dos



cromossomos e manutenção dos telômeros e centrômeros (PARDUE; DEBARYSHE, 2003; WONG; CHOO, 2004). Além disso, estão envolvidos no processo de replicação, recombinação e expressão gênica (BIET et al., 1999; HAN; BOEKE, 2005; VOLFF, 2006; PEASTON et al., 2004). Adicionalmente, são considerados marcadores citogenéticos essenciais em estudos de evolução, identificação de rearranjos cromossômicos e organização do genoma (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MARTINS, 2007).

Os avanços das técnicas de sequenciamento massivo de nova geração facilitaram o isolamento e a obtenção de sequências de DNA satélites, juntamente com o uso de ferramentas de bioinformática adequadas, contribuíram para a identificação, caracterização e montagem de famílias de satDNAs em espécies consideradas não-modelo. Com isso, utilizando do sequenciamento de bibliotecas de baixa cobertura do genoma, é possível caracterizar coleções inteiras de DNA satélites (NOVÁK et al., 2013; RUIZ-RUANO et al., 2016; UTSUNOMIA et al., 2016).

Em peixes neotropicais os estudos sobre a caracterização de satelitoma foram realizados em *Psalidodon paranae* sendo encontrado 45 famílias de satDNA (SILVA et al., 2017), *Characidium gomese* com 59 famílias de satDNA (SERRANO-FREITAS et al., 2020), *Megaleporinus macrocephalus* com 164 famílias de satDNA (UTSUNOMIA et al., 2019), *Prochilodus lineatus* com 51 famílias de satDNA (STORNIOLI et al., 2021), *Hypostomus ancistroides* com 38 famílias de satDNA e *H. aff. ancistroides* com 18 famílias de satDNA (REIS, 2020).

Nesse panorama, o gênero *Rineloricaria* apresenta um polimorfismo acentuado em seu cariótipo que já foi relatado em diversas espécies do gênero como em *Rineloricaria lanceolata* 2n 45-48 (PORTO et al., 2014), *R. pentamacula* 2n 54-56 (PORTO; PORTELLA-CASTRO, 2011), *R. latirostris* 2n 36-48 (GIULIANO-CAETANO, 1998) e *R. lima* 2n 45-48 (ROSA et al., 2012), com diferentes números diploides e estruturas cromossômicas (TAKAGUI et al., 2014). Entretanto em *R. lima*, foram observados vestígios de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e rDNA 5S juntos em locais de fusão cromossômica (ROSA et al., 2012), sugerindo que essas duas sequências de DNAs repetitivos, poderiam estar atuando como locais de fusão cromossômica.

Contudo, os estudos relacionados a caracterização dessas sequências de DNA repetitivos são limitados para o gênero, com foco em algumas classes de sequências repetitivas. A caracterização desses elementos repetitivos no genoma de *Rineloricaria*, poderão levantar indícios de como essas variações observadas no

gênero surgem. Bem como, os DNA repetitivos frequentemente demonstram seu papel em rearranjos cromossômicos (KALENDAR et al., 2018; SCHNEIDER et al., 2013). Entretanto, grande parte dos estudos com famílias de DNA repetitivos estão relacionados com a origem e evolução de cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (ARTONI et al., 2006; MELO et al., 2017; SILVA et al., 2017). Logo, tem-se a importância de caracterizar o satelitoma de *Rineloricaria lanceolata*, para conhecer *in silico* as famílias de DNAs repetitivos que compõem o genoma da espécie e, posteriormente, validar e localizar por hibridização *in situ* possíveis marcadores cromossômicos de DNA repetitivo que possam estar envolvidos em “hotspots” de rearranjos cromossômicos.

### 5.3.2 Material e métodos

Foi utilizado um espécime de *Rineloricaria lanceolata* coletado no córrego do Onça, afluente do rio Taquari, Bacia do rio Paraguai, no município de Coxim-MS (18° 30' 23,9" S e 54° 40' 39,3" W). Para o sequenciamento do genoma, o DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo com solução salina (NaCl) (BRUFORD et al., 1992), obtido através do fígado de um exemplar de *R. lanceolata*. Após a extração, o material genético obtido foi preparado e enviado para o sequenciamento massivo de nova geração (NGS), na plataforma BGISEQ-500 da BGI (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China) (*paired-end* 2x100pb).

