



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

---

**SÍTIOS CROMOSSÔMICOS INSTÁVEIS E DIVERSIFICAÇÃO**  
**CARIOTÍPICA EM LORICARIIDAE: ANÁLISE CITOGENÉTICA**  
**E MOLECULAR**

---

**Larissa Glugoski**

**SÃO CARLOS**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**Larissa Glugoski**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

**Orientador:** Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho

**Coorientador:** Prof. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

**SÃO CARLOS**

**2022**



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Larissa Glugoski, realizada em 15/07/2022.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar)

Profa. Dra. Viviane Nogaroto (UEPG)

Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano (UEL)

Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi (UNESP)

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi (UFSCar)

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido (Unioeste)

Dedico este trabalho a todos aqueles  
que de alguma forma, contribuíram  
para a sua realização

**A realização deste estudo foi possível devido:**

À Universidade Federal de São Carlos, ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e aos laboratórios de Citogenética de Peixes (UFSCar), de Biologia Cromossômica: Estrutura e Função (UEPG);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto: “Pontos de quebras de DNA e rearranjos cromossômicos em peixes da família Loricariidae (Teleostei, Siluriformes): Uma abordagem citogenética e molecular” Processo: FAPESP 2017/24695-9;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto: “Análise da diversidade cariotípica em Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes)”;

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma permitiram que este trabalho se concretizasse, em especial:

Ao meu querido orientador professor Dr. Orlando Moreira-Filho, por todos os ensinamentos, pela disposição em me receber em seu laboratório, pelas inúmeras coletas, pela ajuda em bancada. Obrigada pela confiança em meu trabalho, pela compreensão, e por estar sempre presente quando precisei.

A minha coorientadora professora Dra. Viviane Nogaroto Vicari e ao professor Dr. Marcelo Vicari por me acolher no laboratório desde a graduação. Obrigada pelos ensinamentos, confiança, paciência, pelos momentos de descontração e por estarem sempre presentes.

A todos os professores e colegas do laboratório de Citogenética de Peixes da UFSCar, que me acolheram muito bem e por estarem dispostos a ajudar sempre que precisei. Especialmente ao Francisco Sassi e ao Ezequiel pelas coletas e preparações citogenéticas e aos professores Dr. Marcelo de Bello Cioffi e Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo pelos seus ensinamentos e contribuições para o trabalho.

Aos técnicos de laboratório Luiz Henrique da Silva e Antônio Aparecido Donizetti da Silva pelo suporte com as coletas.

À minha grande amiga Geize Deon, companheira de laboratório desde o mestrado. Muito obrigada pela sua amizade, apoio, companheirismo, por estar sempre ao meu lado nos momentos felizes e nos momentos em que nada parecia dar certo. Obrigada por tudo.

Aos colegas do laboratório de Biologia Cromossômica Estrutura e Função da UEPG: Caroline, Daiane, Fernanda, Lucas, Michelle, Rhuan, Sebastião, Stephane e Viviane. Especialmente ao Matheus Azambuja por toda ajuda com as análises de Bioinformática e pelos momentos de descontração.

Ao Laboratório de Biologia Celular, Molecular e do Desenvolvimento da UEPG, especialmente ao professor Dr. José Rosa Gomes e a professora Dr. Maria Albertina e ao Laboratório de Microbiologia em especial ao professor Dr. Marcos Pillegi por todo auxílio prestado.

Aos meus familiares, especialmente à minha mãe Janete e aos meus irmãos Andreina e Richard, por todo apoio incondicional, pela paciência e compreensão e por sempre acreditarem, incentivarem e me apoiarem em todas as minhas decisões. Ao meu pai José Glugoski (*in memoriam*), eu sei que tudo deu certo graças a sua ajuda aí de cima, espero ter lhe dado orgulho da pessoa e profissional que me tornei. Amo vocês!

Agradeço ao meu namorado Michael Neves por todo apoio, companheirismo, por passar finais de semana e feriados comigo no laboratório, por estar sempre ao meu lado dizendo que tudo vai dar certo. E pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Te amo!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

“O cientista não é o homem que fornece as  
verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras  
perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)



## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**Larissa Glugoski** possui graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Durante a graduação participou de dois projetos de Iniciação Científica, o qual resultou na publicação de dois artigos científicos, além de projetos de extensão no Herbário da UEPG que resultou em uma publicação de Capítulo de livro intitulado “Epífitas Vasculares”. Durante a graduação, realizou estágio no laboratório de Citogenética e Evolução e Genética Evolutiva sob supervisão do professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari, onde desenvolveu habilidades em técnicas de Citogenética Clássica e Molecular. Em 2015, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como bolsista CAPES, sob orientação da prof. Dra. Viviane Nogaroto Vicari desenvolvendo o projeto intitulado “Análise de marcadores cromossômicos em *Rineloricaria* (Siluriformes:Loricariidae) com ênfase na diversidade cariotípica”. Ingressou no doutorado em 2017 pelo Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho e coorientação da Prof. Dra. Viviane Nogaroto Vicari. Durante a carreira acadêmica, participou de seis projetos de pesquisa, ministrou cursos de curta duração e foi coorientadora de dois projetos de Iniciação Científica. Participou de diversos eventos nacionais com apresentações de trabalhos na área. Até o momento, publicou 10 artigos científicos (como autora/co-autora), além de dois artigos que estão em processo de submissão, relacionados a sua tese. Devido sua experiência em técnicas de Biologia Molecular, atua como Bióloga no laboratório de Diagnóstico Molecular (UEPG) realizando testes de RT-PCR para diagnóstico de COVID, além de participar do projeto intitulado “Identificação de variantes SARS-CoV-2 e correlação com dados de pacientes internados com Covid-19 no Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais (HURCG) da UEPG”. Atualmente, cursa especialização em Citogenética Humana pelo Instituto de Pesquisa e Educação em Saúde de São Paulo (IPESP) (2022-2023).

# SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 Ordem Siluriformes: aspectos gerais .....	21
1.2 Família Loricariidae: caracterização e descrição citogenética.....	21
1.2.1 Subfamília Loricariinae.....	23
1.2.1.1 Gênero <i>Rineloricaria</i> .....	23
1.2.2 Subfamília Hypostominae.....	24
1.2.2.1 Gênero <i>Ancistrus</i> .....	25
1.3 DNAs repetitivos.....	26
1.3.1 DNAs repetitivos <i>in tandem</i> .....	27
1.3.2 Elementos repetitivos dispersos.....	33
1.4 Sequências repetitivas e Rearranjos cromossômicos.....	34
<b>2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
3.1 Coleta do material biológico.....	41
3.2 Extração de DNA .....	45
3.3 Preparação dos cromossomos mitóticos.....	45
3.4 Detecção da heterocromatina constitutiva.....	46
3.5 Detecção da região organizadora de nucléolo (RON) .....	46
3.6 Obtenção das sondas.....	47
3.6.1 Sondas de DNAr 5S, DNAr 18S e TE <i>hAT</i> .....	47
3.6.2 Sondas de microssatélites e minissatélite (TTAGGG) <sub>n</sub> .....	47
3.7 Mapeamento cromossômico.....	48
3.7.1 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	48
3.7.2 Análises cariotípicas.....	49
3.8 Clonagem das sequencias de DNAs repetitivos.....	49
3.8.1 Ligação de fragmentos de DNA a vetores de clonagem.....	49
3.8.2 Transformação de bactérias competentes e seleção de colônias recombinantes .....	49
3.8.3 Mini-preparação plasmidial .....	50
3.9 Sequenciamento e análise das sequências de DNA .....	50
3.10 Sequenciamento Next Generation e análise de sequencias repetitivas.....	51
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>Capítulo 1</b> - Comparative cytogenetic analyses in <i>Ancistrus</i> species (Siluriformes: Loricariidae) .....	54
1. INTRODUCTION.....	55
2. MATERIAL AND METHODS.....	58

2.1 Species analyzed.....	58
2.2 Conventional cytogenetic procedures.....	58
2.3 DNA extraction and isolation of repetitive DNAs.....	58
2.4 Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) .....	59
3. <b>RESULTS</b> .....	60
3.1 Karyotypic description.....	60
3.2 <i>In situ</i> localization of rDNAs and telomeric sites.....	60
3.3 Analysis of 5S rDNA sequences.....	61
4. <b>DISCUSSION</b> .....	62
ACKNOWLEDGMENTS.....	65
TABLE AND FIGURES.....	66
<b>Capítulo 2</b> - Enriched tandemly repeats in chromosomal fusion points of <i>Rineloricaria latirostris</i> (Boulenger, 1900) (Siluriformes: Loricariidae).....	70
1. <b>INTRODUCTION</b> .....	71
2. <b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	74
2.1 Sampling.....	74
2.2 Next-generation sequence and RepeatExplorer analyzes.....	74
2.3 Chromosome preparation.....	75
2.4 Probes and Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) .....	75
2.5 Karyotypic analyses.....	75
3. <b>RESULTS</b> .....	77
3.1 Microsatellites genomic composition.....	77
3.2 Karyotype and <i>in situ</i> localization.....	78
4. <b>DISCUSSION</b> .....	81
TABLES AND FIGURES.....	87
<b>Capítulo 3</b> - Caracterização do sítio de fusão Robertsoniana em <i>Rineloricaria pentamaculata</i> (Siluriformes: Loricariidae): envolvimento de sequências rDNA 5S e satélites.....	101
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	102
2. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	105
2.1 Local de amostragem e citogenética clássica.....	105
2.2 Síntese das sondas e Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	105
3. <b>RESULTADOS</b> .....	107
4. <b>DISCUSSÃO</b> .....	109

TABELAS E FIGURAS.....	113
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>140</b>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1:** Representação esquemática do gene que codifica o RNAr 5S (em vermelho, com 120 pb) intercalado com uma unidade de espaçador não transcrita (em amarelo, NTS) de tamanho variável, indicando a localização do box A (verde), elemento intermediário (alaranjado), box C (azul) e TATA-like (roxo). Adaptado de MARTINS; WASKO, 2004; GOUVEIA *et al.*, 2016.....31

### MATERIAL E MÉTODOS

**Figura 2:** Foto de exemplares de *Ancistrus* e *Rineloricaria* analisadas no presente estudo: (A) *Ancistrus aguaboensis* (Fonte: FROESE; PAULY, 1999), (B) *Ancistrus cf. multispinis* (C) *Rineloricaria latirostris* e (D) *Rineloricaria pentamaculata* (Fonte: arquivo pessoal). \* imagem de indivíduo sem identificação do sexo.....43

**Figura 3:** Mapa hidrográfico do Brasil com destaque para as bacias hidrográficas (bacia dos Rios Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná) e para os pontos de coleta das espécies analisadas no presente estudo. Mapa criado utilizando-se o ArcGis 10.5 e Adobe Photoshop CC 2020.....44

### CAPÍTULO 1

**Figure 1:** Karyotypes of *Ancistrus aguaboensis* (a–b) and *Ancistrus cf. multispinis* (c–d) submitted to Giemsa staining (a–c) and C-banding (b–d). The chromosomes pairs with NORs sites are evidenced in the figure details (boxes). Bar = 10  $\mu$ m.....68

**Figure 2:** Karyotypes of *Ancistrus aguaboensis* (a–b) and *Ancistrus cf. multispinis* (c–d) submitted to FISH using 5S rDNA, 18S rDNA and (TTAGGG)<sub>n</sub> probes. In (a–c), 5S rDNA (in red) and 18S rDNA (in green) sites; in (b–d), terminal red markers evidenced (TTAGGG)<sub>n</sub> sites. Bar = 10  $\mu$ m.....69

### CAPÍTULO 2

**Figure 1:** Repetitive DNA composition and abundance based on RepeatExplorer analysis in *R. latirostris* (karyomorph 2n = 46 chromosomes) genome. In (a) percentage of repetitive DNA classes conducted with RepeatExplorer. In (b) percentages of more frequent TEs superfamilies versus total TEs in the *R. latirostris* RepeatExplorer analysis.

In (c) percentages of more frequent microsatellites versus total of SSR identified in the *R. latirostris* RepeatExplorer analysis.....88

**Figure 2:** Karyotype of *R. latirostris* from Laranjinha river (karyomorph  $2n = 46$  chromosomes). In (a) Giemsa; (b) C-banding; (c) double FISH with 18S rDNA and (TTAGGG)<sub>n</sub> probes; (d) double FISH with *hAT* and 5S rDNA probes; and (e-k) FISH using microsatellite or homopolymers (A)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CAT)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GAG)<sub>10</sub>, and (GAA)<sub>10</sub>, respectively. Barr = 10  $\mu$ m.....89

**Figure 3:** Karyotype of *R. latirostris* from Piumhi river (karyomorph  $2n = 48$  chromosomes). In (a) Giemsa; (b) C-banding, (c) double FISH with 18S and (TTAGGG)<sub>n</sub> probes; (d) double FISH with *hAT* and 5S rDNA probes; and (e-k) FISH using microsatellite or homopolymers (A)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CAT)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GAG)<sub>10</sub>, and (GAA)<sub>10</sub>, respectively. Barr = 10  $\mu$ m.....90

**Figure 4:** Representative idiograms of *R. latirostris* (karyomorphs  $2n = 46$  and  $2n = 48$ ) showing repetitive DNAs chromosomal location. Scattered repetitive DNA signals were not represented. In the karyomorph  $2n = 46$ , the metacentrics 1, 2, and 3 were originated by Rb-fusions. In the karyomorph  $2n=48$ , the Rb-fusions are less evident, but it was suggested that metacentrics 1 and 2 could be originated from chromosome fusions.....91

### CAPÍTULO 3

**Figura 1:** Cariótipo A ( $2n = 56$ ) de *R. pentamaculata*. Em (A) coloração convencional por Giemsa; (B) bandamento C; (C) dupla FISH com as sondas de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho); (D-I) localização *in situ* das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, respectivamente. Barra = 10  $\mu$ m.....114

**Figura 2:** Cariótipo B ( $2n = 55$ ) de *R. pentamaculata*. Em (A) coloração convencional por Giemsa; (B) bandamento C; (C) dupla FISH com as sondas de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho); (D-I) localização *in situ* das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, respectivamente. Na caixa, o cromossomo metacêntrico oriundo de fusão Rb a partir dos braços longos dos cromossomos 15 e 18. \* ausência de um cromossomo homólogo. Barra = 10  $\mu$ m.....115

**Figura 3:** Cariótipo C ( $2n = 54$ ) de *R. pentamaculata*. Em (A) coloração convencional por Giemsa; (B) bandamento C; (C) dupla FISH rDNA com as sondas de 18S (verde) e 5S (vermelho); (D-I) localização *in situ* das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (A)<sub>n</sub>,

(CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, respectivamente. Na caixa, o par metacêntrico oriundo de fusão Rb a partir dos braços longos dos cromossomos 15 e 18. \*\* ausência do par cromossômico. Barra = 10 μm.....116

**Figura 4:** Duplas FISH com as sondas (CA)<sub>15</sub>/rDNA 5S e (GA)<sub>15</sub>/rDNA 5S nos cariótipos A, B e C de *R. pentamaculata*. São mostrados os pares cromossômicos portadores dos sítios rDNA 5S. No cariótipo A, os pares 15 e 18 estão representados pelos homólogos. No cariótipo B, é visualizado um acrocêntrico 15, um acrocêntrico 18, e um cromossomo metacêntrico com correspondências de sinais microssatélites CA e GA entre seu braço longo e o acrocêntrico 15, e entre o braço curto e o acrocêntrico 18. Já no cariótipo C, nenhum acrocêntrico dos pares 15 e 18 são observados na forma livre, sendo esses correspondentes aos braços longo e curto do par metacêntrico oriundo de fusão. Barra = 10 μm.....117

## LISTA DE TABELAS

### MATERIAL E MÉTODOS

**Tabela 1:** Relação das espécies de Loricariidae analisadas neste estudo, bem como a sua descrição citogenética e locais de coleta. 2n = número diploide; NF = número fundamental; ♀ = número de fêmeas; ♂ = número de machos.....42

### CAPÍTULO 1

**Table 1:** Review of available *Ancistrus* cytogenetic data. “Unknown” means that the data was not available in the original manuscript. NOR: Nucleolar Organizer Region; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric; a: acrocentric; FN: Fundamental number. \*one member of the homologous pairs with FISH markers.....66

### CAPÍTULO 2

**Table 1.** Recognition possibilities between the probe and chromosomal microsatellite locus in six frames. The same probe could match the chromosomal DNA in three positive frames during the hybridization process due to slippage or mismatched base pairs. In this process, the same probe could recognize six distinct microsatellite loci.....87

**Table S1.** Classification and proportion of the Illumina reads submitted to RepeatExplorer analysis.....92

**Table S2.** Classification and proportion of distinct types/superfamilies of TEs over the total of TEs in RepeatExplorer analysis in *R. latirostris*.....93

**Table S3.** Repeat unit motifs and proportion of different microsatellites over a total in RepeatExplorer analysis in *R. latirostris*.....95

**Table S4.** Details of repeats composition in RepeatExplorer clusters possessing 5S rRNA, 45S rRNA, and DNA transposon *hAT*.....96

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Análise da organização cariotípica e frequência dos cariótipos A, B e C na população de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande. N: número de indivíduos analisados. 2n: número diploide; FN: número fundamental; m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; st/a: subtelocêntrico/ acrocêntrico. \* apenas um dos homólogos apresentando o sítio rDNA 5S.....113



## LISTA DE ABREVIACOES

<b>2n</b>	Número diploide
<b>a</b>	Cromossomo acrocêntrico
<b>CL</b>	Cluster
<b>DNA<sub>r</sub></b>	DNA ribossômico
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
<b>DSBs</b>	Pontos de quebras da dupla fita <i>Double Strand Breaks</i>
<b>DT</b>	Telmeros não funcionais <i>Dysfunctional telomeres</i>
<b>dUTP</b>	<i>Deoxyuridine Triphosphate</i>
<b>EBRs</b>	Ponto de quebras evolutivas <i>Evolutionary breakpoint regions</i>
<b>EI</b>	Elemento intermediário
<b>FISH</b>	Hibridao <i>in situ</i> fluorescente <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
<b>het-ITS</b>	ITS heterocromtico <i>heterochromatic ITS</i>
<b>ITS</b>	Sitio telomrico intersticial <i>Interstitial Telomeric Sites</i>
<b>LINE</b>	<i>Long interspersed nuclear element</i>
<b>LTR</b>	<i>Long terminal repeats</i>
<b>m</b>	Cromossomo metacntrico
<b>NF</b>	Número fundamental
<b>NGS</b>	Sequenciamento de <i>Next-generation</i>
<b>NHEJ</b>	Juno de extremidades não homlogas <i>Non-Homologous End Joining</i>
<b>NTS</b>	Unidade de espaçador não transcrita <i>Non-transcribed spacer sequence</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>p</b>	Brao curto