Antes da caracterização, foi realizado uma filtragem de índice de qualidade na biblioteca utilizando o Trimmomatic, selecionando *reads* par a par com Q>20. Posteriormente, foi selecionado aleatoriamente 2x 200.000 *reads* para a clusterização utilizando o TAREAN (NOVÁK et al., 2017). Para a caracterização do satelitoma de *R. lanceolata*, primeiramente foi utilizada a *pipeline Tandem Repeat Analyzer* (TAREAN) (NOVÁK et al., 2017), em seguida foi realizado uma etapa de clusterização pelo RepeatExplorer (NOVÁK et al., 2013), usando como base o protocolo satMiner descrito por Ruiz-Ruano *et al.* (2016). Para realizar a clusterização dos satélites pelo TAREAN, foram utilizadas as opções padrões para uma identificação dos satDNA com alta e baixa confiança. Os satDNA resultantes deste processo foram filtrados utilizando o programa DeconSeq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) e esse processo foi repetido até que não fossem encontrados mais satélites.

Após a mineração dos satDNA, foi realizada análise de abundância e divergência de cada variante utilizando o *software* RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 2017) como também, foi realizada a estimativa de abundância de cada satDNA no genoma com base no número de nucleotídeos alinhados dentro do número de leituras totais. Os satDNA foram nomeados seguindo a protocolo de Ruiz-Ruano *et al.* (2016).

### 5.3.3 Resultados

Na investigação *in silico* do satelitoma de *Rineloricaria lanceolata* via TAREAN e protocolo satMiner após 7 interações, resultaram na descoberta de 40 famílias de satDNA, totalizando 18.460 pares de bases, com o comprimento de unidades repetidas (RUL- "*repeat unit lengths*") variando de 20 a 4715 pb, com 461,5 pb de média (Tabela 3.1). O conteúdo A + T das famílias de satDNAs variou de 36,7% a 70,0% com 58,30% de média e 34 dos satélites possuindo um conteúdo A + T maior que 50%.

Tabela 3.1 - Principais características presentes nos 40 satélites identificados em *R. lanceolata*. RUL: *Repeat unit length* (comprimento da unidade de repetição).