<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>q</b>	Braço longo
<b>Rb</b>	Robertsoniana
<b>RCIs</b>	Região de controle interna
<b>RON</b>	Região organizadora de nucléolo
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>RTE</b>	Retrotransposon
<b>satDNA</b>	DNA satélite
<b>SINE</b>	<i>Short interspersed nuclear element</i>
<b>s-ITS</b>	ITS pequeno <i>short-ITS</i>
<b>sm</b>	Cromossomo submetacêntrico
<b>snRNAs U</b>	Pequenos RNAs ricos em uridina
<b>st</b>	Cromossomo subtlocêntrico
<b>TEs</b>	Elementos transponíveis <i>Transposable Elements</i>
<b>TIRs</b>	Repetições terminais invertidas <i>Terminal Inverted Repeats</i>

## RESUMO

Loricariidae abrange espécies de peixes conhecidos popularmente como cascudos. Dados citogenéticos da família revelam ampla diversidade cromossômica, decorrente tanto da variação do número diploide ( $2n$ ), resultante de eventos de fusão cêntrica, quanto de rearranjos cromossômicos estruturais, tais como inversões, reposicionamento centromérico e translocações. Os rearranjos cromossômicos encontrados em Loricariidae estão associados a quebras do DNA em sítios ricos em sequências repetitivas. A instabilidade de tais regiões é descrita como “pontos de quebra evolutiva” (do inglês, *evolutionary breakpoint regions* - EBRs), os quais são considerados *hotspots* para rearranjos cromossômicos, e estariam envolvidos com a redução do  $2n$  no grupo. Porém, ainda são poucos os estudos que buscaram caracterizar os sítios cromossômicos instáveis geradores da evolução cariotípica em Loricariidae. Estudos prévios com *Rineloricaria* evidenciaram que estes sítios estão localizados em clusters de rDNAs, ou adjacentes a eles. Assim, este trabalho teve como objetivos a identificação e a caracterização das sequências de DNA presentes em sítios propensos a quebras cromossômicas, visando o entendimento do mecanismo molecular dos rearranjos cromossômicos e da diversidade cariotípica em espécimes de Loricariidae. No presente estudo, foram analisados 103 exemplares pertencentes a duas subfamílias: Hypostominae (*Ancistrus aguaboensis*  $2n = 50$ ; *Ancistrus* cf. *multispinis*  $2n = 52$ ) e Loricariinae (*Rineloricaria latirostris*  $2n = 46$  e  $48$ ; *Rineloricaria pentamaculata*  $2n = 54, 55$  e  $56$ ), coletadas em diferentes bacias hidrográficas da região sul, sudeste e centro oeste do Brasil. Foram utilizadas técnicas de citogenética clássica e molecular, como a hibridização *in situ* comparativa dos genes ribossomais (DNAr) 5S e 18S, sequência telomérica (TTAGGG) $_n$ , sequências de repetição simples ((A) $_{30}$ , (CA) $_{15}$ , (GA) $_{15}$ , (CAT) $_{10}$  e (CGG) $_{10}$ ), além da análise de dados genômicos fornecidos por sequenciamento de *Next-generation* (NGS). Os resultados obtidos revelaram que *Ancistrus* cf. *multispinis* ( $2n = 52$  cromossomos) apresenta cariótipo tido como basal para Ancistrini, enquanto *A. aguaboensis* possui  $2n = 50$  (primeira descrição cariotípica), decorrente de eventos de fusão Robertsoniana (Rb), desencadeada por quebras na dupla fita e rearranjos em sítios de rDNA 5S, corroborando com dados encontrados previamente em outras espécies do grupo. Para *R. latirostris*, obtivemos a fração repetitiva para o reconhecimento das sequências de microssatélites presentes em regiões previamente descritas como pontos de fusão cromossômica. Foi constatado que as sequências repetitivas tais como os rDNAs, transposon *hAT*, e unidades de microssatélites flanqueiam as regiões de quebras cromossômicas em *R. latirostris*, e por conterem sítios de sequências parálogas em cromossomos não homólogos, estas podem ter atuado como facilitadores dos eventos de fusão Rb presente neste grupo. Ainda, foi discutido o envolvimento de cromossomos acrocêntricos em eventos de fusão Rb, com a participação de rDNA 5S e microssatélites, que culminaram no surgimento de um polimorfismo cromossômico numérico observado em exemplares de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande ( $2n = 54$  a  $56$ ). Os dados apresentados para *Rineloricaria* corroboram com estudos que sugerem que a redução do  $2n$  se daria por fusão Rb, quando são observadas a diminuição de cromossomos subtelo/acrocêntricos e conseqüente formação de cromossomos metacêntricos, com ou sem vestígios de ITS. Em resumo, foi demonstrado o acúmulo de DNAs repetitivos presentes em regiões de quebras cromossômicas e seu potencial envolvimento com os extensos cromossômicos observados em Loricariidae, impactando na diversidade e evolução cariotípica do grupo.

**Palavras-chave:** DNAr, evolução cariotípica, FISH, fração genômica repetitiva, microssatélites, rearranjos cromossômicos.

## ABSTRACT

Loricariidae includes species vulgarly known as armored catfishes. Cytogenetic data revealed wide chromosomal diversity in this family, resulted from both diploid number ( $2n$ ) variation, because of centric fusion events, and structural chromosomal rearrangements, such as inversions, centromeric repositioning and translocations. The chromosomal rearrangements found in Loricariidae are associated with double strand DNA breaks at sites rich in repetitive sequences. The instability present in these regions is described as “evolutionary breakpoint regions” (EBRs), which are considered hotspots for chromosomal rearrangements, and would be involved with the  $2n$  reduction in the group. However, there are still few studies that sought to characterize the unstable chromosomal sites that generate karyotypic evolution in Loricariidae. Previous studies with *Rineloricaria* showed that these sites were located in rDNAs clusters, or at adjacent areas. Thus, this work aimed to identify and characterize the DNA sequences present in sites prone to chromosomal breaks, aiming to understand the molecular mechanism of chromosomal rearrangements and karyotypic diversity present in Loricariidae specimens. In the present study, we analyzed 95 specimens belonging to two subfamilies: Hypostominae (*Ancistrus aguaboensis*  $2n = 50$ ; *Ancistrus* cf. *multispinis*  $2n = 52$ ) and Loricariinae (*Rineloricaria latirostris*  $2n = 46$  and  $48$ ; *Rineloricaria pentamaculata*  $2n = 54, 55$  and  $56$ ), collected in different hydrographic basins in the South, Southeast and Central west of Brazil. Classical and molecular cytogenetic techniques were used, such as comparative *in situ* hybridization of 5S and 18S ribosomal genes (rDNA), telomeric sequence (TTAGGG) $_n$ , single repeat sequences ((A) $_{30}$ , (CA) $_{15}$ , (GA) $_{15}$ , (CAT) $_{10}$  and (CGG) $_{10}$ ), in addition to the analysis of genomic data provided by Next-Generation Sequencing (NGS). The results obtained revealed that *Ancistrus* cf. *multispinis* ( $2n = 52$  chromosomes) presents a karyotype considered basal for Ancistrini, while *A. aguaboensis* has  $2n = 50$  (first karyotypic description), resulting from Robertsonian fusion (Rb) events, triggered by double strand breaks and rearrangements at sites of rDNA 5S, corroborating previously data found in other species of the group. For *R. latirostris*, we obtained the repetitive fraction for the recognition of microsatellite sequences present in regions previously described as chromosomal fusion points. It was found that repetitive sequences such as rDNAs, *hAT* transposon, and microsatellite units are present in flanking regions of chromosome breakage sites in *R. latirostris*, and because they contain sites of paralogous sequences present in non-homologous chromosomes, these sequences may have acted as facilitators of Rb fusion events present in this group. Furthermore, the involvement of acrocentric chromosomes in Rb fusion events was discussed, with the participation of 5S rDNA and microsatellites, which culminated in the emergence of a numerical chromosomal polymorphism observed in specimens of *R. pentamaculata* from the Barra Grande River ( $2n = 54$  to  $56$ ). The data presented for *Rineloricaria* corroborate studies that suggested that the  $2n$  reduction is resulted from Rb fusion, with the decrease of subtelo/acrocentric chromosomes and the consequent formation of metacentric chromosomes, with or without ITS vestiges. In summary, it was demonstrated the accumulation of repetitive DNAs present in regions of chromosomal breaks and their potential involvement with the extensive chromosomes observed in Loricariidae, impacting the diversity and karyotypic evolution of the group.

**Keywords:** chromosomal rearrangements, FISH, karyotypic evolution, microsatellites, rDNA, repetitive genomic fraction.

# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Ordem Siluriformes: aspectos gerais

Peixes da ordem Siluriformes são os mais diversos dentro do grupo Ostariophysi e estão amplamente distribuídos (TEUGELS, 1996). Possuem 39 famílias reconhecidas e cerca de 4054 espécies válidas (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2022). A maioria de seus representantes habita as águas doces das regiões tropicais e Neotropicais embora existam algumas famílias que apresentam espécies estuarinas, como Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae (DE PINNA, 1998). Há ainda duas famílias apomórficas evolutivamente adaptadas a água salgada, Plotosidae e Ariidae, distribuídas mundialmente (BERRA, 2001). Possuem, geralmente, hábito noturno e crepuscular, habitando o fundo de rios e lagos, aderidos a troncos e rochas (FERRARIS, 1998, 2007).

Os Siluriformes apresentam uma grande variedade de formas, cores e tamanhos. Entretanto, possuem características morfológicas distintas, sendo assim, facilmente identificados. Em relação a sua morfologia externa, esses peixes possuem corpo nu, envolto por pele espessa ou coberto, total ou parcialmente, por placas ósseas (BRITSKI *et al.*, 1988). Possuem nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo que o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal possui um acúleo forte e pungente, já a nadadeira caudal assume formato variável (GARCIA, 2005). Ainda, geralmente, possuem três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974).

Essa ordem possui papel importante na biogeografia histórica. O padrão de distribuição global demonstra evidências do modelamento geográfico da terra e de sistemas aquáticos. Acredita-se que os Siluriformes foram primariamente habitantes de água doce e que realizaram significantes migrações marinhas (BRIGGS, 2005). Sua ampla distribuição e variedade de formas e hábitos os tornam um excelente grupo para estudos ecológicos, evolutivos e filogeográficos (LUNDLBERG; FREIL, 2003). Entretanto, os estudos com Siluriformes demonstram ainda muitos problemas sistemáticos e taxonômicos.

## 1.2 Família Loricariidae: caracterização e descrição citogenética

A família Loricariidae é a mais diversificada da ordem Siluriformes, abrigando até o momento, 1025 espécies válidas (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2022). Os

1 peixes dessa família são popularmente conhecidos como “cascudos” por apresentarem  
2 um corpo coberto de placas ossificadas, dispostas em várias séries, e dentes dérmicos  
3 denominados odontódeos (SILVANO *et al.*, 2001). Apresentam ainda a boca na posição  
4 ventral, com lábios formando um disco oral usado para aderir a substratos sólidos e  
5 forrageamento (GEERINCKX *et al.*, 2011). Suas bocas sugadoras e dentes raspadores  
6 ajudam na dieta principalmente detritívora-iliófaga, alimentando-se principalmente de  
7 algas e detritos (BUCK; SAZIMA, 1995; DE PINNA, 1998; GEERINCKX *et al.*, 2011).

8 A taxonomia da família ainda é controversa e está em constante revisão,  
9 dificultando a divisão de suas subfamílias. Atualmente, Loricariidae abrange seis  
10 subfamílias: Lithogeninae, Delturinae, Hypoptopomatinae, Neoplecostominae,  
11 Loricariinae e Hypostominae (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN *et al.*, 2015). Apesar do  
12 grande número de espécies pertencentes a Loricariidae, poucos estudos citogenéticos  
13 foram desenvolvidos, sendo muitos deles restritos à descrição citogenética dos seus  
14 exemplares. Foi observada uma ampla plasticidade cariotípica na família, sendo  
15 considerada desde então um alvo importante para estudos citogenéticos, os quais auxiliam  
16 na compreensão dos acontecimentos genéticos que levaram a evolução, bem como no  
17 entendimento a respeito da citotaxonomia de grupos crípticos e na compreensão da  
18 biogeografia das espécies (ARTONI *et al.*, 2009).

19 Dados citogenéticos na família Loricariidae revelam extensiva variação  
20 cromossômica, decorrente da variedade de números diploides ( $2n$ ) dos exemplares ( $2n =$   
21  $34 - 96$  cromossomos) e dos inúmeros tipos de rearranjos cromossômicos, que  
22 contribuem com a diversidade cariotípica encontrada no grupo (ARTONI; BERTOLLO,  
23 2001; ALVES *et al.*, 2003; KAVALCO *et al.*, 2005; BLANCO *et al.*, 2012; 2013;  
24 BUENO *et al.*, 2012, 2014; PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018, 2020; DEON  
25 *et al.*, 2020, 2022 a, b). Observado em subfamílias consideradas basais (como  
26 Neoplecostominae) e no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK *et al.*, 2012), o  
27  $2n$  de 54 cromossomos seria um caráter plesiomórfico na família (ARTONI;  
28 BERTOLLO, 2001).

29 Grande parte dos estudos citogenéticos foi conduzido em espécies da subfamília  
30 Hypostominae, no qual observa-se uma variação do  $2n$  de 34 a 84 cromossomos  
31 (CEREALI *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2009). Na subfamília Loricariinae, ocorre  
32 variação de 36 a 74 cromossomos (ARTONI, 1996; GIULIANO-CAETANO, 1998;  
33 ALVES *et al.*, 2003) e, em Hypoptopomatinae, observa-se o  $2n = 54$  cromossomos sendo

1 o mais comum entre as espécies analisadas (ANDREATA et al., 1992). Já as subfamílias  
2 Delturinae, Lithogeneinae e Rhinelepinae apresentam um baixo número de espécies, sem  
3 a presença de estudos citogenéticos até o momento.

4

### 5 **1.2.1 Subfamília Loricariinae**

6

7 Os representantes dessa subfamília são popularmente conhecidos como  
8 “cascudos-chinelo”, “cascudos-viola” e “cascudos-lagartixa”. Apresentam o corpo  
9 achatado e se distinguem dos demais loricarídeos pela presença do corpo e pedúnculo  
10 caudal deprimidos, além da ausência de nadadeira adiposa (COVAIN; FISCH-MULLER,  
11 2007).

12 A subfamília Loricariinae é considerada a segunda mais numerosa de Loricariidae  
13 e corresponde a um agrupamento monofilético, com cerca de 257 espécies válidas  
14 (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2022) distribuídas em 31 gêneros (FERRARIS, 2007).  
15 Apresenta uma grande diversidade no que diz respeito a número de cromossomos e a  
16 fórmula cariotípica (ROSA et al., 2012). De acordo com Rosa e colaboradores (2012),  
17 tanto fissões quanto fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações  
18 gaméticas, poderiam explicar esta variação do 2n.

19

#### 20 **1.2.1.1 Gênero *Rineloricaria***

21

22 *Rineloricaria* Bleeker, 1862 é o gênero mais especioso de Loricariinae, com cerca  
23 de 66 espécies (FROESE; PAULY, 2022), e também o que apresenta mais problemas  
24 taxonômicos a serem resolvidos.

25 Este gênero possui uma ampla variação cariotípica, desde *Rineloricaria latirostris*  
26 apresentando 2n de 36 cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998) até *Rineloricaria*  
27 n. sp., *R. cf. nigricauda*, *R. lima*, *R. longicauda* e *R. quadrensis* com um 2n = 70  
28 cromossomos (ALVES et al., 2003; RODRIGUES, 2010; ROSA et al., 2012;  
29 VENTURELLI et al. 2021). No geral, considera-se que a diversificação cromossômica  
30 para algumas espécies do grupo ocorreu por fissão cêntrica até o 2n = 70 cromossomos,  
31 enquanto outras sofreram redução por fusão Robertsoniana (Rb) até o 2n = 36  
32 cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et  
33 al., 2014; PRIMO et al., 2017, 2018; GLUGOSKI et al., 2018).



1 Giuliano-Caetano (1998) descreveu um amplo polimorfismo numérico para *R.*  
2 *latirostris*, com variação do  $2n = 36 - 48$  cromossomos oriundos de fusão cêntrica. Rosa  
3 et al. (2012) analisaram duas populações da espécie *R. cf. lima* de afluentes do rio Ribeira,  
4 as quais apresentaram uma variação de número cromossômico de 66 a 70 cromossomos,  
5 além de diferentes fórmulas cariotípicas, apresentando um total de 8 citótipos. A variação  
6 cromossômica encontrada nesta espécie foi decorrente de rearranjos do tipo fusão cêntrica  
7 e inversões, visualizadas com a presença de sítios teloméricos intersticiais (do inglês,  
8 *Interstitial Telomeric Sites* - ITS) e DNAr 5S em pontos de fusão (ROSA et al., 2012).  
9 Da mesma forma, em *R. lanceolata* foram encontradas dez formas cariotípicas com  
10 variação de  $2n = 45 - 48$  cromossomos e número fundamental (NF) de 52 – 55 (ERRERO-  
11 PORTO et al., 2014). Este polimorfismo cromossômico de *R. lanceolata* também foi  
12 decorrente de fusões Rb e diferentes combinações de gametas balanceados (ERRERO-  
13 PORTO et al., 2014). Além destas variações de  $2n$ , em *R. pentamaculata* do rio Paraná  
14 foram descritos  $2n = 56$  cromossomos, contudo com variação intra e interindividual de  
15 cromossomos B (ERRERO-PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS,  
16 2010, 2011).

17 Primo e colaboradores (2017) analisaram diferentes populações de *Rineloricaria*  
18 e evidenciaram uma organização cariotípica distinta entre os representantes, variando de  
19 46 a 64 cromossomos, fato atribuído à instabilidade telomérica, inversões e eventos Rb.  
20 Ensaio de hibridação *in situ* fluorescente (do inglês, *Fluorescence in situ Hybridization*  
21 - FISH) em espécies com  $2n$  menores evidenciaram sítios marcados com DNAr 5S, DNAr  
22 18S e com a sonda telomérica geral de vertebrados (TTAGGG) $_n$  em regiões  
23 centroméricas de cromossomos metacêntricos, os quais estariam envolvidos em  
24 rearranjos cromossômicos, como as fusões cêntricas. Em espécies com  $2n$  mais alto, as  
25 fissões cêntricas seriam o mecanismo para diversificação cariotípica encontrada no grupo  
26 estudado (PRIMO et al., 2017).

27

### 28 **1.2.2 Subfamília Hypostominae**

29

30 Armbruster (2004) reconheceu cinco tribos monofiléticas em Hypostominae:  
31 Corymbophanini, Rhinelepini, Pteroplichthyni, Ancistrini e Hypostomini. Esta  
32 subfamília é composta por pelo menos 40 gêneros (LUJAN et al., 2015) e 593 espécies  
33 nominais, das quais 495 são consideradas válidas (FRICKE; ESCHMEYER; FONG,

2022). Apresenta a maior riqueza de espécies com ampla distribuição geográfica e diversidade morfológica (LUJAN et al., 2015), sendo a subfamília com maior caracterização e estudos citogenéticos dentro de Loricariidae.

Possuem variação de  $2n = 34$  cromossomos em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2009) a  $2n = 84$  em *Hypostomus perdido* (ZAWADZKI et al., 2014). Nesta subfamília percebe-se uma relação inversa entre o  $2n$  e o número de cromossomos com dois braços, sugerindo uma evolução decorrente de eventos de fusão/fissão cêntrica, ocorrendo principalmente nos representantes da tribo Hypostomini (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Poucas espécies pertencentes a subfamília Hypostominae mantêm o  $2n$  de 54 cromossomos, considerado basal em Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001).