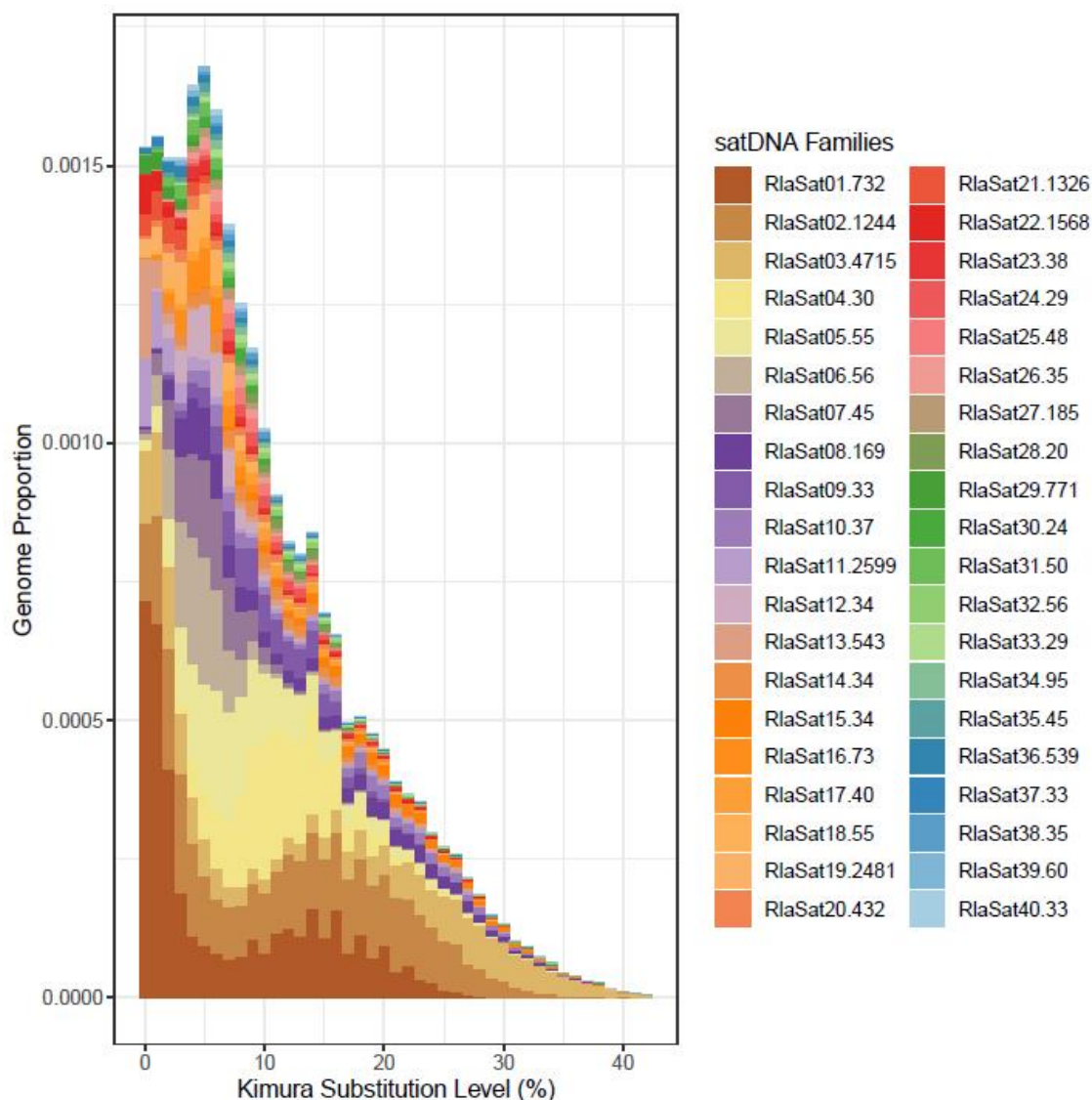
Satélite	RUL	A+T (%)	Abundância	Divergência
RlaSat01-732	732	60,2	0.00396193465347	6.25
RlaSat02-1244	1244	41,5	0.00375989108911	13.48
RlaSat03-4715	4715	39,9	0.00234831386139	17.45
RlaSat04-30	30	36,7	0.00222996039604	11.60
RlaSat05-55	55	60,0	0.00217262376238	9.33
RlaSat06-56	56	62,5	0.00128880891089	5.19
RlaSat07-45	45	57,8	0.0011163029703	6.02
RlaSat08-169	169	53,3	0.00102971881188	12.72
RlaSat09-33	33	75,8	0.000761268316832	10.78
RlaSat10-37	37	64,9	0.000546932673267	15.75
RlaSat11-2599	2599	59,4	0.000532997029703	6.12
RlaSat12-34	34	64,7	0.000493453465347	5.92
RlaSat13-543	543	67,8	0.000396067326733	4.24
RlaSat14-34	34	61,8	0.00039092970297	9.83
RlaSat15-34	34	50,0	0.000389515841584	19.65
RlaSat16-73	73	65,8	0.00035204950495	5.58
RlaSat17-40	40	47,5	0.000303593069307	10.26
RlaSat18-55	55	56,4	0.000296237623762	5.64

Tabela 3.1 - Principais características presentes nos 40 satélites identificados em *R. lanceolata*. RUL: Repeat unit length (comprimento da unidade de repetição).

(Conclusão)

<b>Satélite</b>	<b>RUL</b>	<b>A+T (%)</b>	<b>Abundância</b>	<b>Divergência</b>
RlaSat19-2481	2481	60,7	0.000289788118812	5.27
RlaSat20-432	432	58,8	0.000270736633663	10.27
RlaSat21-1326	1326	61,3	0.000237638613861	2.96
RlaSat22-1568	1568	60,5	0.000216257425743	7.35
RlaSat23-38	38	47,4	0.000206631683168	9.56
RlaSat24-29	29	58,6	0.000197718811881	10.47
RlaSat25-48	48	62,5	0.000191742574257	8.87
RlaSat26-35	35	65,7	0.00015214950495	7.61
RlaSat27-185	185	54,1	0.000148872277228	9.14
RlaSat28-20	20	65,0	0.000147112871287	13.89
RlaSat29-771	771	60,7	0.000137227722772	6.09
RlaSat30-24	24	58,3	0.000135092079208	7.88
RlaSat31-50	50	70,0	0.000134434653465	4.82
RlaSat32-56	56	55,4	0.000134118811881	15.03
RlaSat33-29	29	51,7	0.000124703960396	11.23
RlaSat34-95	95	63,2	0.000101823762376	8.56
RlaSat35-45	45	55,6	0.000099601980198	6.05
RlaSat36-539	539	60,5	0.00000857673267327	4.94
RlaSat37-33	33	69,7	0.00000850594059406	7.37
RlaSat38-35	35	48,6	0.0000083203960396	10.38
RlaSat39-60	60	63,3	0.00000775178217822	6.33
RlaSat40-33	33	54,5	0.00000665900990099	7.94

Figura 3.1 - Gráfico evidenciando os perfis de abundância e divergência dos satélites extraídos do genoma de *R. lanceolata*.



Fonte: O autor.

A busca por similaridade das famílias de satDNA realizado no banco de dados NCBI (*National Library of Medicine*) e BLAST, revelou para os 40 satélites encontrados no satelitoma de *Rineloricaria lanceolata* que 24 satDNA não apresentam qualquer similaridade com o banco de dados, sendo totalmente novos. Visto que essas sequências carecem de outras informações na literatura, se faz necessário o uso de abordagens *in silico* e localização *in situ* pela técnica de FISH para a sua caracterização e validação. Os outros 16 satélites apresentaram algum grau de similaridade com outros organismos, e somente a sequência RlaSat13 mostrou similaridade com os genomas mitocondriais parciais de 94,96% *Rineloricaria* cf. *lanceolata*, 84,99% *Rineloricaria* sp. e 80,69% *Loricaria cataphracta*.

#### 5.3.4 Discussão

Utilizando o sequenciamento de Nova Geração aliado as ferramentas de bioinformática, encontramos 40 famílias de satDNA no genoma de *R. lanceolata*, que é a primeira espécie do gênero *Rineloricaria* a ter a caracterização dos seus satélites. As espécies de peixes caracterizadas até o momento em sua maioria pertencem a ordem Characiformes (SERRANO-FREITAS et al., 2020; SILVA et al., 2017; STORNIOLI et al., 2021; UTSUNOMIA et al., 2019).

O RUL encontrado através das ferramentas de bioinformática para as 40 famílias de satDNA em *R. lanceolata* apresentam uma mediana de 461,5 pb sendo consideravelmente maior, quando comparado a espécies de gafanhotos *Locusta migratoria* 158 pb, *Eumigus monticola* 97 pb (RUIZ-RUANO et al., 2016) e *Astyanax paranae* 59 bp (SILVA et al., 2017). Presume-se, com esta análise que pode haver uma tendência para diferenças de comprimento desses satDNA, entre os diferentes tipos de organismos. (RUIZ-RUANO et al., 2016).

Em *R. lanceolata*, foram encontrados mais satélites curtos do que longos, ao contrário do que foi observado por Ruiz-Ruano et al., 2016, embora em outros peixes neotropicais já tenham sido observados também um número maior de satélites curtos (SILVA et al., 2017; STORNIOLI et al., 2021; UTSUNOMIA et al., 2019). Em *R. lanceolata*, satDNA mais longos possuem um viés maior para conteúdo A+T, assim como observado em *A. paranae* (SILVA et al., 2017).