Algumas espécies de Hypostominae apresentam sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos, embora esta ocorrência não seja frequente na subfamília. O sistema XX/XY foi verificado em *Hypostomus ancistroides* e *H. macrops* (EIGENMANN; EIGENMANN, 1888; MICHELE et al., 1977); o sistema XX/X0 foi identificado em *Ancistrus* sp. 1 (ALVES et al., 2006); em *Hypostomus* sp. (ARTONI et al., 1998), *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003 (OLIVEIRA et al., 2006) e *Ancistrus* sp. 8 (MARIOTTO et al., 2011) foi verificado a presença do sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW.

A presença de cromossomos supranumerários é outro tipo de polimorfismo cromossômico encontrado nesta subfamília, como observado em *Hypostomus* sp. 3 córrego Salobrinha NUP 4247 e *Hypostomus* sp. Xingu-3 (MILHOMEM et al., 2010).

#### 1.2.2.1 Gênero *Ancistrus*

*Ancistrus* pertence a tribo Ancistrini e encontra-se amplamente distribuído na região Neotropical, abrangendo aproximadamente 70 espécies válidas atualmente (FROESE; PAULY, 2022).

Em Ancistrini, estudos citogenéticos evidenciaram  $2n = 52$  cromossomos em muitas espécies, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (ARTONI; BERTOLLO, 2001; DE OLIVEIRA et al., 2006; GLUGOSKI et al., 2020). Além disso, em Pterygoplichthyini (grupo irmão de Ancistrini) (ARMBRUSTER, 2004), foi observado também a predominância de exemplares com  $2n = 52$  cromossomos

1 (ALVES et al., 2006), sugerindo-se então que a condição ancestral para Ancistrini seja  
2 de  $2n = 52$  cromossomos (BUENO et al., 2018).

3 Em Ancistrini, somente as espécies de *Ancistrus* apresentam uma condição que  
4 difere do  $2n = 52$  cromossomos, com alta frequência de cromossomos acrocêntricos e  
5 fórmulas cariotípicas distintas (DE OLIVEIRA et al., 2007, 2008, 2009; MARIOTTO et  
6 al., 2009, 2011; KONERAT et al., 2015; FAVARATO et al., 2016; BARROS et al.,  
7 2017; BUENO et al., 2018; GLUGOSKI et al., 2020).

8 Aliado a alta plasticidade cariotípica, algumas espécies do gênero podem ainda  
9 apresentar diferentes sistemas de cromossomos sexuais, como os sistemas XX/X0,  
10 XX/XY, XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, ZZ/ZW e Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub> (MARIOTTO et al., 2004; ALVES  
11 et al., 2006; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006; PRIZON et al., 2017; DE OLIVEIRA et  
12 al., 2008, 2018).

13 A ampla diversidade de  $2n$  e fórmulas cariotípicas em Ancistrini são atribuídas  
14 aos rearranjos cromossômicos, como inversões paracêntricas e pericêntricas,  
15 translocações, deleções, duplicações e rearranjos Rb (CARDOSO et al., 2013;  
16 GLUGOSKI et al., 2020). Com exceção de espécies com  $2n = 52$  e  $54$  cromossomos, as  
17 fusões cêntricas, ou Rb, são as principais responsáveis pela redução do  $2n$  encontrada no  
18 gênero *Ancistrus* (ALVES et al., 2003; SOUZA, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2009;  
19 MARIOTTO et al., 2011). Já os mecanismos de inversões, transposições e translocações  
20 contribuíram para a variação da morfologia dos cromossomos com a manutenção do  
21 número de cromossomos no cariótipo (MARIOTTO et al., 2011; PRIZON et al., 2016).

22 Esses rearranjos geralmente possuem ocorrência associada às quebras do DNA  
23 em locais altamente repetitivos (BRUSCHI et al., 2014). A instabilidade de tais regiões é  
24 descrita como “ponto de quebras evolutivas” (do inglês, *evolutionary breakpoint regions*  
25 - EBRs), os quais são considerados *hotspots* para rearranjos cromossômicos (PEVZNER;  
26 TESLER, 2003b). Em Loricariidae, diversos tipos de DNAs repetitivos já foram descritos  
27 em pontos de quebras cromossômicas, os quais possivelmente contribuíram com a  
28 diversidade cariotípica presente no grupo (ROSA et al., 2012; BARROS et al., 2017;  
29 PRIMO et al., 2017; DEON et al., 2020; GLUGOSKI et al., 2018, 2020).

30

### 31 **1.3 DNAs repetitivos**

32 Sequências de DNAs repetitivos são importantes marcadores cromossômicos,  
33 pois auxiliam na compreensão dos rearranjos cromossômicos e dos eventos evolutivos

1 geradores da diversidade cariotípica observada em Loricariidae (ROSA *et al.*, 2012;  
2 BARROS *et al.*, 2017; PRIMO *et al.*, 2017; DEON *et al.*, 2020, 2022a, b; GLUGOSKI  
3 *et al.*, 2018; 2020).

4 Cópias de DNAs repetitivos estão frequentemente associadas às regiões  
5 heterocromáticas, sendo encontradas geralmente na região centromérica e telomérica dos  
6 cromossomos eucarióticos, desempenhando um papel estrutural na evolução genômica  
7 (DIMITRI; JUNAKOVIC, 1999). Ou ainda, podem ser encontrados dispersos pelo  
8 genoma, sugerindo o seu envolvimento em processos de replicação e recombinação do  
9 DNA (BIET *et al.*, 1999, LI *et al.*, 2002) e na expressão gênica (LIU *et al.*, 2001).

10 A heterocromatina constitutiva é formada por sequências altamente repetitivas,  
11 apresentando um alto grau de compactação, por isso, apresentam baixa atividade  
12 transcricional ou até mesmo inexistente, e a replicação ocorre tardiamente, em  
13 comparação com outros tipos de cromatina (SUMNER, 2003). O mapeamento dessas  
14 regiões nos cromossomos permite determinar padrões de heterocromatina e detectar  
15 polimorfismos intraespecífico e interpopulacionais comumente encontrados nas espécies  
16 da ictiofauna.

### 17 18 **1.3.1 DNAs repetitivos *in tandem***

19  
20 O genoma dos eucariotos apresenta um grande número de DNAs repetitivos  
21 (SUMNER, 2003) e estas sequências podem ser divididas em dois grupos: sequências  
22 repetitivas *in tandem*, como microssatélites, minissatélites, satélites (satDNA) e famílias  
23 multigênicas; e, elementos dispersos, conhecidos como transposons e retrotransposons  
24 (CHARLESWORTH, 1994).

25 As unidades de repetições *in tandem* são geralmente organizadas em clusters,  
26 localizadas frequentemente em regiões teloméricas ou pericentroméricas, presentes em  
27 um ou em vários pares cromossômicos. As sequências repetitivas organizadas *in tandem*  
28 têm se mostrado fundamentais em estudos relacionados à evolução cromossômica  
29 (MAXON *et al.*, 1983; CHARLESWORTH *et al.*, 1994; VICARI *et al.*, 2010).

30 Sequências satélites são compostas por unidades de repetição de 20 a 1000 pb de  
31 comprimento, repetidas centenas a milhares de vezes. Encontram-se localizadas  
32 principalmente em regiões terminais e centromérica dos cromossomos, onde  
33 desempenham importante papel na organização cromossômica, sendo o principal

1 constituinte da heterocromatina. Entretanto, o número de cópias pode variar dentro e entre  
2 as espécies, possuindo uma composição distinta, sendo ricas em A+T ou C+G  
3 (SUMNER, 2003).

4 Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por  
5 heterocromatina constitutiva, a qual na maioria das vezes, é composta por satDNA  
6 (CHAVES *et al.*, 2004; JOHN, 1988). O estudo de DNAs satélites em peixes neotropicais  
7 tem se tornado frequente, uma vez que essas sequências podem gerar informações  
8 valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-  
9 específicas e/ou cromossomo-específicas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002; VICARI *et al.*,  
10 2010).

11 A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> constitui outra fração  
12 repetitiva *in tandem* importante no estudo de evolução cromossômica de peixes  
13 neotropicais. Sua análise permite a verificação de rearranjos cromossômicos,  
14 principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas, nos quais há a possibilidade  
15 de detecção de ITS (BLANCO *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2012; ERRERO-PORTO *et al.*,  
16 2014; PRIMO *et al.*, 2017).

17 Os microssatélites consistem de pequenas sequências repetidas *in tandem* que  
18 apresentam de 2 a 6 pares de nucleotídeos de comprimento (ZANE *et al.*, 2002). Devido  
19 ao fato de ser altamente polimórfico, os microssatélites são amplamente utilizados em  
20 contextos evolutivos ao nível de população, como indicadores de parentesco, fluxo gênico  
21 e estrutura populacional (QUELLER *et al.*, 1993; BRUFORD; WAYNE, 1993).  
22 Entretanto, há poucos estudos com mapeamento físico de microssatélites em peixes  
23 neotropicais (HATANAKA *et al.*, 2002; VANZELA *et al.*, 2002; CIOFFI *et al.*, 2011;  
24 TERCENIO *et al.*, 2013; ZIEMNICZAK *et al.*, 2014; PUCCI *et al.*, 2016;  
25 SCHEMBERGER *et al.*, 2019).

26 Os minissatélites são repetições *in tandem* que apresentam de 10 a 80 pares de  
27 nucleotídeos de comprimento (SNUSTAD; SIMMONS, 2013), localizadas  
28 essencialmente nas porções heterocromáticas do genoma de peixes (MARTINS, 2007).  
29 Estas sequências foram descritas para inúmeras espécies de peixes (GOODIER;  
30 DAVIDSON, 1998), contudo o mapeamento cromossômico de minissatélites foi  
31 realizado apenas para algumas espécies (PÉREZ *et al.*, 1999; CROLLIUS *et al.*, 2000).  
32 Apesar de não apresentarem um padrão de definição, são importantes ferramentas em  
33 estudos genéticos devido a sua dinâmica evolutiva (MARTINS, 2007).

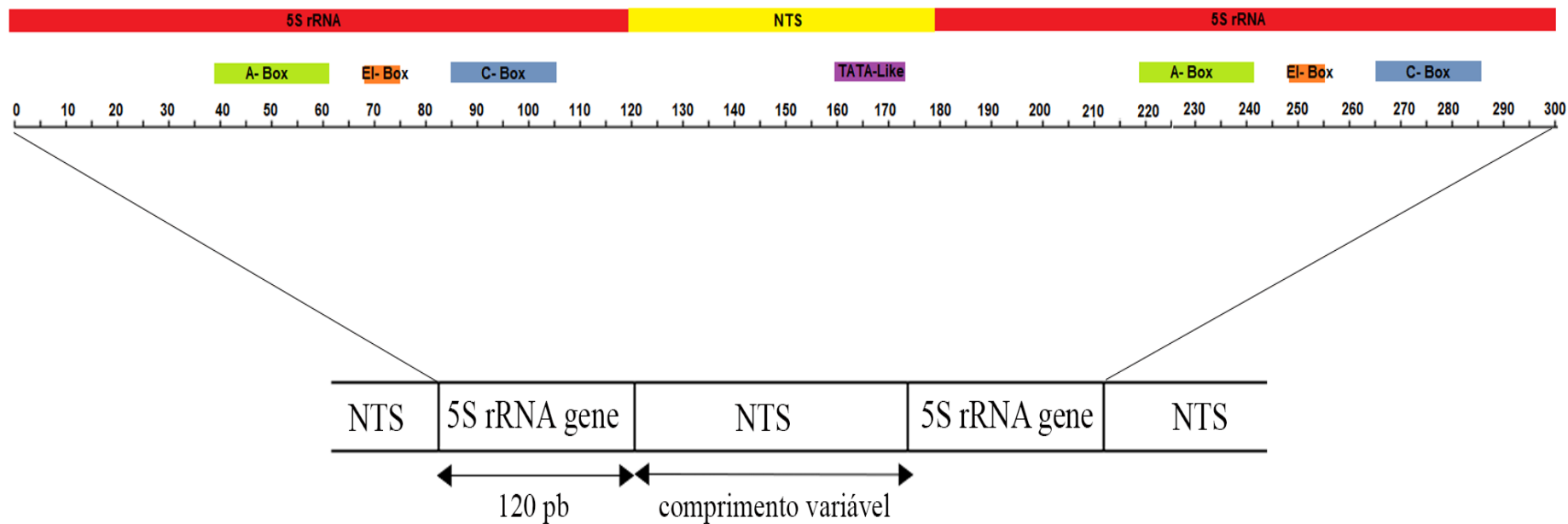
1 As famílias multigênicas são sequências de DNA que possuem similaridade  
2 estrutural e funcional originados por duplicação e variação de um gene ancestral comum  
3 (NEI; ROONEY, 2005). Estes genes podem estar clusterizados e localizados em um único  
4 cromossomo ou situados em inúmeros sítios no cariótipo (ROSA et al., 2012;  
5 ZIEMNICZAK et al., 2012; BARROS et al., 2017; PRIMO et al., 2017; DEON et al.,  
6 2020; GLUGOSKI et al., 2020).

7 Em peixes neotropicais, inúmeros trabalhos utilizam os DNAs ribossômicos  
8 (DNAr) como marcadores cromossômicos (CENTOFANTE et al., 2006; MATOSO et  
9 al., 2011; SCHNEIDER et al., 2012, BUENO et al., 2014; TRALDI et al., 2016; entre  
10 outros), contudo, em espécies pertencentes a Loricariidae tais estudos ainda são escassos  
11 (KAVALCO et al., 2004; 2005; MARIOTTO et al., 2009; 2011; MENDES-NETO et al.,  
12 2011; BITENCOURT et al., 2012; ROSA et al., 2012; ZIEMNICZAK et al., 2012;  
13 BUENO et al., 2014; TAKAGUI et al., 2014; BARROS et al., 2017; PRIMO et al., 2017;  
14 DEON et al., 2020; GLUGOSKI et al., 2018, 2020; entre outros), frente a enorme  
15 diversidade de peixes existente.

16 Os genes ribossomais compreendem duas famílias gênicas distintas, compostas  
17 por repetições organizadas *in tandem*: (i) o DNAr maior (DNAr 45S) é a região  
18 responsável pela organização do nucléolo e engloba os genes que codificam os *rRNAs*  
19 18S, 5,8S e 28S; e, (ii) o DNAr menor composto pela família gênica codificante de *rNAr*  
20 5S.

21 A caracterização da distribuição de sítios cromossômicos de DNAr 45S pode ser  
22 realizada utilizando-se a técnica de impregnação por nitrato de prata, a qual permite a  
23 localização de sítios ativos desses genes ribossômicos nos cromossomos (HOWELL;  
24 BLACK, 1980). Ainda, por meio da técnica de FISH, a utilização de sondas de DNAr  
25 45S são considerados excelentes marcadores citotaxonômicos para diversos grupos,  
26 podendo variar quanto ao número e localização nos sítios cromossômicos até mesmo em  
27 indivíduos da mesma espécie (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Primo et al. (2017),  
28 encontraram espécies com sítios únicos de DNAr 18S (*R. latirostris*) até espécies com  
29 marcações em 4 pares cromossômicos (*R. stellata*). Em *Rineloricaria*, a presença de sítios  
30 de DNAr 18S em regiões centroméricas de cromossomos metacêntricos, aliados a  
31 presença de sítios de 5S colocalizados a ITS também em regiões centroméricas, indicam  
32 que eventos de fusões entre cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos foram  
33 importantes na diferenciação cariotípica destas espécies (PRIMO et al., 2017).

1           O DNAr 5S consiste de uma unidade de transcrição de aproximadamente 120 pb,  
2 separada da seguinte por uma unidade de espaçador não transcrita (do inglês, *non-*  
3 *transcribed spacer sequence* - NTS) de tamanho variado. A sequência do gene 5S é  
4 altamente conservada, entretanto os NTS são variáveis tanto em tamanho quanto em  
5 sequência, resultado de inversões, deleções, substituições de base e pseudogenes, sendo  
6 uma importante ferramenta para estudos evolutivos (REBORDINOS et al., 2013). As  
7 regiões de NTS parecem apresentar uma evolução mais rápida, sendo consideradas  
8 importantes para estudos de organização e evolução das famílias multigênicas  
9 (MARTINS; WASKO, 2004). O RNAr 5S apresenta sequências importantes para a  
10 transcrição: uma região de controle interna (RCIs), a qual atua como promotora da  
11 transcrição; um Box A, que é uma sequência geral RCI para RNA polimerase III; um  
12 elemento intermediário (EI) e um Box C que são específicos para a transcrição do RNAr  
13 5S; uma sequência TATA, que atua como elemento promotor que direciona a transcrição  
14 pela RNA polimerase II (MARTINS; WASKO, 2004) (Figura 1). A sequência  
15 conservada TATA-like é observada *upstream* ao RNAr 5S em diversos peixes, como  
16 *Salmo salar* (PENDÁS et al., 1994), sugerindo uma possível influência na transcrição  
17 deste gene (MARTINS; WASKO, 2004). Além destas regiões, o RNAr 5S requer uma  
18 sequência terminadora, rica em timinas.



**Figura 1-** Representação esquemática do gene que codifica o *RNAr* 5S (em vermelho, com 120 pb) intercalado com uma unidade de espaçador não transcrita (em amarelo, NTS) de tamanho variável, indicando a localização do box A (verde), elemento intermediário (alaranjado), box C (azul) e TATA-like (roxo). Adaptado de MARTINS; WASKO, 2004; GOUVEIA et al., 2016



1 Eucariotos superiores possuem milhares de cópias de genes para *rNAr*, entretanto,  
2 em alguns casos, apenas uma fração destes *rRNAs* estão ativos (ROGERS; BENDICH,  
3 1987; DOUET; TOURMENTE, 2007). Em inúmeros eucariotos, os genes de *rRNA 5S*  
4 estão organizados em dois *clusters* de repetição em tandem separados (DUCROT et al.,  
5 2006), um destes, inativo na maioria das etapas do desenvolvimento (PETERSON et al.,  
6 1980; WOLFFE, 1994). Foi verificado que substituições de uma ou duas bases nas  
7 sequências DNAr 5S diferem quanto a expressão do *major rRNA 5S* (expresso em todos  
8 tecidos e em maior quantidade), daqueles que são *minor rRNA 5S* (inativos em  
9 determinadas fases do desenvolvimento e tecidos) (CHEN et al., 1984; MATHIEU et al.,  
10 2003; DOUET; TOURMENTE, 2007). É importante caracterizar DNAr 5S funcionais e  
11 diferenciá-los de pseudogenes a fim de auxiliar na compreensão da evolução cariotípica  
12 observada nas espécies de Loricariidae.