O gênero *Rineloricaria* carece de dados de satelitomas, entretanto para sequencias repetitivas a maioria dos estudos para gênero estão focados em caracterizar e localizar por Hibridização *in situ* sequencias de rDNA 5S e 18S (PRIMO et al., 2017; PORTO et al., 2014, 2011; ROSA et al., 2012) e alguns estudos sobre o envolvimento de elementos transponíveis em rearranjos cromossômicos como *Tc1/Mariner* (PRIMO et al., 2018) e TE *hAT* (GLUGOSKI et al., 2018). Mas, pouco se sabe sobre a identificação de outras sequencias repetitivas, que possam estar envolvidas em mecanismos que levam à eventos de quebras e rearranjos cromossômicos em loricariídeos. Desta forma, o conhecimento do satelitoma da espécie *R. lanceolata* representa um grande avanço para os estudos sobre satDNA em Loricariidae.

### 5.3.5 Conclusões

Nossos resultados apresentam a primeira caracterização de famílias de satDNA para o gênero *Rineloricaria*, que até o momento careciam deste tipo de informação. Contudo, baseado em nosso objetivo de prospecção de satélites para *R. lanceolata* na intenção de localizar possíveis marcadores cromossômicos, que estejam envolvidos em rearranjos cromossômicos, e com os resultados obtidos, propomos a confecção de *primers*, para os satélites mais abundantes encontrados no genoma da espécie, para validação futura por reação de cadeia em polimerase (PCR) e Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH). Através da realização desses mecanismos de validação, será possível uma melhor compreensão sobre o polimorfismo cariotípico observado no gênero. Além disso, a obtenção de mais bibliotecas de sequências de satDNA da espécie são necessárias para uma melhor prospecção de outros elementos repetitivos que possam estar associados aos eventos de modificação cariotípica.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Rineloricaria* apresenta polimorfismos que caracterizam o gênero. Embora a variação cariotípica apresentada seja comum aos loricarídeos, sendo extremamente diversos cariotipicamente. Contudo, algumas questões sobre o surgimento dessas variações e como elas conseguem se manter nas populações ainda não são compreendidas. As técnicas e métodos computacionais, utilizadas neste trabalho auxiliaram a descobrir sequências de satDNA que podem estar envolvidas nesses rearranjos cromossômicos apresentados no grupo.

Entretanto, é necessário mais análises com marcadores citogenéticos para testar a relação desses satDNA com os rearranjos cromossômicos no gênero. Além disso, análises meióticas para compreender como esses rearranjos se portam diante o emparelhamento dos homólogos, formando gametas viáveis e balanceados ou não. Desse modo, os resultados obtidos até o momento são essenciais para as questões complexas que ainda cercam o grupo.



## REFERÊNCIAS

AFGAN, E. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W537-W544, 2018.

ALBERT, J. S.; PETRY, P.; REIS, R. E. Major biogeographic and phylogenetic patterns. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, v. 1, p. 21-57, 2011.

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

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, 290, 457 – 465, 1981.

ARMBRUSTER, J. W. The species of the Hypostomus cochliodon group (Siluriformes: Loricariidae). **Magnolia Press**, 2003.

ARTONI, R.F. et al. Inferring diversity and evolution in fish by means of integrative molecular cytogenetics. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

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, n. 1, 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, n. 3, p. 209-214, 1999.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, n. 3, p. 201-210, 2001.

ARTONI, R. F. et al. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from south Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 19, p. 393-401, 2009.

AVISE, J. C. et al. Phylogeography: the history and formation of species. **Harvard university press**, 2000.

BIET, E.; SUN, J.S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 596-600, 1999.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521-524, 2006.

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

CARDUCCI, F. et al. Mobile elements in ray-finned fish genomes. **Life**, v. 10, n. 10, p. 221, 2020.

CIUS, A. et al. Evidência de novas espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) na bacia do rio Iguaçu, Paraná utilizando dados citogenéticos e de DNA barcoding. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1supl, p. 165.

COVAIN, R. et al. Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 492-517, 2016.

ERRERO-PORTO, F. **Estudo citogenético e de polimorfismo cromossômico em populações do gênero *Rineloricaria* (Loricariidae, Siluriformes) da bacia do rio Parana**. 2007. Dissertação. - Universidade Estadual de Maringá, 2007.

FRICKE R, ESCHMEYER W.N, VAN DER LAAN R. editors. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso em: 24 jun 2020

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.

GIULIANO–CAETANO L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 1998.

GLUGOSKI, L. et al. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, v. 650, p. 49-54, 2018.

HAN, J. S.; BOEKE, J. D. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? . **Bioessays**, v. 27, n. 8, p. 775-784, 2005.

ISBRUCKER, I.J.H. et al. *Rineloricaria heteroptera*, a new species of mailed catfish from Rio Amazonas near Manaus, Brazil (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). 1976.

KALENDAR, R.; AMENOV, A.; DANİYAROV, A. Use of retrotransposon-derived genetic markers to analyse genomic variability in plants. **Functional Plant Biology**, v. 46, n. 1, p. 15-29, 2018.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 1-28, 2012.

LUJAN, N. K. et al. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 82, p. 269-288, 2015.

MAIA, T.P de A. et al. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyological research**, v. 57, n. 2, p. 209-213, 2010.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in genetics**, v. 24, n. 3, p. 133-141, 2008.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, v. 421, p. 452, 2007.

MELO, B. F. et al. The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 625-636, 2013.

NELSON, J. S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

NOVÁK, P. et al. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792-793, 2013.

PARDUE, M.; DEBARYSHE, P. G. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. **Annual review of genetics**, v. 37, n. 1, p. 485-511, 2003

PEASTON, A. E. et al. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Developmental cell**, v. 7, n. 4, p. 597-606, 2004.

PORTO, F. E.; DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. **Ichthyological research**, v. 58, n. 3, p. 225-231, 2011.

PORTO, F. E. et al. Polymorphisms of the nucleolus organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the upper Paraguay River basin indicate an association with transposable elements. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 1627-1634, 2014.

PRIMO, C. C. et al. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 161-168, 2017.

PRIMO, C. C. et al. Chromosome mapping and molecular characterization of the *Tc1/Mariner* element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

REIS, D. A. R. **Contribuições da genômica em estudos evolutivos no complexo de espécies crípticas *Hypostomus ancistroides*** (Siluriformes, Loricariidae). Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p.54, 2020.

ROCHA-REIS, Dinaíza Abadia et al. The complete mitochondrial genome of two armored catfish populations of the genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 421, 2020.

RODRIGUES, P. H. de. M. et al. Chromosomal and genomic dynamics of satellite DNAs in Characidae (Characiformes, Teleostei) Species. **Zebrafish**, v. 16, n. 4, p. 408-414, 2019.

ROSA, K. O. et al. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or

telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, n. 3, p. 739-749, 2012.

RUIZ-RUANO, F. J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

SCHNEIDER, C. H. et al. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 201-214, 2013.

SCHWARZACHER, T. et al. **Practical in situ hybridization**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000.

SERRANO-FREITAS, É. A. et al. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 1, p. 195-207, 2020.

SILVA, D. M.Z de A. et al. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

SONG, F. et al. Capturing the phylogeny of Holometabola with mitochondrial genome data and Bayesian site-heterogeneous mixture models. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 1411-1426, 2016.

STORNIOLI, J. H. F. et al. The B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) are highly enriched in satellite DNAs. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1527, 2021.

TAKAGUI, F. H. et al. The importance of pericentric inversions in the karyotypic diversification of the species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 300-305, 2014.

TAKAGUI, F. H. et al. Chromosomal diversity of thorny catfishes (Siluriformes-Doradidae): a case of allopatric speciation among Wertheimerinae species of São Francisco and Brazilian Eastern Coastal Drainages. **Zebrafish**, v. 16, n. 5, p. 477-485, 2019.