13 Os genes das histonas constituem uma família multigênica exclusiva de  
14 eucariotos. Possuem importante papel nos processos celulares e suas proteínas estão  
15 envolvidas no empacotamento do DNA em nucleossomos, eventos de modificação da  
16 cromatina e controle da expressão gênica (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2004). Existem cinco  
17 classes de histonas que podem ser classificadas em dois grupos principais: nucleares  
18 (H2A, H2B, H3, H4) e histona ligante (H1) (SIMPSON, 1978), além de genes de histonas  
19 variantes (SHIMADA et al., 1981). Devido a sua distribuição em cluster, no genoma, elas  
20 se tornam importantes marcadores cromossômicos para análise da estrutura genômica,  
21 evolução cariotípica e origem e evolução de cromossomos B em animais (OLIVEIRA et  
22 al., 2011). Embora a família das histonas seja considerada um excelente modelo para  
23 estudos de mapeamento cromossômico, há uma escassez de informação sobre a  
24 organização e distribuição dessas sequências em Loricariidae.

25 A família multigênica codificante para *snRNAs* (pequenos RNAs ricos em uridina  
26 –*snRNAs U*) engloba os genes U1, U2, U4, U5 e U6, os quais fazem parte de um grande  
27 complexo RNA-proteína conhecido como maquinaria Spliceossômica (BRINGMANN;  
28 LUHRMANN, 1986; VALADKHAN, 2005). Estudos de localização *in situ* dos *snRNAs*  
29 ainda são escassos, estando restritos ao mapeamento dos *snRNAs* U1 e U2 (SUPIWONG  
30 et al., 2013; UTSUNOMIA et al., 2014; GARCÍA-SOUTO et al., 2015; SILVA et al.,  
31 2015; PISCOR et al., 2018; DULZ et al., 2020). Em estudos recentes, Schott et al. (2022)  
32 (em submissão) evidenciaram marcações de U1, U2, U4 e U5 em espécies de *Ancistrus*,  
33 bem como a caracterização nucleotídica destas sequências. Da mesma maneira,

1 Azambuja et al. (2022) mostraram o mapeamento físico e caracterização molecular das  
2 sequências de *snRNAs* U1, U2, U3, U4, U5 e U6 em representantes da família  
3 Parodontidae.

4 É proposto que a presença de elementos transponíveis (do inglês, *Transposable*  
5 *Elements* – TEs) flanqueando as sequências *snRNAs* contribuíram com sua dispersão nos  
6 genomas de *Oreochromis*, *Characidium* e *Triporthus* (CABRAL-DE-MELLO et al.,  
7 2012; PUCCI et al., 2018; YANO et al., 2020). A co-localização entre genes *snRNAs* e  
8 sítios ribossômicos foi relatada em cariótipos de peixes (MANCHADO et al., 2006;  
9 ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; YANO et al., 2017, 2020; CROSS;  
10 REBORDINOS, 2005; PISCOR et al., 2018; MALIMPENSA et al., 2020), bem como a  
11 presença de *snRNAs* em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al., 2014; YANO et  
12 al., 2017; DULZ et al., 2020).

13

### 14 **1.3.2 Elementos repetitivos dispersos**

15

16 Os TEs são sequências distintas do genoma capazes de se transpor para diferentes  
17 locais dentro do genoma. Estes elementos podem ser identificados de acordo com sua  
18 organização estrutural e seu mecanismo de transposição. Retrotransposons (ou TEs de  
19 classe I) se movimentam no genoma via transcriptase reversa, enquanto os transposons  
20 (ou elementos de classe II) apresentam sequências que se propagam pelo genoma via  
21 intermediários de DNA (BÖHNE, 2008), constituindo a principal fonte de mutação no  
22 genoma.

23 Os TEs de classe I realizam a síntese de DNA complementar a partir de uma cópia  
24 de RNA transcrita do TE, do tipo “copia-e-cola” (FINNERGAN, 1989), o qual é inserido  
25 em um novo sítio, produzindo cópias duplicadas destes elementos retrotransponíveis  
26 (WICKER et al., 2007). Devido a manutenção da cópia no lugar de origem, os TEs de  
27 classe I são considerados um dos agentes responsáveis pelo aumento ou diminuição do  
28 tamanho do genoma de diversos organismos (FESHOTTE; PRITHMAN, 2007).

29 Os TEs de classe II realizam sua transposição através de um intermediário de  
30 DNA e são divididos em duas subclasses. A subclasse I compreende os TEs do tipo  
31 “cortar-e-colar” da ordem TIR, caracterizados por suas repetições terminais invertidas  
32 (do inglês, *Terminal Inverted Repeats* - TIRs) de tamanho variável (WICKER et al.,  
33 2007). Esta ordem é subdividida em nove superfamílias (*Tc1-Mariner*, *hAT*, *Mutator*,

1 *Merlin*, *transib*, *P*, *PiggyBac*, *PIF-Harbinger* e *CACTA*), que se distinguem pelo  
2 tamanho das TIRs e das duplicações do sítio alvo (WICKER *et al.*, 2007). Já a subclasse  
3 II compreende os TEs do tipo “copiar-e-colar” e compreende as ordens *Helitron* e  
4 *Maverick* (WICKER *et al.*, 2007). Estas duas classes de TEs existem como elementos  
5 autônomos, os quais codificam todas as enzimas necessárias para sua transposição e, não  
6 autônomos, que dependem das enzimas produzidas pelos elementos autônomos (WIKER  
7 *et al.*, 2007). O impacto dos TEs pode adquirir proporções distintas dependendo da sua  
8 localização. Cópias ativas podem ser observadas principalmente em regiões  
9 eucromáticas, enquanto cópias degeneradas e rearranjadas, em sua maioria, em regiões  
10 heterocromáticas (KIDWELL; LISCH, 2001; SCHEMBERGER *et al.*, 2014).

11 O ciclo de vida dos transposons envolve o processo de nascimento até a morte  
12 destes elementos, resultando na sua inativação pelo acúmulo de mutações e,  
13 consequentemente a perda de identidade. Novos TEs podem se originar no genoma por  
14 transferência horizontal (OLIVEIRA *et al.*, 2012) ou por eventos de mutação e  
15 recombinação de sequências no genoma (FINNEGAN, 1985), levando a uma rápida  
16 propagação e aumento do número de cópias destes elementos no genoma. Seguindo este  
17 processo, ocorre a deterioração molecular, com redução crescente da mobilidade do  
18 elemento, resultante do acúmulo de cópias defeituosas ou, ao seu silenciamento  
19 epigenético causado pelo genoma hospedeiro (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007), até  
20 serem eliminados ou passarem por processos de exaptação, perdendo a sua identidade  
21 como transposon.

22 Estudos indicam que os TEs podem ter contribuído com a dispersão dos DNAr 5S  
23 no genoma de peixes (REBORDINOS *et al.*, 2013). Em Gymnotiformes, da Silva *et al.*  
24 (2011) localizaram *in situ* clusters múltiplos do DNAr 5S, fato atribuído ao envolvimento  
25 do TE Tc1-*Mariner Like* presente na região espaçadora (NTS) do DNAr 5S, contribuindo  
26 assim para a dispersão deste DNAr na espécie analisada. Primo e colaboradores (2017)  
27 analisaram citogeneticamente espécies de *Rineloricaria* e relataram a presença de  
28 múltiplos sítios de rDNA 5S no gênero, porém não foram encontrados indícios da  
29 colocalização entre o DNAr 5S e o TE Tc1-*Mariner* neste gênero (PRIMO *et al.*, 2018).

30

#### 31 **1.4 Sequências repetitivas e Rearranjos cromossômicos**

32 A ocorrência dos rearranjos cromossômicos é associada às quebras de DNA em  
33 sítios ricos em sequências repetitivas (KIDWELL; LISCH, 1997; KIDWELL, 2002;

1 CAZAUX et al., 2011; BRUSCHI et al., 2014). Em mamíferos são bem caracterizadas  
2 sequências de DNA que são extensivamente reutilizadas durante quebras cromossômicas,  
3 suportando a inferência de pontos quentes de rearranjos genômicos (ALEKSEYEV;  
4 PEVZNER, 2009). O re-uso da mesma sequência de DNA na origem dos rearranjos  
5 cromossômicos em genomas de linhagens próximas é a característica chave do modelo  
6 evolutivo dos pontos de quebras da dupla fita (do inglês, *Double Strand Breaks – DSBs*)  
7 (PEVZNER, TESLER, 2003). Essa predisposição à instabilidade e quebra de certas  
8 regiões genômicas têm sido considerados *hotspots* para rearranjos cromossômicos  
9 (PEVZNER; TESLER, 2003).

10 A identificação e caracterização das sequências de DNA presentes em sítios  
11 propensos às quebras cromossômicas é fundamental para entendimento do mecanismo  
12 molecular dos rearranjos cromossômicos (KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008). Na  
13 caracterização de um sítio propenso à quebra, a sequência deve ser capaz de adotar uma  
14 conformação denominada de DNA não B (do inglês, *non-B DNA conformation*). Estas  
15 sequências são segmentos curtos que apresentam alta flexibilidade e baixa estabilidade  
16 do DNA (EICHLER; SANKOFF, 2003). Segmentos com repetições purina/pirimidina ou  
17 polipirimidina/polipurina podem gerar alças durante a duplicação (do inglês, *slipped*  
18 *structures*) (WELLS, 2007), as quais geram estagnação da duplicação e induzem *DSBs*  
19 (SZAMALEK et al., 2005), deixando as pontas propensas a rearranjos cromossômicos  
20 (SLIJEPCEVIC, 2016).

21 Arranjos *in tandem* das famílias gênicas, expansões de microssatélites e acúmulos  
22 de um determinado tipo de TE já foram caracterizados como estando próximos aos sítios  
23 de rearranjos cromossômicos (BAILEY et al., 2003; HUANG et al., 2008; CARBONE  
24 et al., 2009; CAZAUX et al., 2011; BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018).  
25 Entretanto, acredita-se que as sequências repetitivas atuariam apenas como facilitadores  
26 do rearranjo cromossômico devido ao fato de ocorrerem em inúmeros sítios  
27 cromossômicos de sequências parálogas (KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008).  
28 Estas sequências serviriam de ponto de ancoramento para os mecanismos de trocas de  
29 sequências não homólogas, promovendo a evolução em concerto, e/ou estariam  
30 envolvidos em fusão cromossômicas via mecanismo de união não homóloga (do inglês,  
31 *Non-Homologous End Joining – NHEJ*) (BAILEY; EICHLER, 2006).

32 Além disso, a propensão às quebras em regiões de ITS e a disfunção telomérica  
33 também são utilizados para explicar a plasticidade cromossômica (KILBURN et al.,

1 2001; PERRY *et al.*, 2004; BOLZÁN, 2012; SLIJEPCEVIC, 2016; BARROS *et al.*,  
2 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018). O telômero tem como função principal dar estabilidade  
3 às pontas lineares dos cromossomos. A formação da alça telomérica fornece proteção por  
4 prevenir que as pontas livres dos cromossomos sejam identificadas como quebras e,  
5 portanto, alvo dos mecanismos de reparo (DE LANGE, 2004). Os telômeros, ainda,  
6 permitem o correto ancoramento dos cromossomos à face interna da membrana nuclear  
7 (DE LANGE, 2015).

8 Algumas vezes, vestígios de sequências TTAGGG<sub>n</sub> são visualizadas em sítios  
9 intersticiais nos cromossomos e, a estes ITS são atribuídos pontos da ocorrência de  
10 rearranjos cromossômicos (MEYNE *et al.*, 1990), como os eventos Robertsonianos. ITS  
11 também são propícias às quebras cromossômicas (SLIJEPCEVIC *et al.*, 1997) e estudos  
12 demonstraram que a disfunção do DNA telomérico é irreparável e desencadeia uma  
13 resposta de dano persistente do DNA (FUMAGALLI *et al.*, 2012).

14 Há diferentes tipos de ITS, como o *heterochromatic* ITS (het-ITS), composto por  
15 grandes blocos de DNA telomérico. Estão presentes principalmente nas regiões  
16 pericentroméricas ou centroméricas dos cromossomos, considerados como regiões  
17 instáveis propensas a eventos de fissão e inversão, além de representarem possíveis  
18 pontos em que novos telômeros podem surgir, a partir das sequências teloméricas pré-  
19 existentes (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2008). Os ITS pequenos ou *short*-ITS (s-ITS) são  
20 trechos com números limitados de hexâmeros teloméricos distribuídos em posições  
21 internas e presentes em todos vertebrados. Eventos de s-ITS podem ser explicados por  
22 repetições teloméricas que são inseridas pela telomerase em sítios intra-cromossômicos  
23 durante mecanismos de reparo ao DNA dupla fita (AZZALIN *et al.*, 2001; RUIZ-  
24 HERRERA *et al.*, 2008).

25 Estudos já evidenciaram o envolvimento dos DNAr em rearranjos cromossômicos  
26 em Loricariidae (ROSA *et al.*, 2012; PRIMO *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2017;  
27 GLUGOSKI *et al.*, 2018; DEON *et al.*, 2020, 2022a, b). Em *Rineloricaria*, a presença de  
28 sítios terminais de DNAr em cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos favoreceram  
29 os eventos de fusões Rb, visto que estas regiões repetitivas apresentam um maior grau de  
30 descondensação (PRIMO *et al.*, 2017). Além disso, em genomas de alguns gêneros de  
31 Loricariidae são encontradas evidências de pseudogenes de DNAr 5S atuando em pontos  
32 quentes para as quebras cromossômicas (BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*,  
33 2018). A associação de ITS e cópias de rDNA 5S colocalizadas foram determinadas por

1 hibridação *in situ* em pontos de fusão Rb nos gêneros *Rineloricaria* (ROSA et al., 2012;  
2 PRIMO et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018) e *Ancistrus* (FAVARATO et al., 2016;  
3 BARROS et al., 2017). Glugoski e colaboradores (2018) caracterizaram duas sequências  
4 do DNAr 5S em *R. latirostris*, denominadas como DNAr 5S e DNAr 5S degenerado. A  
5 sequência 5S degenerada apresentou a invasão de um segmento parcial do TE *hAT* interno  
6 no DNAr 5S. Este segmento parcial do TE *hAT* detém um segmento de expansão TAA  
7 característico, o qual poderia apresentar conformação de DNA não B e gerar sítios DSBs.  
8 Essas DSBs podem desencadear mecanismos de NHEJ para reparo e, durante este  
9 mecanismo, gerar fusões cromossômicas (GLUGOSKI et al., 2018). Assim, o DNAr 5S  
10 degenerado, colocalizado a um ITS, poderia ter contribuído para eventos de fusão Rb e  
11 diminuição do 2n na espécie estudada (GLUGOSKI et al., 2018).

12 Por sua vez, no gênero *Ancistrus*, Barros e colaboradores (2017) também  
13 caracterizaram uma cópia de pseudogene do DNAr 5S, denominado como DNAr 5S.2,  
14 em um provável sítio propenso a quebras cromossômicas. Mecanismos de recombinação  
15 não homóloga e NHEJ explicariam a evolução em concerto das cópias DNAr 5S.2 entre  
16 os inúmeros sítios cromossômicos, que levaram a fusão Rb e redução do 2n da espécie  
17 analisada. Porém, pouco ainda se sabe quais os tipos de DNAs repetitivos e como são  
18 originados os eventos de fissão/fusão cromossômica neste grupo de peixes, sendo  
19 importante uma investigação mais apurada destas sequências neste grupo de peixes.

## **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Loricariidae é um alvo constante de estudos citogenéticos, pois no geral os membros da família apresentam uma alta plasticidade de  $2n$  e fórmulas cariotípicas, decorrentes de rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da história evolutiva das espécies. Dada a participação de diversas classes de DNAs repetitivos na evolução cromossômica do grupo, o objetivo deste trabalho foi a descrição citogenética, mapeamento cromossômico e caracterização molecular de sequências de DNAs repetitivos localizadas em possíveis pontos de quebra, visando assim a compreensão de parte dos mecanismos responsáveis pela diversificação do  $2n$  encontrado no grupo. Assim, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Realizar uma análise citogenética comparativa entre espécies de *A. cf. multispinis* e *A. aguaboensis*, as quais apresentam  $2n$  distintos, visando a compreensão da evolução cromossômica associada a dispersão dos rDNAs;
- Analisar a composição de unidades de repetição no genoma de *R. latirostris*, bem como o envolvimento destas sequências em sítios instáveis propensos a quebras e rearranjos cromossômicos em espécies com  $2n = 46$  e  $2n = 48$  cromossomos;
- Caracterizar citogeneticamente exemplares de *R. pentamaculata* apresentando polimorfismo cromossômico numérico ( $2n = 54 - 56$ ), além da descrição de sequências repetitivas envolvidas na origem da fusão cêntrica entre pares acrocêntricos que podem ter culminado na diversificação cromossômica deste grupo.