TAKAGUI, F. H. et al. Unrevealing the Karyotypic Evolution and Cytotaxonomy of Armored Catfishes (Loricariinae) with Emphasis in *Sturisoma*, *Loricariichthys*, *Loricaria*, *Proloricaria*, *Pyxiloricaria*, and *Rineloricaria*. **Zebrafish**, v. 17, n. 5, p. 319-332, 2020.

TOLLIS, M.; BOISSINOT, S. The evolutionary dynamics of transposable elements in eukaryote genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 68-91, 2012.

UTSUNOMIA, R. et al. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150573, 2016.

UTSUNOMIA, R. et al. Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, v. 1, p. 1-12, 1998.

VERA-ALCARAZ, H. S.; PAVANELLI, C. S.; ZAWADZKI, C. H. Taxonomic revision of the *Rineloricaria* species (Siluriformes: Loricariidae) from the Paraguay River basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 2, p. 285-311, 2012.

VENTURELLI, N. B. et al. Cytogenetic markers to understand chromosome diversification and conflicting taxonomic issues in *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from Rio Grande do Sul coastal drainages. **Biologia**, v. 76, n. 9, p. 2561-2572, 2021.

VIEIRA, G. A.; PROSDOCIMI, F. Accessible molecular phylogenomics at no cost: obtaining 14 new mitogenomes for the ant subfamily Pseudomyrmecinae from public data. **PeerJ**, v. 7, p. e6271, 2019.

VOLFF, J.N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. **Bioessays**, v. 28, n. 9, p. 913-922, 2006.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

WONG, L. H.; CHOO, K.H. A.. Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. **Trends in genetics**, v. 20, n. 12, p. 611-616, 2004.

YUAN, Z. et al. Comparative genome analysis of 52 fish species suggests differential associations of repetitive elements with their living aquatic environments. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2018.

## **ANEXOS**

## ANEXO A - LICENÇA AMBIENTAL PARA COLETA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

<b>Número: 15115-1</b>		<b>Data da Emissão: 02/04/2008 10:47</b>
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

### Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Taxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 85979796



Página 2/2



## ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

01/12/2021 11:55

SEI/UEPG - 0769342 - Carta



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

### CARTA

### PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### *CARTA DE APROVAÇÃO*

Processo/ Process CEUA: 0769342/2021

Protocolo UEPG: 21.000060874-2

**Título:** Citogenética e genômica de peixes neotropicais: investigando questões evolutivas, funcionais e aplicadas à conservação das espécies

**Interessado:** Roberto Ferreira Artoni

**e-mail:** rfartoni@gmail.com

**Data de Entrada:** 29/10/2021

**Resultado:** Aprovado

#### Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de peixes teleósteos pertencentes aos grupos taxonômicos: *Astyanax* ou *Psalidodon* (lambaris); *Colossoma macropomum* (tambaqui); *Piaractus mesopotamicus* (pacu); *Loricariidae* (cascudos) dos gêneros *Ancistrus*, *Hypancistrus*, *Rhineloricaria* e *Steindachneridium melanoderdatum* (suruvi-do-Iguaçu), sendo 360 peixes por espécie (180 machos e 180 fêmeas), para a execução desse projeto.

01/12/2021 11:55

SEI/UEPG - 0769342 - Carta

Ponta Grossa, 30 de novembro de 2021

Profa. Dra. Luciana da Silva Leal Karolewski  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG



Documento assinado eletronicamente por Luciana da Silva Leal Karolewski, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP, em 30/11/2021, às 19:34, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 0769342 e o código CRC 5D28EB8F.

21.000060874-2

0769342v5

## **ANEXO C - PREPARAÇÕES DE CROMOSSOMOS A PARTIR DA NADADEIRA (Kalous et al., 2010)**

Solução 1 (Stock): 7,48g NaCl + 0,18g KCl + 0,2g CaCl<sub>2</sub> + 0,016g NaHCO<sub>3</sub> em 1 lt de H<sub>2</sub>O

Solução 2: 14,3 ml de solução 1 + 85,7ml of H<sub>2</sub>O + 0,025g de colchicina

1. Corte a nadadeira (corte reto). Manter o peixe em aquário por alguns dias, até que você visualizar a regeneração incompleta da nadadeira, pois é necessário que as células estejam em divisão. Isso depende da espécie estudada, 4 dias, 7 dias, 15 dias e no caso do presente estudo 18 dias.