# **MATERIAL E MÉTODOS**

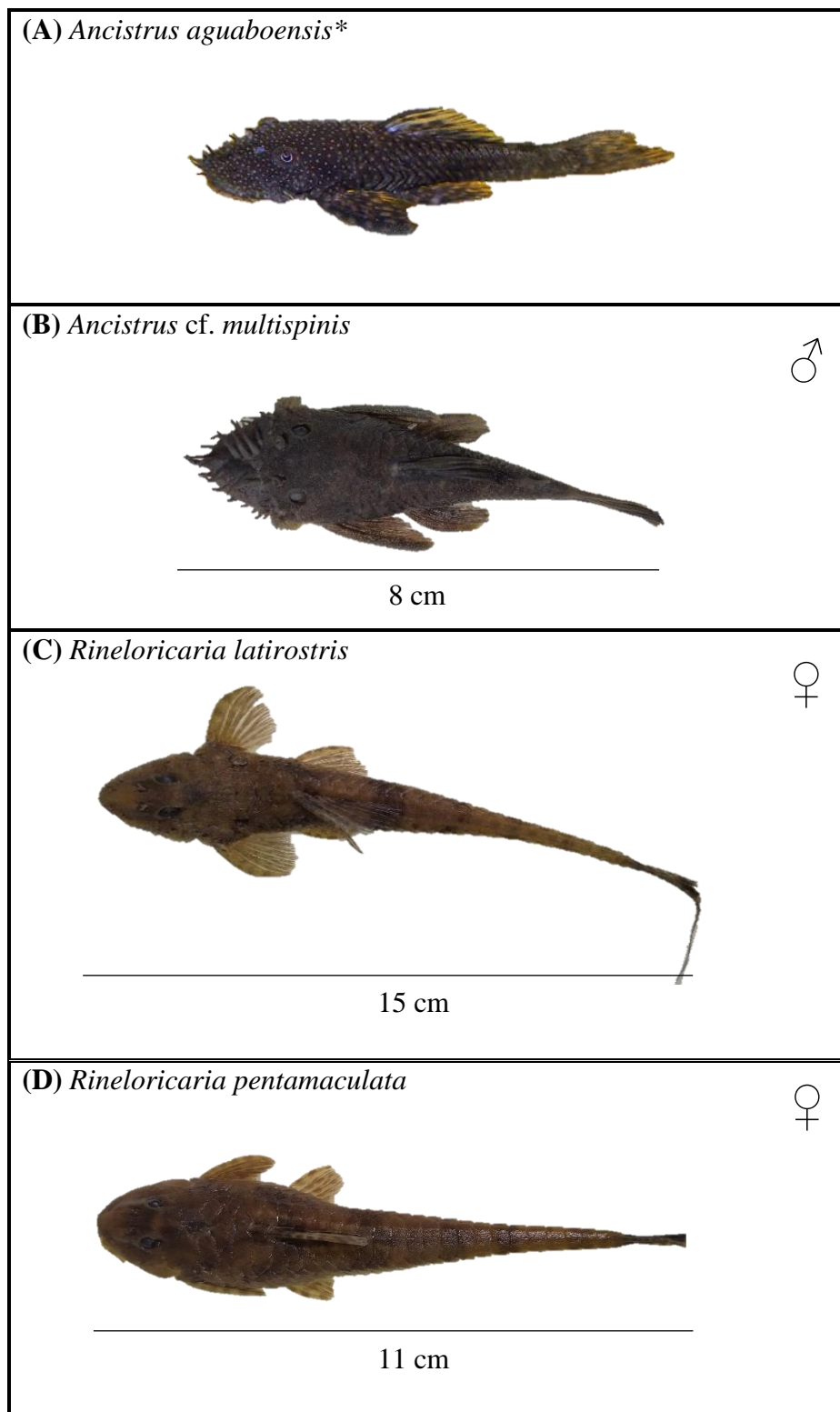
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material biológico

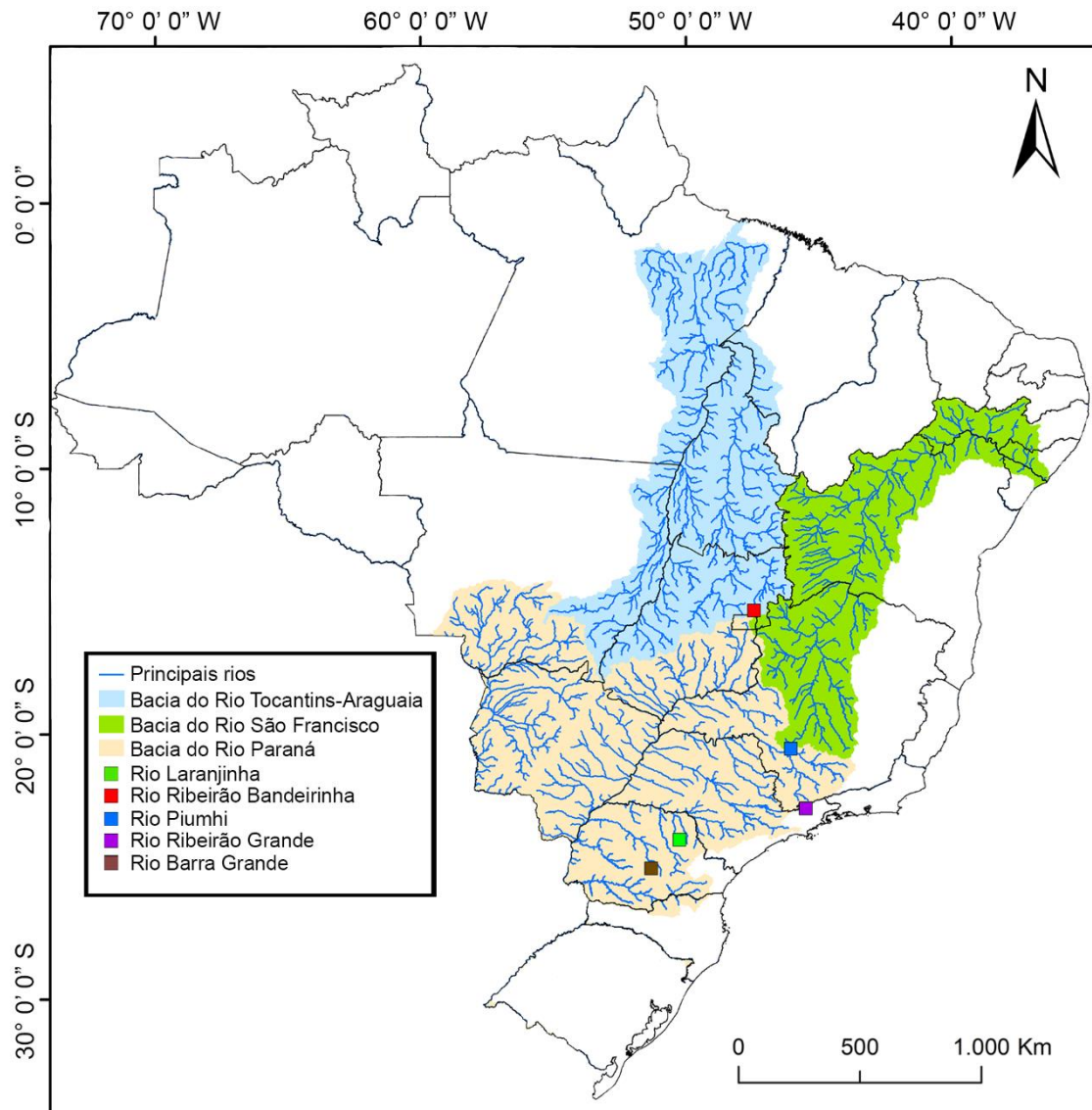
Foram analisadas citogeneticamente espécimes dos gêneros *Ancistrus* (n = 45) e *Rineloricaria* (n = 50) pertencentes à família Loricariidae (Tabela 1, Figura 2). Fizeram parte do estudo peixes pertencentes a três Bacias Hidrográficas brasileiras: Bacia do Rio Tocantins-Araguaia, Bacia do rio São Francisco e Bacia do Rio Paraná (Figura 3). Os peixes foram capturados com auxílio de redes de arrasto, tarrafas, peneiras e transportados vivos para o Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função da Universidade Estadual de Ponta Grossa ou para o Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Federal de São Carlos. As coletas estão de acordo com o Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (MMA/IBAMA/SISBIO/ICMBio: licenças para coleta de material zoológico 15117-1 e 10538-4). No laboratório, estes animais foram triados e mantidos em aquários para os procedimentos de identificação morfológica e citogenética. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 0227067) da Universidade Estadual de Ponta Grossa e na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (CQB No. 0063/98). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia (NUP)- Universidade Estadual de Maringá; na Coleção de peixes da Universidade Estadual Paulista – DZSJRP; e, na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo -MZUSP, Brasil (Tabela 1).

**Tabela 1-** Relação das espécies de Loricariidae analisadas neste estudo, bem como a sua descrição citogenética e locais de coleta. 2n = número diploide; NF = número fundamental; ♀ = número de fêmeas; ♂ = número de machos.

Espécies	2n	NF	♀	♂	Fórmula cariotípica	Localidade	Número voucher
<i>Ancistrus aguaboensis</i> Fisch-Muller, Mazzoni & Weber, 2001	50	80	10	10	16m+10sm+4st+20a	Rio Ribeirão Bandeirinha, bacia do rio Tocantins (Formosa-GO, 15°19'25" S e 47°25'26" W)	NUP 22305
<i>Ancistrus cf. multispinis</i> (Regan, 1912)	52	84	13	12	16m+10sm+6st+20a	Rio Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul (Pindamonhangaba-SP, 22°47'8" S e 45°27'19" W)	NUP 22308
<i>Rineloricaria latirostris</i> (Boulenger, 1900)	46	60	7	10	10m+4sm+32st/a	Rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas (Ventania-PR, 23°58'13" S e 50°14'01" W)	NUP 17140
<i>Rineloricaria latirostris</i> (Boulenger, 1900)	48	60	7	6	6m+6sm+36st/a	Rio Piumhi, bacia do rio São Francisco (Piumhi-MG, 20°31'55" S e 46°02'42" W)	DZSJRP-Pisces 10996
<i>Rineloricaria pentamaculata</i> Langeani & Araujo, 1994	54	64	3	4	6m+4sm+44st/a	Rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí (Prudentópolis-PR, 25°05'21" S e 50°57'22" W)	NUP 17141
	55	66	3	2	5m+4sm+46st/a		
	56	70	4	4	4m+4sm+48st/a		



**Figura 2-** Foto de exemplares de *Ancistrus* e *Rineloricaria* analisadas no presente estudo: (A) *Ancistrus aguaboensis* (Fonte: FROESE; PAULY, 1999), (B) *Ancistrus cf. multispinis* (C) *Rineloricaria latirostris* e (D) *Rineloricaria pentamaculata* (Fonte: arquivo pessoal). \* imagem de indivíduo sem identificação do sexo.



**Figura 3-** Mapa hidrográfico do Brasil com destaque para as bacias hidrográficas (bacia dos Rios Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná) e para os pontos de coleta das espécies analisadas no presente estudo. Mapa criado utilizando-se o ArcGis 10.5 e Adobe Photoshop CC 2020.

### 1 **3.2 Extração de DNA - SAMBROOK et al., 2001 (Método fenol-clorofórmio)**

2 Inicialmente, pequenos pedaços de fígado foram macerados e transferidos para um  
3 microtubo de 2,0 mL contendo 550 µL de solução de digestão (14 µL NaCl 5M, 35 µL  
4 EDTA 0,5M, 7 µL Tris-HCl 1M, 35 µL SDS 10%, 3,5 µL Proteinase K 20 mg/mL, 605,5  
5 µL H<sub>2</sub>O destilada). As amostras foram incubadas em banho maria a 55°C por  
6 aproximadamente 2 h, até a completa digestão do tecido. Em seguida, foram adicionados  
7 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e agitado suavemente por  
8 inversão durante 20 min. Após, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15  
9 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL no qual foram  
10 adicionados 40 µL de acetato de sódio (3M) e 1000 µL de etanol 100%. Logo após, as  
11 amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante.  
12 Foram adicionados 200 µL de etanol 70% em cada amostra, centrifugado por 5 min a  
13 10.000 rpm e descartado o sobrenadante. O tubo foi levado para secar na estufa a 37°C  
14 por aproximadamente 40 min. Após esse tempo, o DNA foi ressuspendido com 60 µL de  
15 H<sub>2</sub>O livre de nuclease e adicionado 3 µL de RNase. O tubo foi deixado em banho maria  
16 a 37°C durante 1 h. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C.

17

### 18 **3.3 Preparação dos cromossomos mitóticos – BERTOLLO; CIOFFI; MOREIRA-** 19 **FILHO, 2015**

20 Os animais foram submetidos à injeção de colchicina na região abdominal (1 mL de  
21 solução de colchicina a 0,0125% / 100 g de peso do animal) e aguardado um período de  
22 40 min foi realizada a anestesia dos indivíduos com uma solução de Benzocaína. O fígado  
23 foi armazenado em etanol absoluto para posterior realização de extrações de DNA.

24 Fragmentos de rim anterior foram transferidos para pequenas cubas de vidro,  
25 contendo cerca de 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C. O material foi  
26 divulsionado com uma seringa de vidro desprovida de agulha, puxando e eliminando-se  
27 várias vezes os fragmentos dos tecidos renais, garantindo uma suspensão celular  
28 homogênea. A suspensão obtida foi incubada em estufa a 37°C, durante 20 min, e então  
29 transferida com auxílio de uma pipeta Pasteur para um tubo de vidro. Foram adicionadas  
30 3 mL de fixador Carnoy, recém-preparado, na proporção 3:1 (metanol + ácido acético  
31 glacial). O material foi homogeneizado com uma pipeta Pasteur, com bastante cuidado, e  
32 centrifugado por 10 min a 900 rpm, descartando o sobrenadante. Foi adicionado ao tubo  
33 Falcon, 6 mL de fixador, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo. O material foi

1 homogeneizado com uma pipeta Pasteur e centrifugado por 10 min a 900 rpm. Este  
2 procedimento de fixação foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e  
3 eliminação do sobrenadante, foi adicionado aproximadamente 1,5 mL de fixador ao  
4 material celular contido no fundo do tubo fálcon, misturando-os bem. A suspensão celular  
5 foi então acondicionada em microtubo de 1,5 mL e armazenados em freezer.

6 As suspensões celulares obtidas foram analisadas em lâminas de vidro. Foram  
7 adicionadas 3 gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem  
8 limpa, aquecida em água a 55 - 60°C. O excesso de material foi retirado, inclinando  
9 levemente a lâmina sobre um papel de filtro. As lâminas foram secas diretamente ao ar e  
10 coradas com o corante Giemsa a 10% em tampão fosfato (pH 6,8) durante 8 min.

11

### 12 **3.4 Detecção da heterocromatina constitutiva – bandamento C – SUMNER, 1972** 13 **(com adaptações)**

14 As lâminas contendo o material celular foram tratadas em ácido clorídrico (HCl)  
15 0,2N, à 37°C, por 10 min, em seguida, lavadas em água corrente e secas ao ar. Após esse  
16 processo, o material foi incubado em uma preparação de hidróxido de Bário (Ba (OH)<sub>2</sub>)  
17 a 5%, recém preparada e filtrada, a 42°C, durante 3 min. As lâminas foram submersas em  
18 uma solução de ácido clorídrico 0,2N a 42°C e lavadas em água corrente, para retirar  
19 qualquer resquício de Ba (OH)<sub>2</sub>. O material foi incubado em uma solução salina 2xSSC,  
20 a 60°C, durante 50 min. Após esse processo, as lâminas foram lavadas em água corrente  
21 e coradas com solução de Giemsa a 10%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 7 min.

22

### 23 **3.5 Detecção da região organizadora de nucléolo (RON)- HOWELL, BLACK, 1980**

24 Foram adicionadas, sobre as preparações cromossômicas, 3 gotas de solução de  
25 gelatina (1%) e 6 gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50%). Misturou-se  
26 levemente com a ponta de uma lamínula. Após esse processo, a lâmina foi coberta com  
27 uma lamínula e mantida em estufa a 60°C, o tempo necessário para que os cromossomos  
28 e núcleos assumam uma coloração amarelada e os nucléolos e as RONS uma coloração  
29 quase preta, aproximadamente por 4 min. Depois disso, foi realizada a remoção da  
30 lamínula com um jato de água destilada e deixadas secar ao ar. O material foi corado com  
31 solução de Giemsa a 1%, durante 1 min.

## 3.6 Obtenção das sondas

### 3.6.1 Sondas de DNAr 5S, DNAr 18S e TE *hAT*

As sondas do DNAr 5S foram marcadas por meio da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* -PCR), utilizando-se o DNA genômico das espécies como molde, além de um dNTP acoplado a uma molécula repórter, a digoxigenina 11-dUTP (Jena Bioscience). Para a marcação das sondas foram utilizados os *primers*: 5Sa (5'- TACGCCCGATCTCGTCCGATC -3') e 5Sb (5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (MARTINS *et al.*, 1999), seguindo a reação: 40 ng de DNA molde, tampão de reação 1X (contendo 200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de dUTP 11-digoxigenina, 1 μM primer 5Sa, 1 μM primer 5Sb e 2 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). As reações foram deixadas em um termociclador (Mastercycler® nexus – Eppendorf) de acordo com as seguintes condições: 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 45 s a 56°C e 2 min a 72°C, com 7 min de extensão final a 72°C (BARROS *et al.*, 2017).

A sonda do DNAr 18S, isolada a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI Jr, 2004), foi marcada com biotina pela técnica de *nick translation*, utilizando-se a biotina 16 - dUTP (“*Biotin16 NT Labeling Kit*” - Jena Bioscience).

A sonda do TE *hAT*, isolada de *R. latirostris* (rio Laranjinha) foi marcada por PCR utilizando a biotina16- dUTP, segundo protocolo descrito por GLUGOSKI *et al.* (2018).

### 3.6.2 Sondas de microssatélites e minissatélite (TTAGGG)<sub>n</sub>

A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> foi obtida por PCR, segundo Ijdo *et al.* (1991), de acordo com a seguinte reação: tampão de reação 1X (contendo 200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, dGTP e dCTP, 280 μM de dTTP, 120 μM de digoxigenina 11-dUTP e biotina 16- dUTP, 0,2 μM de cada *primer* (TTAGGG)<sub>5</sub>/(CCCTAA)<sub>5</sub> e 2 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Foram realizadas duas condições de amplificação, sendo a primeira amplificação realizada com baixa estrigência: 4 min a 94°; 12 ciclos (1 min a 94°C, 45s a 52°C e 1 min e 30s a 72°C); seguidos por 35 ciclos de alta estrigência: 1 min a 94°C, 1 min e 30 s a 60°C e 1 min e 30 s a 72°C.



1 Os microssatélites (A)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CAT)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GAG)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub> e  
2 (GAA)<sub>10</sub> foram marcados diretamente com digoxigenina Cy3 na extremidade 5' durante  
3 a sua síntese pela VBC-Biotech (Viena, Áustria).

### 4 5 **3.7 Mapeamento cromossômico**

#### 6 7 **3.7.1 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) - PINKEL *et al.*, 1986.**

8 Inicialmente, as lâminas foram lavadas em tampão PBS 1X, durante 5 min, em  
9 temperatura ambiente, seguidas por desidratação em série alcóolica em etanol gelado  
10 70%, 85% e 100%, por 5 min cada. As lâminas foram então secas e submetidas ao pré-  
11 tratamento com RNase (100 µL/lâmina – 0,4% RNase/2XSSC) em câmara úmida a 37°C  
12 por 1 h. Após este período, as lâminas foram lavadas em 2X SSC por 5 min, esse processo  
13 foi repetido por 3 vezes seguidos por 3 lavagens em PBS 1X durante 5 min e incubadas  
14 em solução de pepsina 0,005% por 20 min a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas  
15 novamente em PBS 1X por 5 min e incubadas em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM  
16 MgCl<sub>2</sub> por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em  
17 PBS 1X por 5 min, seguida de série alcóolica e desnaturação dos cromossomos em  
18 formamida 70%/ 2X SSC por 8 min a 70°C. Após a desnaturação, o material foi  
19 desidratado em série alcóolica em etanol gelado. As lâminas, depois de secas, foram  
20 cobertas com o mix de hibridação (de 150-500 ng de cada sonda, 50% formamida, 2X  
21 SSC, 10% sulfato dextrano, volume final 50 µL), o qual foi desnaturado a 100°C, por 10  
22 min e em seguida, colocados em gelo por 5 min. A hibridação foi realizada no período de  
23 16 h, a 37°C, em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em Tween  
24 0,5%/4X SSC durante 20 min. As lâminas foram incubadas em tampão 5% NFDm/4X  
25 SSC por 15 min, seguidas de mais duas lavagens de Tween 0,5%/4X SSC por 5 min. A  
26 detecção dos sinais de hibridação foi realizada usando uma solução composta por *alex*  
27 *fluor 488 streptavidin* (Molecular Probes) e *anti-digoxigenin-rhodamine* (Roche), por 1  
28 h em câmara úmida e escura. As lâminas foram lavadas 3 vezes com Tween 0,5%/4X  
29 SSC por 5 min, seguida por uma série alcóolica. Os cromossomos foram contra-corados  
30 com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em  
31 microscópio de epifluorescência Olympus BX51 acoplado ao sistema de captura de  
32 imagens DP-72 (Olympus).

### 3.7.2 Análises cariotípicas

Foram analisadas cerca de 30 metáfases em cada ensaio de FISH, e escolhidas as melhores imagens para organização cariotípica. Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964). Para a determinação do número fundamental (NF), para os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados dois braços cromossômicos, enquanto para os cromossomos acrocêntricos, foram considerados um único braço.

## 3.8 Clonagem das sequências de DNAs repetitivos

### 3.8.1 Ligação de fragmentos de DNA a vetores de clonagem

Os produtos de PCR das sequências de DNAr 5S, isolados de cada espécie, foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (kit pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System - Promega), de acordo com as especificações do fabricante. Na reação foram utilizados 150 ng do fragmento de DNA de interesse (produto de PCR purificado), 5 µL de tampão de ligação 2x, 1 µL da enzima T4 ligase (3U), 1 µL do vetor (50 ng) e volume suficiente de H<sub>2</sub>O livre de nuclease para 10 µL. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e incubada a 4°C, por cerca de 16 h.

### 3.8.2 Transformação de bactérias competentes e seleção de colônias recombinantes

O produto da ligação foi adicionado aos tubos contendo as bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes, as quais foram previamente tratadas com CaCl<sub>2</sub>. Os tubos foram submetidos a um choque térmico a 42°C, por 90 s, e transferidos para o gelo, onde permaneceram por mais 1 min. Em seguida foram adicionados a cada tubo 800 µL de meio LB líquido a temperatura ambiente. Os tubos foram incubados a 37°C, por 1 h. Depois, os tubos foram centrifugados, por 2 min, a 5.000 rpm. Descartou-se 600 µL do meio líquido e o produto da transformação foi ressuspensionado no restante do meio líquido, e espalhado em placas de Petri estéreis, contendo meio de cultura LB ágar, ampicilina 100 mg/mL (1 µL /mL de meio sólido), 50 µL de IPTG (200 mM) e 40 µL de X-Gal (0,2%). As placas foram incubadas por 16 h em estufa a 37°C e as colônias de coloração branca, potencialmente portadoras do inserto de interesse nos plasmídios, foram selecionadas.

### 3.8.3 Mini-preparação plasmidial

As colônias brancas selecionadas foram transferidas com o auxílio de um palito autoclavado para um tubo fálcon contendo 3 mL de meio de cultura líquido LB, acrescido de ampicilina. Os tubos foram levados ao shaker com rotação de 200 rpm por 16 h a 37°C. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada em microtubos de 1,5 ml por 1 min em velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais 2 vezes. O precipitado foi ressuscitado com 400 µL do tampão de lise - solução I (60 µL de RNase, 300 µL de Tris-HCl 1M, 60 µL de EDTA 0,5M, 2580 µL de H<sub>2</sub>O) e misturado vigorosamente. Após, 400 µL da solução II (600 µL de NaOH 1M, 300 µL de SDS 10%, 2100 µL de H<sub>2</sub>O) foi adicionado, invertendo-se o tubo por 15 vezes. Após esse processo, foi adicionado 400 µL da solução III (1800 µL de acetato de potássio 5M, 345 µL de ácido acético, 855 µL de H<sub>2</sub>O) em cada tubo e invertido por mais 15 vezes. O tubo foi centrifugado por 5 min, em velocidade máxima, separando-se o sobrenadante dos resíduos sólidos, que foram descartados. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 200 µL de isopropanol gelado, incubado por 10 min a temperatura ambiente e centrifugado por 10 min em velocidade máxima. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 70% gelado foi adicionado em cada tubo seguido por centrifugação em velocidade máxima durante 5 min. Esse processo foi repetido mais uma vez, com a adição de etanol 100% gelado. O tubo foi seco em estufa a 37°C por aproximadamente 30 min. Em seguida, o precipitado foi ressuscitado em 20 µL de água livre de nuclease, e então realizada a quantificação e armazenado em freezer a -20°C.

### 3.9 Sequenciamento e análise das sequências de DNA

Os clones obtidos foram enviados para sequenciamento (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). Em um microtubo de 0,6 mL, foram adicionados 100 a 250 ng de DNA molde dos clones produzidos, 4,5 pmol de *primer*, e H<sub>2</sub>O ultrapura (Mili-Q) para completar um volume final de 6 µL. As sequências obtidas foram editadas usando BIOEDIT 5.0.9 (HALL, 1999) e submetidas a análise de identidade no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Rfam (<https://rfam.xfam.org/>) e CENSOR ([www.girinst.org/censor/index.php](http://www.girinst.org/censor/index.php)).

### 1 **3.10 Sequenciamento *Next Generation* e análise de sequências repetitivas**

2 Foi realizado sequenciamento em plataforma *Next Generation* Illumina Hi-seq  
3 com o DNA genômico total de *R. latirostris* do rio Laranjinha (espécie com indicativo de  
4 fusão cêntrica,  $2n = 46$ ), com o objetivo de identificação do conteúdo de DNAs  
5 repetitivos. O produto do sequenciamento foi filtrado usando o software FASTX-Toolkit  
6 e submetido a montagem utilizando o software Velvet (ZERBINO, BIRNEY, 2008). A  
7 descrição estatística da montagem dos *contigs* foi realizada utilizando o Perl Script  
8 *Assemblathon\_stats.pl* (BRANDAM et al., 2013). As sequências repetitivas foram  
9 anotadas utilizando a plataforma RepeatMasker (SMIT et al., 2013-2015). Para as  
10 análises dos DNAs repetitivos foi utilizado como referência o genoma de *Danio rerio* e  
11 busca lenta, a qual é 0-5% mais sensível.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1 **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

2 Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se organizados na forma de  
3 capítulos, os quais correspondem aos 3 artigos científicos listados abaixo e que já se  
4 encontram publicados, submetidos ou em fase de preparação. A versão publicada dos  
5 mesmos pode ser encontrada anexo a esta tese.

### **Capítulo 1 – *publicado*: Neotropical Ichthyology**

Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae)

### **Capítulo 2 – *aceito para publicação*: Genome**

Enriched tandemly repeats in chromosomal fusion points of *Rineloricaria latirostris*  
(Boulenger, 1900) (Siluriformes: Loricariidae).

### **Capítulo 3 – *em preparação***

Caracterização do sítio de fusão Robertsoniana em *Rineloricaria pentamaculata*  
(Siluriformes: Loricariidae): envolvimento de sequências rDNA 5S e satélites

### **Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae)**

Larissa Glugoski, Geize Deon, Stephane Schott, Marcelo R. Vicari, Viviane Nogaroto, Orlando Moreira-Filho

**Neotropical Ichthyology** <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0013>

#### **Abstract**

*Ancistrus* is a specious genus of armored catfishes that has been extensively used for cytogenetic studies in the last 17 years. A comparison of the extensive karyotypic plasticity within this genus is presented with new cytogenetic analysis for *Ancistrus* cf. *multispinis* and *Ancistrus aguaboensis*. This study aims to improve our understanding of chromosomal evolution associated with changes in the diploid number ( $2n$ ) and the dispersion of ribosomal DNAs (rDNAs) within *Ancistrus*. *Ancistrus* cf. *multispinis* and *A. aguaboensis* exhibit  $2n$  of 52 and 50 chromosomes, respectively. Given that *A. cf. multispinis* shares a  $2n = 52$  also found in Pterygoplichthyini, the sister group for Ancistrini, a Robertsonian (Rb) fusion event is proposed for the  $2n$  reduction in *A. aguaboensis*. 5S rDNAs pseudogenes sites have already been associated with Rb fusion in *Ancistrus* and our analysis suggests that the  $2n$  reduction in *A. aguaboensis* was triggered by double strand breaks (DSBs) and chromosomal rearrangements at 5S rDNA sites. The presence of evolutionary breakpoint regions (EBRs) into rDNA cluster is proposed to explain part of the Rb fusion in *Ancistrus*. Cytogenetic data presented extends the diversity already documented in *Ancistrus* to further understand the role of chromosomal rearrangements in the diversification of Ancistrini.

**Keywords:** Armored catfish, FISH, 5S rDNA, 18S rDNA, telomeric sequence

## 1 1. INTRODUCTION

2 Loricariidae is the largest family of the Siluriformes, which includes about 1.000  
3 species distributed in the Neotropical region, and comprises fishes vulgarly called as  
4 armored catfishes (FRICKE et al., 2020). It consists of six subfamilies: Delturinae,  
5 Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae and Rhinelepininae  
6 (ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006). The former subfamily Ancistrinae was  
7 considered synonymous with Hypostominae by Armbruster (2004) and, currently,  
8 Hypostominae presents 483 valid species (FRICKE et al., 2020), grouped in the tribes:  
9 Corymbophanini, Rhinelepinini, Hypostomini, Pterygoplichthyini and Ancistrini  
10 (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN et al., 2015). In a systematic review study, Ancistrini  
11 was proposed to possess ten genera considered valid (LUJAN et al., 2015). Previously,  
12 this tribe was distributed in a larger number of genera which ones were found to be  
13 paraphyletic, and is therefore restricted to a weakly supported clade (LUJAN et al., 2015).  
14 Currently, Ancistrini remains a clade rich in genera and with a high morphological  
15 diversity (LUJAN et al., 2015), which presents constant systematic reformulations and  
16 with a lot of undescribed species waiting for scientific validation.

17 Pterygoplichthyini was considered sister group for Ancistrini (AMBRUSTER,  
18 2004) and cytogenetic data demonstrated  $2n$  of 52 chromosomes in Pterygoplichthyini  
19 species (ALVES et al., 2006). Previous cytogenetic studies in Ancistrini also showed a  
20 large number of species with  $2n = 52$  chromosomes, predominantly of meta and  
21 submetacentric chromosomes (ARTONI, BERTOLLO, 2001; de OLIVEIRA et al.,  
22 2006). Based on phylogenetic relationships of Hypostominae proposed by Lujan et al.  
23 (2015), and considering the presence of  $2n = 52$  chromosomes in Pterygoplichthyini, the  
24 sister group for Ancistrini, Bueno et al. (2018) suggested that the putatively ancestral  
25 condition for Ancistrini is a diploid number of 52 chromosomes, from which  
26 chromosomal diversification occurred to explain the observed karyotypic plasticity  
27 among studied species.

28 *Ancistrus* is the specious genus of Ancistrini and is widely distributed in South  
29 America (FERRARIS, 2007; ARMBRUSTER, 2008; LUJAN et al., 2013). In this tribe,  
30 only *Ancistrus* species presents a diversified condition from  $2n = 52$  chromosomes, with  
31 a higher frequency of acrocentric chromosomes (de OLIVEIRA et al., 2007, 2008, 2009;  
32 MARIOTTO et al., 2009, 2011; KONERAT et al., 2015; FAVARATO et al., 2016;  
33 BARROS et al., 2017; BUENO et al., 2018). Cytogenetic data in *Ancistrus* revealed a



1 diversity of 2n and karyotype formulas (details of available *Ancistrus* cytogenetic data  
2 can be found in Tab. 1), which range from 2n = 34 to 54 chromosomes (MARIOTTO et  
3 *al.*, 2011). In addition, different heteromorphic sex chromosome systems are found in the  
4 genus, such as: XX/X0, XX/XY, XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, ZZ/ZW and Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>. In  
5 *Ancistrus*, with the exception of species with 2n = 52 and 54 chromosomes, it was  
6 suggested a reduction in 2n via Rb fusion events (de OLIVEIRA et *al.*, 2007, 2008, 2009;  
7 MARIOTTO et *al.*, 2009, 2011; KONERAT et *al.*, 2015; FAVARATO et *al.*, 2016;  
8 BARROS et *al.*, 2017) and structural chromosomal changes, such as inversions,  
9 translocations, deletions and duplications (MARIOTTO et *al.*, 2011).

10 In addition to *Ancistrus*, other members of Loricariidae present species with 2n  
11 reduction via Rb fusions, when vestiges of interstitial telomeric sites (ITS) can be  
12 visualized in some karyotypes (ROSA et *al.*, 2012; ERRERO-PORTO et *al.*, 2014;  
13 FAVARATO et *al.*, 2016; BARROS et *al.*, 2017; PRIMO et *al.*, 2017; GLUGOSKI et  
14 *al.*, 2018). Some of these Rb events were associated with the presence of EBRs inside 5S  
15 and 45S rDNAs sites, which triggered breaks and chromosomal reorganizations (ROSA  
16 et *al.*, 2012; BARROS et *al.*, 2017; PRIMO et *al.*, 2017; GLUGOSKI et *al.*, 2018).  
17 However, the presence of other repetitive DNA sequences, able of explaining the  
18 occurrence of other EBRs in the Loricariidae genomes, still remain uncertain (PRIMO et  
19 *al.*, 2018).

20 Repetitive DNAs are organized as grouped blocks (microsatellites, mini-satellites,  
21 satellites and multigene families) or are dispersed (transposons and retrotransposons) on  
22 the chromosomes (CHARLESWORTH, 1994). These repetitive sequences have been  
23 shown to be fundamental in studies related to genomic evolution (MAXON et *al.*, 1983;  
24 CHARLESWORTH et *al.*, 1994; VICARI et *al.*, 2010). Multigene families of rRNAs are  
25 composed of repetitions organized in tandem (LONG, DAWID, 1980). They constitute  
26 two gene families with different loci in the karyotypes: the major rDNA 45S comprises  
27 the genes that encode the 18S, 5.8S and 28S rRNAs; while the minor rDNA codifies the  
28 5S rRNA (LONG, DAWID, 1980). *In situ* localization of rDNA sites showed that the  
29 dispersion and distribution of these repetitive DNAs may have contributed to genomic  
30 diversification and chromosomal remodeling among armored catfish (ROSA et *al.*, 2012;  
31 ERRERO-PORTO et *al.*, 2014; BARROS et *al.*, 2017; PRIMO et *al.*, 2017; GLUGOSKI  
32 et *al.*, 2018).

1           Cytogenetic studies contribute to taxonomy by demonstrating difference in  
2 karyotypes of cryptic species (VICARI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016; BARBOSA  
3 et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018) or by detecting synonym species  
4 (BELLAFRONTTE et al., 2005). Given the morphological similarity present in some  
5 members of *Ancistrus* and the occurrence of a lot of scientific undescribed species in the  
6 scientific literature, the taxonomy of the group has been suffered numerous  
7 reformulations (de OLIVEIRA et al., 2009; LUJAN et al., 2015). In this study, the  
8 cytogenetic data of two species of *Ancistrus* were described and compared in order to add  
9 information to understand the chromosomal evolution in the genus and contribute to  
10 taxonomic and systematic aspects.

## 1 2. MATERIAL AND METHODS

### 2 2.1 Species analyzed

3 Twenty-five specimens (13 males and 12 females) of *Ancistrus* cf. *multispinis*  
4 (Regan, 1912) from Ribeirão Grande river, Paraíba do Sul basin (Pindamonhangaba-SP,  
5 22°47'8" S and 45°27'19" W) and 20 specimens (10 males and 10 females) of *Ancistrus*  
6 *aguaboensis* Fisch-Muller, Mazzoni, Weber, 2001 from Bandeirinha river, Tocantins  
7 basin (Formosa-GO, 15°19'25" S and 47°25'26" W) were cytogenetically analyzed.  
8 Specimens were deposited in the Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em  
9 Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) of the Universidade Estadual de Maringá,  
10 Maringá, Brazil (voucher numbers: *Ancistrus aguaboensis*, NUP 22305; *Ancistrus* cf.  
11 *multispinis*, NUP 22308).

12

### 13 2.2 Conventional cytogenetic procedures

14 The chromosomes were obtained from the air-drying method according to  
15 Bertollo *et al.* (2015). Detection of the constitutive heterochromatin was performed by C-  
16 banding according to Sumner (1972) and the nucleolar organizer regions (NORs) were  
17 detected by silver nitrate staining (HOWELL, BLACK, 1980). For karyotype assembly,  
18 homologs chromosomes were paired and grouped into metacentric (m), submetacentric  
19 (sm), subtelocentric (st) and acrocentric (a), according to Levan *et al.* (1964). To establish  
20 the fundamental number (FN), we considered the m, sm and st chromosomes as two arms,  
21 and acrocentric chromosomes were considered as a single arm. About 30 cells with  
22 chromosomes in metaphase were analyzed for each species/method.

23

### 24 2.3 DNA extraction and isolation of repetitive DNAs

25 Genomic DNA was extracted from liver using Phenol-Chloroform method  
26 (SAMBROOK *et al.*, 2001). Genomic DNA of both species was used as template in  
27 Polymerase Chain Reactions (PCRs) to obtain 5S rDNA sequences, using the following  
28 primers: 5Sa (5'- TACGCCGATCTCGTCCGATC -3') and 5Sb (5'-  
29 CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (MARTINS *et al.*, 1999). The amplification  
30 reaction followed Barros *et al.* (2017) protocol. Agarose gel electrophoresis evidenced

1 DNA fragments of approximately 1200 bp, which were isolated (“PCR DNA and Gel  
2 Band Purification Kit” - GE Healthcare) and cloned (“InsTAclone PCR Cloning Kit” -  
3 Promega), following the manufacturers’ instructions. The 5S rDNA clones were  
4 sequenced (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). The obtained  
5 sequences were analyzed by BIOEDIT 5.0.9 (HALL, 1999), then submitted to an identity  
6 analysis on BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Rfam (<https://rfam.xfam.org/>)  
7 and CENSOR ([www.girinst.org/censor/index.php](http://www.girinst.org/censor/index.php)).

8

## 9 **2.4 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)**

10 The FISH procedures were performed following Pinkel et al. (1986) protocol,  
11 with stringency ~77% (2.5 ng/μL probe, 50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate,  
12 at 37 °C for 16 h). It was used the following probes: 18S rDNA (HATANAKA, GALETTI  
13 JUNIOR, 2004), 5S rDNA (1200 bp DNA fragment amplified by PCR) and the general  
14 telomeric sequence of vertebrates (TTAGGG)<sub>n</sub> (IJDO et al., 1991). The probes 5S rDNA  
15 and (TTAGGG)<sub>n</sub> were labeled by PCR using digoxigenin 11-dUTP (Jena Bioscience);  
16 18S rDNA probe was labeled with biotin through the nick translation technique  
17 (“Biotin16 NT Labeling Kit” - Jena Bioscience). For signal detection, the antibodies  
18 Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) and antidigoxigenin-rhodamine (Roche  
19 Applied Science) were applied. Chromosomes were counterstained with 4',6-diamidino-  
20 2-phenylindole (DAPI 0.2 μgmL<sup>-1</sup>) in mounting medium Vectashield (Vector) and  
21 analyzed under an epifluorescence microscope Olympus BX51, coupled to the Olympus  
22 DP-72 camera with the DP2-BSW software. The best images were photographed, and  
23 karyotypes edited using Adobe Photoshop CS6.

### 1 3. RESULTS

#### 2 3.1 Karyotypic description

3 *Ancistrus aguaboensis* presented  $2n = 50$  chromosomes, a karyotype formula  
4 arranged in  $16m+10sm+4st+20a$ ,  $FN = 80$  and, without sex chromosome heteromorphism  
5 (Fig. 1A). C-banding revealed blocks of constitutive heterochromatin located on the  
6 centromeric and terminal regions of all chromosomes, in addition to one block on the  
7 pericentromeric region for the pair  $m\ 2$ , on the interstitial long arm of the  $sm\ 9$  and a large  
8 block on the terminal region of one member of the chromosome pair 18 (Fig. 1B). NORs  
9 sites were located on the short arms of acrocentric pair 25 (Fig. 1B, box). *Ancistrus* cf.  
10 *multispinis* presented  $2n = 52$  chromosomes, a karyotype formula arranged in  
11  $16m+10sm+6st+20a$ ,  $FN=84$  and, no heteromorphism of sex chromosomes was detected  
12 (Fig. 1C). The heterochromatin bands were located on the subterminal regions of the short  
13 arms of chromosomes pairs 1, 2, 3 and 10; in addition to blocks of heterochromatin on  
14 the subterminal regions of the long arms of chromosomes pairs 13, 17, 18 and 20, on the  
15 interstitial region of chromosome pair 23, and on one member of each homologs  
16 chromosome pairs 25 and 26 (Fig. 1D). NORs sites were visualized on the short arms of  
17 the acrocentric pair 24 (Fig. 1D, box).