2. Depois de uma regeneração incompleta, cortar a nadadeira novamente para obter os cromossomos.

3. Coloque a nadadeira em placa de Petri e adicione 5 ml ou mais da solução 2 (a nadadeira deve ser completamente coberta); e mantenha por 2 h na estufa em 30° C.

4. Após 2 h, adicionar 5 ml de fixador (Metanol 3: 1 de ácido acético) e deixe na geladeira por 25 min a 4° C.

5. Remover a solução com pipeta Pasteur de vidro e adicionar 5 ml de fixador e deixar na geladeira por 25 min a 4° C. Repetir o passo 5 por 3 vezes.

6. A última fixação (5 ml de fixador) pode ser armazenada na geladeira a 4° C por 25 minutos ou durante a noite, se necessário, e depois iniciar o próximo passo.

7. Preparar 50% de ácido acético/água e colocar a nadadeira na placa de Petri. Colocar 40 µl de ácido acético sobre a nadadeira e dissolver o tecido com uma pinça. Depois remover o líquido com uma pipeta e colocar em tubos tipo Eppendorf. Mantenha os tubos em gelo a 0 ° C, e realizar o gotejamento no mesmo dia.

8. Pegar 50 µl para fazer gotejamento. Colocar o volume sobre uma lâmina aquecida em placa a 37° C, aspirar o material a assim proceder várias vezes sobre diferentes pontos da lâmina.

## ANEXO D - EXTRAÇÃO DE DNA. PROTOCOLO DESENVOLVIDO POR DAVID VIEITES – U.C. BERKELEY

Soluções:

Tampão de extração\*

ddH<sub>2</sub>O estéril

SDS 10%

Proteinase K 20mg/mL

Isopropanol

Etanol 80%

1. Com auxílio de uma pinça e um bisturi, corte o tecido em cima de um Parafilm apoiado em uma placa de petri. Use água sanitária e álcool para esterilizar a pinça e o bisturi cada vez que trocar de tecido. Adicione o tecido picado a um tubo de 1,5mL.

2. Adicione a solução de lise aos tubos (410µL de buffer de extração + 80µL SDS 10% + 15µL proteinase K (20 µ/µL). (Opcional: + 2µL Rnase A). OBS: Se for deixar os tecidos digerindo overnight, acrescentar apenas 10µL de proteinase K.

3. Incubar a 55°C por aproximadamente 2 horas (vortexar a cada 10 minutos) até a digestão do tecido.

4. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos

- Transferir o sobrenadante (líquido) para um novo tubo de 1,5mL

- Adicionar 180 µL NaCl (5M)

- Inverter o tubo 50 vezes para homogeneizar. Um precipitado branco será formado.

\*\* Se a coloração do precipitado não for branca, o reagente NaCl está velho.

5. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos

- Transferir o sobrenadante para um novo tubo (manter em um bloco resfriado) e adicionar 1.000µL de isopropanol gelado;

- Misturar gentilmente.

6. Centrifugar a 13.000 rpm por 7 minutos

- Descartar sobrenadante

- Adicionar 250  $\mu$ L etanol 80%.
- Inverter 50 vezes para misturar

7. Repetir o passo n<sup>o</sup>6

8. Centrifugar a 13.000 rpm por 7 minutos

- Descartar sobrenadante
- Remover álcool completamente no banho à 50-55°C

9. Resuspender o DNA em 50-100  $\mu$ L de água ultrapura ou tampão TE. OBS: Sem pellet colocar 25  $\mu$ L. Com muito pellet colocar até 200 $\mu$ L.

10. Deixar na geladeira *overnight* (4°C) para diluir a pellet.

**\*Tampão (Buffer) de Extração (Autoclavar):**

1M Tris ( pH= 8) 0.5mL

5M NaCl 1.0mL

0.5M EDTA (pH= 8) 1.0mL

ddH<sub>2</sub>O estéril 47.5mL