18

#### 19 3.2 *In situ* localization of rDNAs and telomeric sites

20 FISH mapping of 5S rDNA probe in chromosomes of *A. aguaboensis* showed  
21 three chromosomal sites: in pericentromeric regions of the short arms of chromosome  
22 pairs 2 and 25, and a subterminal site on the acrocentric 21 (Fig. 2A). *In situ* localization  
23 of 18S rDNA sites evidenced signals on the subterminal region of the short arms of  
24 chromosome pair 25, syntenic with 5S rDNA sites (Fig. 2A). FISH mapping of  
25 (TTAGGG) $_n$  sequence showed telomeres regions marked (Fig. 2B), without ITS vestiges.  
26 *In situ* localization of the 5S rDNA in *A. cf. multispinis* revealed sites on the subterminal  
27 regions of the short arms of acrocentric pairs 21 and 25, while 18S rDNA sites were  
28 located on the subterminal region of the short arms of acrocentric pair 24, which showed  
29 a variation in cistron size among the homologs (Fig. 2C). The FISH performed using  
30 telomeric sequence probes revealed only terminal chromosomal signals (Fig. 2D).

31

### 1 3.3 Analysis of 5S rDNA sequences

2 The 1193 bp-long 5S rDNA sequence obtained from *A. aguaboensis* (GenBank  
3 accession no. MT018470) presented 95% identity with 5S rDNA gene of *Symphysodon*  
4 sp. (GenBank accession no. KP715274.1). This sequence shows an 120 bp open reading  
5 frame (ORF), 1073 bp of the non-transcribed spacer (NTS), an internal promoter  
6 comprising box A (47 - 59 bp), the intermediate element (IE) and the box C (78 - 95 bp)  
7 and, a poli-T cluster (downstream from transcribed region), a TATA-like region (-36 to -  
8 33), a GC box (-17 to -15) and a Cytosin -1. The analyses using the CENSOR software  
9 revealed a 30 bp DNA fragment (1048 to 1078 bp) with 90.62% identity with the  
10 transposable element (TE) Helitron from *Oryza sativa* (HELITRON3\_OS). The 1082 bp-  
11 long 5S rDNA sequence obtained from *A. cf. multispinis* (GenBank accession no.  
12 MT018471) showed 98% identity with 5S rDNA from *Symphysodon* sp. (GenBank  
13 accession no. KP715274.1). This sequence presents an 120 bp ORF and a 962 bp NTS.  
14 The internal promoter comprising box A (47 - 59 bp), IE and the box C (79 - 96 bp). The  
15 poli-T cluster (downstream from transcribed region), the TATA-like region (-33 to -26),  
16 GC box (-17 to -16) and a Cytosin -1 were also detected. Analyses by CENSOR software  
17 revealed a 76 bp DNA fragment (736 to 812 bp) with 78.21% identity with the TE *hAT*  
18 from *Salmo salar* (*hAT-35N1\_SSa*). According to Rfam, the obtained 5S rDNAs have  
19 identity to 5S rRNAs between the segments 1-117, E-value =  $4.2^{-19}$  for *A. aguaboensis*  
20 and E-value =  $1.3^{-23}$  for *A. cf. multispinis*.

#### 1 4. DISCUSSION

2 Ancistrini and Hypostomini tribes show a wide range of  $2n$  and karyotypes among  
3 their representatives (BUENO *et al.*, 2012, 2018; TRALDI *et al.*, 2012; LORSCHIEDER  
4 *et al.*, 2018). Hypostomini presents high  $2n$  values and diversified karyotypes, whilst in  
5 Ancistrini, numerous species of *Ancistrus* tend for the  $2n$  reduction (MARIOTTO *et al.*,  
6 2011; BARROS *et al.*, 2017; BUENO *et al.*, 2018). *Ancistrus cf. multispinis* exhibits  $2n$   
7 = 52 chromosomes with half of the chromosomes carrying *st/a* morphology, while *A.*  
8 *aguaboensis* has  $2n = 50$  chromosomes and 48% of its are *st/a* chromosomes. Bueno *et al.*  
9 (2018) showed that species of *Ancistrus* with  $2n$  close to 52 chromosomes have about  
10 50% of *st/a* chromosomes in their karyotypes, while species with smaller  $2n$  have  
11 considerably lower amounts of chromosomes with this morphology. Corroborating this  
12 proposal, the occurrence of fusion events of *st/a* chromosomes leads to the formation of  
13 *m/sm* chromosomes, and consequent reduction of  $2n$  in some species of *Ancistrus*  
14 (MARIOTTO *et al.*, 2011; FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

15 *Ancistrus cf. multispinis* specimens (Ribeirão Grande, Paraíba do Sul basin)  
16 analyzed in this study share  $2n = 52$  chromosomes with *A. multispinis* of the Itapocu river  
17 from the coastal basin (Tab. 1, ALVES *et al.*, 2003). However, differences in karyotype  
18 formulas between the two populations indicate microstructural chromosomal changes in  
19 allopatric populations. The absence of ITS vestiges also corroborates the indication of a  
20 conserved karyotype for the species. *Ancistrus aguaboensis* has its first karyotype  
21 description in this study, and  $2n = 50$  chromosomes suggests a numerical reduction by  
22 centric fusion. Aiming the location of ITS vestiges in fused chromosomes, few species of  
23 *Ancistrus* had the detection of (TTAGGG) $n$  sequence probes in their genome  
24 (FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017). In *Ancistrus* sp. (Barra Grande river,  
25 Paraná State, Ivaí basin), an ITS and 5S rDNA pseudogene were collocated on the  
26 metacentric pair 1 (BARROS *et al.*, 2017), as observed on the chromosome pair *m2* of *A.*  
27 *aguaboensis*. In *A. aguaboensis*, no vestige of ITS was detected on the *m/sm*  
28 chromosomes, which may be a result of the loss of these ITS during the fusion event  
29 (MEYNE *et al.*, 1990). However, since EBRs can be reused in karyotype evolution  
30 (PEVZNER, TESLER, 2003), the presence of a 5S rDNA site in the proximal region of  
31 pair *m2* indicate its origin from centric fusion with consequent loss of (TTAGGG) $n$   
32 sequences.

1           The distribution of heterochromatin in karyotypes is a feature widely evaluated in  
2 fishes (KANTEK *et al.*, 2009; VICARI *et al.*, 2010). The location of chromosome-  
3 specific heterochromatic blocks can be useful and collaborate in the recognition of Rb  
4 fusion points (ROSA *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018), or in  
5 the recognition of heteromorphic sex chromosomes (de OLIVEIRA *et al.*, 2007, 2008,  
6 2009; MARIOTTO *et al.*, 2011; KONERAT *et al.*, 2015; FAVARATO *et al.*, 2016;  
7 SCHEMBERGER *et al.*, 2019). *Ancistrus cf. multispinis* and *A. aguaboensis* presented  
8 large heterochromatic blocks in some chromosomal pairs, however, with no indication of  
9 sex chromosome heteromorphisms. The presence of large heterochromatic blocks is a  
10 feature widely shared in *Ancistrus* (MARIOTTO *et al.*, 2011; KONERAT *et al.*, 2015;  
11 FAVARATO *et al.*, 2016), whereas the absence of large heterochromatin blocks has been  
12 described to be a plesiomorphic characteristic in Loricariidae (ZIEMNICZAK *et al.*,  
13 2012).

14           A single chromosome pair carrying 45S rDNA (NOR) is a characteristic shared  
15 in all analyzed *Ancistrus* species (BUENO *et al.*, 2018). *Ancistrus cf. multispinis* and *A.*  
16 *aguaboensis* also had only a single pair carrying the 45S rDNA, but on different  
17 chromosomes. While *A. cf. multispinis* did not present co-located 45S/5S rDNAs, in *A.*  
18 *aguaboensis* these clusters were located in synteny in an acrocentric pair. In other  
19 *Ancistrus* species, the location of the 45S rDNA has also been shown to be widely varied  
20 (see Tab. 1). The 45S rDNAs sites in different chromosomal locations, in chromosomes  
21 pairs showing different sizes and morphologies and, in condition of synteny to the 5S  
22 rDNA, indicate several transpositions and/or other structural events involving the 45S  
23 rDNA in *Ancistrus*. Hence, the 45S rDNA site was considered an important  
24 cytotaxonomic marker in the group due to its wide chromosomal location variation, being  
25 in innumerable cases, species-specific (MARIOTTO *et al.*, 2011).

26           While the 45S rDNA is located in a single chromosome pair in *Ancistrus*, the 5S  
27 rDNA can be present in a large number of chromosomal sites (ranging from 1 to 13  
28 chromosome pairs) in the different species analyzed (see Tab. 1). Barros *et al.* (2017)  
29 proposed the dispersion of 5S rDNAs, and their pseudogenes, in subterminal regions of  
30 st/a chromosomes. EBRs located close to 5S rDNA pseudogenes could promote DSB and  
31 Rb fusion events (BARROS *et al.*, 2017). In fact, *A. cf. multispinis* and *A. aguaboensis*  
32 presented 5S rDNA sites in the subterminal regions of acrocentric pairs. In addition, *A.*  
33 *aguaboensis* presented 5S rDNA sequences at proximal region in the pair m2. Variations



1 in the 5S rDNA location occurs in *Ancistrus* species, but the proximal 5S rDNA location  
2 in heterochromatic regions, with or without ITS vestiges, may explain a part of the Rb  
3 fusions present in the genus.

4 Previous cytogenetic studies in Trichomycteridae, Neoplecostominae and  
5 Hypoptopomatinae species proposed that the 45S/5S rDNA syntenic condition was  
6 present in the karyotypes of sister group for Loricariidae (ZIEMNICZAK et al., 2012).  
7 Syntenic condition of rDNAs is widely visualized in karyotypes of Loricariidae  
8 representatives (KAVALCO et al., 2004; MARIOTTO et al., 2011; ZIEMNICZAK et  
9 al., 2012; TRALDI et al., 2013; BUENO et al., 2014; FAVARATO et al., 2016;  
10 BARROS et al., 2017). Analyzing the location of chromosome types and the position of  
11 rDNAs syntenic sites in Ancistrini, it is more parsimonious to infer evolutionary  
12 recurrence indexes for this chromosome condition in this tribe. In fact, when evaluating  
13 the pattern of the karyotype distribution of rDNAs in *Ancistrus*, although it may be an  
14 allusive proposal, it is possible to corroborate the proposal of Barros et al. (2017), which  
15 rDNAs pseudogenes can organize EBRs and, these EBRs, have an evolutionary re-use to  
16 generate chromosome diversification in the group.

17 The analysis of the 5S rDNAs sequences of *A. cf. multispinis* and *A. aguaboensis*  
18 demonstrated that they have all the structures necessary for their function, although this  
19 analysis can be only predictive. Unlike the studies proposed by Barros et al. (2017) and  
20 Glugoski et al. (2018), 5S rDNA pseudogenes were not recovered in our analyzes.  
21 Pseudogenes are common in multigene families (REBORDINOS et al., 2013). It is  
22 difficult to detect EBRs in multigene families, which depends of a large number of  
23 sequence analysis or the use of comparative genomics. Thus, the detailed assessment of  
24 the presence of EBRs in 5S rDNA pseudogenes/degenerated sequences still remains  
25 predictive. However, in *Ancistrus* species with  $2n \leq 50$  chromosomes, the presence of 5S  
26 rDNA sites on m/sm chromosomes, originated from Rb fusion, could explain part of the  
27 chromosome diversification in the genus.

28 *Ancistrus aguaboensis* and *A. cf. multispinis* are found in sympatry and syntopy  
29 with species of *Harttia punctata* and *Harttia carvalhoi*, respectively. These species show  
30 karyotype diversity, with the absence of sex chromosomes in *A. aguaboensis* and *A. cf.*  
31 *multispinis*, however with the presence of multiple sex chromosomes systems in *Harttia*  
32 *punctata* ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ) and in *Harttia carvalhoi* ( $XX/XY_1Y_2$ ) (BLANCO et al.,  
33 2013, 2014). These armored catfishes inhabit small tributaries, which favors the isolation

1 of populations, providing events of chromosome rearrangements that could be more  
2 easily fixed. This cytogenetic differentiation may be functioning as a reproductive barrier  
3 between species, a fact confirmed by the absence of hybrid species.

4 The wide karyotype diversification present in *Ancistrus* (BUENO et al., 2018) is  
5 compatible with the fact that the group is diverse and specious (LUJAN et al., 2015).  
6 Chromosome rearrangements promote important differences in the genomic sets of  
7 species, which could lead to meiotic incompatibilities (NAVARRO, BARTON, 2003).  
8 Chromosome segregation failure and the ensuing production of unviable gametes due to  
9 the accumulation of chromosomal rearrangements might play an important role in  
10 speciation (NAVARRO, BARTON, 2003; FARIA, NAVARRO, 2010). In the same way,  
11 the genetic differences accumulated in divergent *Ancistrus* species may have helped in  
12 the diversification of this evolutionary lineage.

13

#### 14 **ACKNOWLEDGMENTS**

15 This study was financed by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São  
16 Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –  
17 Financial Code 001) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
18 Tecnológico). The authors are grateful to ICMBio (Instituto Chico Mendes de  
19 Conservação da Biodiversidade – protocol number SISBIO 10538-1) for authorizing the  
20 capture of specimens.

21

#### 22 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

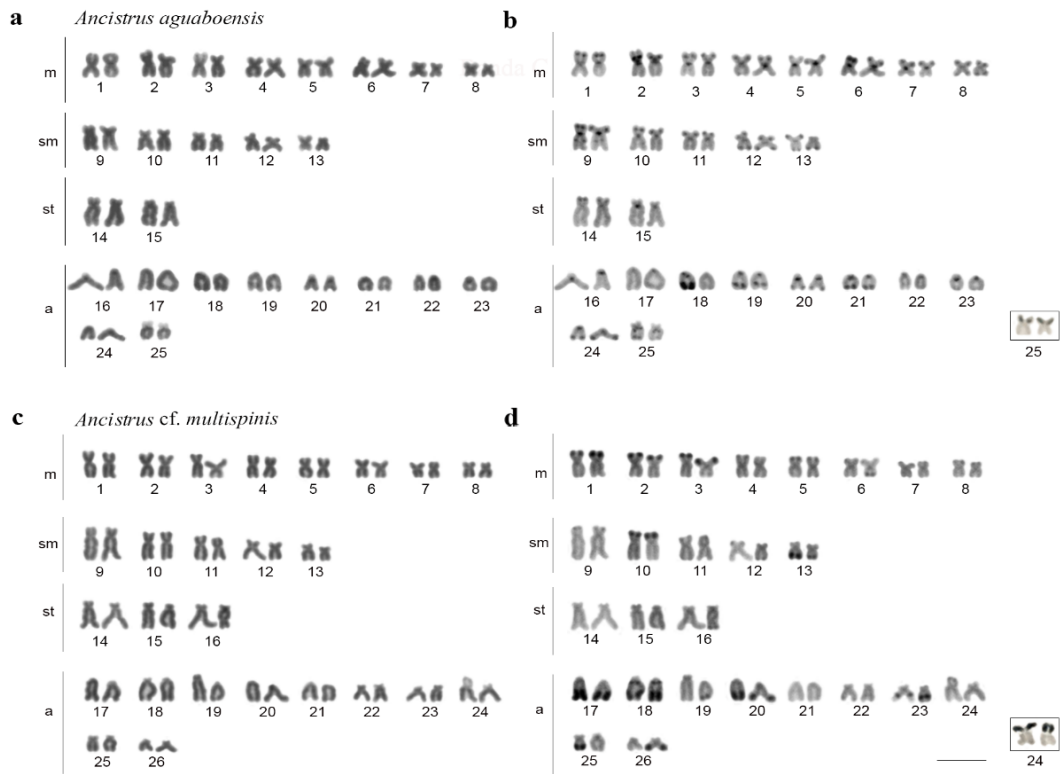
23 As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

## TABLES AND FIGURES

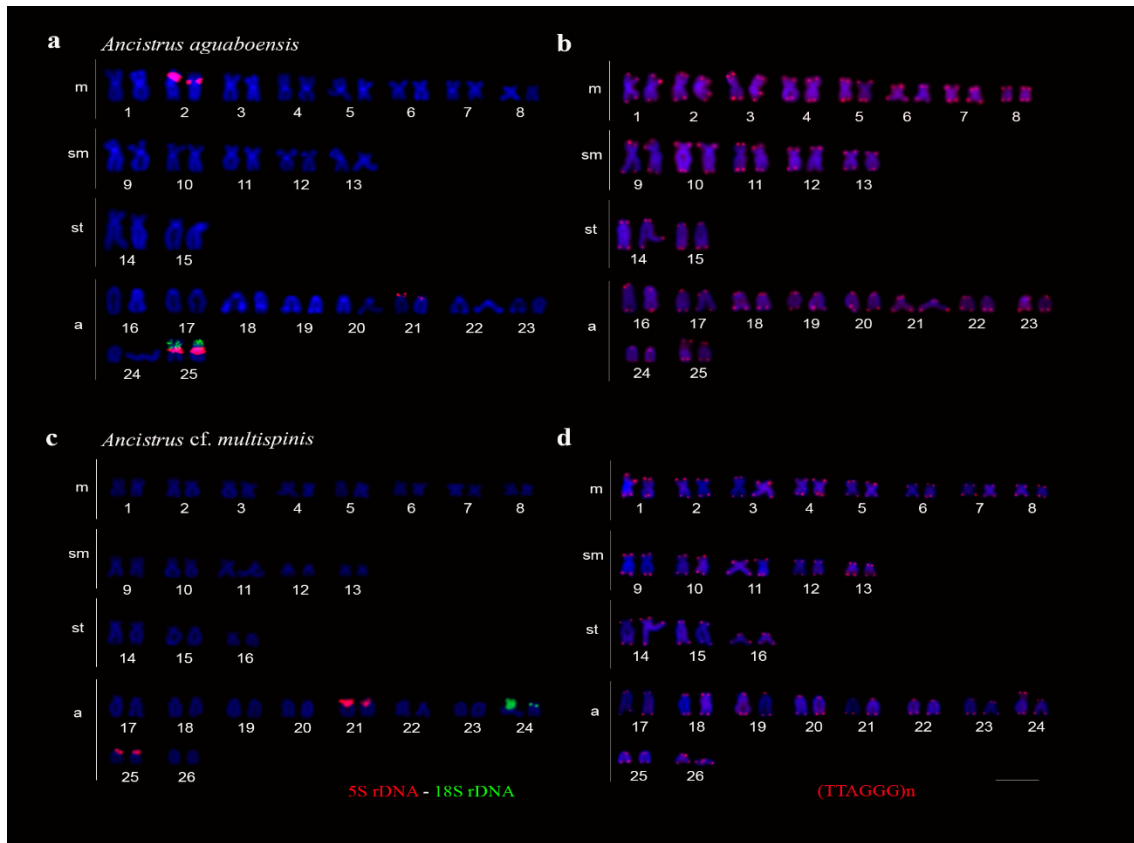
**Table 1** - Review of available *Ancistrus* cytogenetic data. “Unknown” means that the data was not available in the original manuscript. NOR: Nucleolar Organizer Region; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric; a: acrocentric; FN: Fundamental number. \*one member of the homologous pairs with FISH markers.

Species	2n	NF	Karyotype formula	Sex chromosome system	rDNA 5S (pair)	rDNA 18S (pair)	Localization	Reference
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	68	20m+8sm+6st	Absent	Unknown	2	Arrombado bay-MT	Mariotto et al. (2009)
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	67	19m+8sm+6st+1a	Absent	Unknown	2	Arrombado bay-MT	Mariotto et al. (2009)
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	66	18m+8sm+6st+2a	Absent	Unknown	2 (NOR)	Arrombado bay-MT	Mariotto et al. (2009)
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	68	20m+8sm+6st	Absent	3, 6, 9	2	Arrombado bay-MT	Mariotto et al. (2011)
<i>Ancistrus sp. Purus</i>	34	68	♂21m+11sm+2st ♀20m+2sm+2st	XX/XY	3, 5, 12, 13	4	Purus river-AM	de Oliveira et al. (2009) Favarato et al. (2016)
<i>Ancistrus sp. Catalão</i>	34	68	22m+8sm+4st	XX/XY	3, 6, 7, 12	4	Lake Catalão-AM	Favarato et al. (2016)
<i>Ancistrus sp. Trombetas</i>	38	73	22m+8sm+5st+3a	Absent	Unknown	5 (NOR)	Trombetas river-PA	Oliveira et al. (2009)
<i>Ancistrus n.sp. 1</i>	38	76	30m/sm+8st	Absent	Unknown	5 (NOR)	São Francisco river-AC	Alves et al. (2003)
<i>Ancistrus dubius</i>	♀38	76	26m+10sm+2st	XX/XY1Y2	4	12	Barretinho stream-AM	de Oliveira et al. (2008)
<i>Ancistrus sp. “Balbina”</i>	♂39	78	27m+10sm+2st					Favarato et al. (2016)
<i>Ancistrus sp. 13</i>	40	80	26m+10sm+4st	Absent	5, 15	18	Salgadinho stream-MT	Mariotto et al. (2011)
<i>Ancistrus sp. 13</i>	40	80	30m+6sm+4st	Absent	Unknown	18 (NOR)	Salgadinho stream-MT	Mariotto et al. (2013)
<i>Ancistrus n.sp. 1</i>	♂39 ♀40	78 80	33m+6sm 34m+6sm	XX/X0	Unknown	20 (NOR)	Vermelho river-GO	Alves et al. (2006)
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	Absent	Unknown	16 (NOR)	Coxipó river-MT	Mariotto et al. (2006)
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	XX/XY	4, 14, 16	16	Pari stream-MT	Mariotto et al. (2011)
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	XX/XY	4, 14, 16	16	Flechas stream-MT	Mariotto et al. (2011)
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	XX/XY	4, 14, 16	16	Fundo stream-MT	Mariotto et al. (2011)
<i>Ancistrus sp. Vermelho</i>	42	78	26m+6sm+4st+6*	Absent	Unknown	20 (NOR)	Demeni river-AM	de Oliveira et al. (2009)
<i>Ancistrus sp.</i>	42	84	18m+16sm+8st	Absent	1, 10*	10	Criminoso stream-MS	Prizon et al. (2016)
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	44	72	18m+10sm+16st/a	ZZ/ZW	Unknown	13 (NOR)	Serra das Araras stream-MT	Mariotto et al. (2004)
<i>Ancistrus sp. 08</i>	44	80	18m+10sm+8st+8a	ZZ/ZW	1, 13	13	Curupira river-MT	Mariotto et al. (2011)
<i>Ancistrus maximus</i>	46	♂81	18m+11sm+6st+11a	XX/XY	19	19	Branco river-RR	Oliveira et al. (2006)
<i>Ancistrus sp. Macoari</i>		♀82	18m+12sm+6st+10a					Favarato et al. (2016)
<i>Ancistrus abilhoai</i>	48	90	22m+14sm+6st+6a	Absent	13	13	Iguaçu river-PR	Ribeiro et al. (2015)
<i>Ancistrus ranunculus</i>	48	82	♂20m+8sm+6st+14a ♀19m+9sm+6st+14a	ZZ/ZW	16	16	Xingu river-PA	de Oliveira et al. (2007) Favarato et al. (2016)

<i>Ancistrus aguaboensis</i>	50	80	16m+10sm+4st+20a	Absent	2, 21, 25	25	Ribeirão Bandeirinha river-GO	Present study
<i>Ancistrus</i> sp. 06	50	86	18m+10sm+8st+14a	Absent	21	21	Matrixã river-MT	Mariotto et al. (2011, 2013)
<i>Ancistrus tombador</i>	50	84	14m+12sm+8st+16a	Absent	Unknown	21 (NOR)	Preto river-MT	Mariotto et al. (2013)
<i>Ancistrus cirrhosus</i>	50	86	10m+14sm+12st+14a	Absent	1, 18, 23	17	Arroyo San Juan-Posadas (Argentina)	Prizon et al. (2017)
<i>Ancistrus taunayi</i>	50	92	22m+10sm+10st+8a	ZZ/ZW	21	24	Cascalho stream-SC	Konerat et al. (2015)
<i>Ancistrus</i> sp.	50	88	20m+12sm+6st+12a	Absent	4, 13, 15, 18	13	Unknown	Barros et al. (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “Mourão River”	50	92	12m+18sm+12st+8a	Absent	1, 14, 19, 20	12	Mourão river-PR	Prizon et al. (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “19 Stream”	50	92	♂11m+18sm+13st+8a ♀12m+18sm+12st+8a	XX/XY	1, 12, 15, 20, 22, 25	12	Stream 19-PR	Prizon et al. (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “Keller River”	50	92	♂11m+18sm+13st+8a ♀12m+18sm+12st+8a	XX/XY	1, 12, 15, 20, 25	12	Keller river-PR	Prizon et al. (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “SãoFrancisco Verdadeiro River”	50	94	14m+16sm+14st+6a	Absent	1, 15, 18, 21	18	São Francisco Verdadeiro river-PR	Prizon et al., 2017
<i>Ancistrus</i> sp. “Ocoí River”	50	94	10m+18sm+16st+6a	Absent	18, 21, 22	18	Ocoí river-PR	Prizon et al. (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “São Francisco Falso River”	50	94	10m+18sm+16st+6a	Absent	11, 14, 18, 19	18	São Francisco Falso river-PR	Prizon et al. (2017)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>multispinis</i>	52	84	16m+10sm+6st+20a	Absent	21, 25	24	Ribeirão Grande river-SP	Present study
<i>Ancistrus</i> sp.	52	76	12m+10sm+30st/a	Absent	13	3, 14	Angra dos Reis-SP	Reis et al. (2012)
<i>Ancistrus</i> n.sp. 2	52	90	10m+16sm+12st+14a	Absent	Unknown	15 (NOR)	Garuva river-SC	Alves et al. (2006)
<i>Ancistrus</i> sp. 04	52	82	16m+8sm+6st+22a	Absent	Unknown	22 (NOR)	Septotuba river -MT	Mariotto et al. (2013)
<i>Ancistrus</i> n.sp. 2	52	84	32m/sm+20st/a	Absent	Unknown	24 (NOR)	Betari river-SP	Alves et al. (2003)
<i>Ancistrus multispinnis</i>	52	80	28m/sm+24st/a	Absent	Unknown	17 (NOR)	Itapocu river-SC	Alves et al. (2003)
<i>Ancistrus</i> aff. <i>dolichopterus</i>	52	♂78 ♀79	16m+8sm+2st+26a 16m+9sm+2st+25a	ZZ/ZW	1, 5, 9, 14, 15, 20, 22, 24, 25, 26	26	Purus river-AM	de Oliveira et al. (2007) Favarato et al. (2016)
<i>Ancistrus</i> sp. “Piagaçu”	52	78	16m+8sm+2st+26a	Absent	Unknown	13 (NOR)	Fazenda Dimona stream-AM	de Oliveira et al. (2009)
<i>Ancistrus</i> sp. 4	52	82	16m+8sm+6st+22a	Absent	17, 25, 26*	22	Septotuba river-MT	Mariotto et al. (2011, 2013)
<i>Ancistrus dolichopterus</i>	52	♂80 ♀79	12m+12sm+4st+24a 11m+12sm+4st+25a	Z <sub>1</sub> Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> Z <sub>2</sub> /Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> W <sub>1</sub> W <sub>2</sub>	1, 2, 6, 8, 9, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 26	23	Demeni river-AM	de Oliveira et al. (2008) Favarato et al. (2016)
<i>Ancistrus claro</i>	54	84	14m+8sm+8st+24a	Absent	4, 19, 21	21	Coxipó river-MT	Mariotto et al. (2011, 2013)
<i>Ancistrus</i> sp. 03	54	84	14m+8sm+8st+24a	Absent	Unknown	21 (NOR)	Pari stream-MT	Mariotto et al. (2013)
<i>Ancistrus</i> sp. 01	54	84	14m+8sm+8st+24a	Absent	Unknown	21 (NOR)	Pipa stream-MT	Mariotto et al. (2013)



**Figure 1** - Karyotypes of *Ancistrus aguaboensis* (a–b) and *Ancistrus cf. multispinis* (c–d) submitted to Giemsa staining (a–c) and C-banding (b–d). The chromosomes pairs with NORs sites are evidenced in the figure details (boxes). Bar = 10 μm.



**Figure 2** - Karyotypes of *Ancistrus aguaboensis* (a–b) and *Ancistrus cf. multispinis* (c–d) submitted to FISH using 5S rDNA, 18S rDNA and (TTAGGG)<sub>n</sub> probes. In (a–c), 5S rDNA (in red) and 18S rDNA (in green) sites; in (b–d), terminal red markers evidenced (TTAGGG)<sub>n</sub> sites. Bar = 10 μm.

### **Enriched tandemly repeats in chromosomal fusion points of *Rineloricaria latirostris* (Boulenger, 1900) (Siluriformes: Loricariidae)**

Larissa Glugoski, Viviane Nogaroto, Geize Aparecida Deon, Matheus Azambuja,  
Orlando Moreira-Filho, Marcelo Ricardo Vicari

Aceito para publicação: **Genome**

#### **Abstract**

Cytogenetic data showed the enrichment of repetitive DNAs in chromosomal rearrangement points between closely related species in armored catfishes. Still, few studies integrated cytogenetic and genomic data aiming to identify their prone-to-break DNA sites. Here, we aimed to obtain the repetitive fraction in *Rineloricaria latirostris* to recognize the microsatellite and homopolymers flanking the regions previously described as chromosomal fusion points. The results indicated that repetitive DNAs in *R. latirostris* are predominantly DNA transposons, and considering the microsatellite and homopolymers, A/T-rich expansions were the most abundant. The *in situ* localization demonstrated the A/T-rich repetitive sequences are scattered on the chromosomes, while A/G-rich microsatellites units were accumulated in some regions. The DNA transposon *hAT*, the 5S rDNA, and 45S rDNA (previously identified in Robertsonian fusion points in *R. latirostris*) are clusterized with some microsatellites, especially (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, and poly-A, which also are enriched in regions of chromosomal fusions. Our findings demonstrated that repetitive sequences such as rDNAs, *hAT* transposon, and microsatellite units flank probable evolutionary breakpoint regions in *R. latirostris*. However, due to the sequence unit homologies in different chromosomal sites, these repeat DNAs only may have facilitated chromosome fusion events in *R. latirostris* rather than work as a double-strand breakpoint site.

**Keywords:** Chromosomal rearrangements, evolutionary breakpoint regions, karyotype evolution, repetitive genomic fraction.

## 1        1. INTRODUCTION

2            Microsatellites are an abundant class of repetitive DNA composed of tandemly  
3 arranged short repeated motifs of 2 to 6 bp, distributed non-randomly in eukaryotic  
4 genomes, and together with homopolymers, possess a highly polymorphic nature (LITT,  
5 LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER, MAY, 1989; MEGLÉCZ *et al.*, 2012; RUIZ-  
6 RUANO *et al.*, 2015). The high density and variability of microsatellites in eukaryotic  
7 genomes could emerge from their origin mechanisms (MEGLÉCZ *et al.*, 2012). De novo  
8 formation from unique sequences by point mutations and dispersion of these by  
9 transposable elements (TEs) are proposed to be the main mechanism of microsatellites  
10 origin (MESSIER *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 2000; WILDER, HOLLOCHER, 2001). After  
11 the formation of proto-microsatellites in random DNA segments or into TEs (MESSIER  
12 *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 2000; WILDER, HOLLOCHER, 2001), these repetitive units  
13 tend to undergo slippage strand mispairing during DNA replication, which is repaired by  
14 mismatch repair enzymes (ELLEGREN, 2004). So, the polymerase slippage rate  
15 increases with the number of repeat units and is inversely correlated with repeat unit  
16 length (SHINDE *et al.*, 2003).

17            The main location of microsatellite loci is in heterochromatic regions (LOHE *et*  
18 *al.*, 1993; CUADRADO, JOUVE, 2011), but they can also colonize euchromatin regions  
19 (ELLEGREN, 2000; PARDUE *et al.*, 1987; CUADRADO, JOUVE, 2007, 2010). Since  
20 microsatellites are ubiquitous in eukaryotic genomes, some studies demonstrated several  
21 functions, such as in transcription factor binding sites modulation, spacing between  
22 promoter elements, enhancers, cytosine methylation, alternative splicing, mRNA  
23 stability, selection of transcription start and termination sites, unusual structural  
24 conformations, nucleosome positioning and modification, higher-order chromatin  
25 structure, non-coding RNA, and meiotic recombination hot spots (for a review, see  
26 BAGSHAW, 2017).

27            Although microsatellites have broad functional activity in the genomes, studies of  
28 *in situ* localization of their sequences are still scarce, and according to Ruiz-Ruano *et al.*  
29 (2015), this knowledge is critical for addressing key issues such as chromosome origin,  
30 organization, structure, function, and evolution. Despite few studies, microsatellites were  
31 proposed to act in chromosomal instability mechanisms (de la CHAPELLE, 2003; YANG  
32 *et al.*, 2019), surrounding evolutionary breakpoint regions (EBRs) (FARRÉ *et al.*, 2011),  
33 or helping in the sex-chromosome differentiation mechanisms (KUBAT *et al.*, 2008;



1 POLTRONIERI *et al.*; 2013; ZIEMNICZAK *et al.*, 2014; SCHEMBERGER *et al.*, 2019).  
2 Intra and interspecific karyotype comparisons have been demonstrated some specific  
3 chromosome regions accumulating microsatellites, which could be involved in  
4 chromosomal remodeling mechanisms (POKORNÁ *et al.*, 2011; ZIEMNICZAK *et al.*,  
5 2014; RUIZ-RUANO *et al.*, 2015; PUCCI *et al.*, 2016; MATSUBARA *et al.*, 2016;  
6 SCHEMBERGER *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020). In fact, heterochromatin  
7 enriched by microsatellite units could act as hotspots for double-strand breaks (DSBs)  
8 and chromosomal rearrangements (BACOLLA, WELLS, 2004; CIOFFI *et al.*, 2011;  
9 SCACCHETTI *et al.*, 2015).

10 Prone to break chromosome regions are enriched by distinct kinds of repetitive  
11 DNAs (KEHRER-SAWATZKI, COOPER, 2008; CARBONE *et al.*, 2009), among them  
12 the microsatellites (FARRÉ *et al.*, 2011). Deciphering chromosomal evolution begins  
13 with recognizing the EBRs features in genomes (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006). EBRs  
14 are clustered repetitive DNA regions with a high predisposition to breaks and  
15 rearrangements (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006). Furthermore, they are known to form  
16 DNA regions of high flexibility and low stability and can be identified at points where  
17 synteny breaks and chromosomal reorganization have occurred between genomes of  
18 closely related species (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; LONGO *et al.*, 2009; FARRÉ *et al.*  
19 *et al.*, 2011; DAMAS *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2019). In addition, segments with  
20 purine/pyrimidine or polypyrimidine/polypurine repetitive regions could adopt a non-B  
21 DNA conformation, inducing DSBs (SZAMALEK *et al.*, 2005; KURAHASHI *et al.*,  
22 2006; WELLS, 2007).

23 Loricariidae representatives (called armored catfishes) have proved to be an  
24 interesting group for chromosomal evolution studies, given their wide plasticity of diploid  
25 number ( $2n$ ) and karyotypic formula (BUENO *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2012; ERRERO  
26 PORTO *et al.*, 2014; BLANCO *et al.*, 2017; SASSI *et al.*, 2020, 2021; DEON *et al.*, 2020,  
27 2022). Previous studies suggested that Loricariidae chromosomal evolution is associated  
28 with enriched repetitive DNA regions, which were involved in DSBs, triggering  
29 chromosomal rearrangements that contributed to its  $2n$  diversification and occurrence of  
30 numerical and structural polymorphisms (ROSA *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2017;  
31 PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018, 2020; DEON *et al.*, 2020, SASSI *et al.*,  
32 2021).

1            *Rineloricaria* Bleeker, 1862 (Loricariidae: Loricariinae) consist of a group of 66  
2 valid species (FROESE, PAULY, 2022), with 2n ranging from 36 to 70 chromosomes  
3 (ROSA et al., 2012; TAKAGUI et al., 2020). Distinct populations of *Rineloricaria*  
4 *latirostris* (BOULENGER, 1900) also showed extensive karyotype variation (2n=36–48)  
5 (GIULIANO-CAETANO, 1998; GLUGOSKI et al., 2018). Robertsonian (Rb) fusion  
6 rearrangements associated with interstitial telomeric sites (ITSs), 5S rDNAs, and *hAT*  
7 transposable elements in fusion points, in addition to chromosomal inversions, have  
8 already been identified in the genome of *Rineloricaria* species (ROSA et al., 2012;  
9 GLUGOSKI et al., 2018). In addition, in the chromosome evolution, it is possible to  
10 suggest a Rb fusion involving 45S rDNA-bearing chromosomes when comparing its  
11 location on *R. latirostris* with 2n=48 and 46 (PRIMO et al., 2017; GLUGOSKI et al.,  
12 2018). Based on the heterochromatic nature, DNA unit composition, and the visualization  
13 of the re-use of these regions in chromosomal rearrangements. Glugoski et al. (2018)  
14 proposed that these sites could act as EBRs in *R. latirostris* genomes, leading to  
15 chromosome number reduction in some populations.

16            Next-generation sequencing (NGS) allows the analysis of a greater number of  
17 microsatellite markers in non-models organism genomes and their advances generated  
18 new knowledge in chromosome remodeling proposal (RUIZ-RUANO et al., 2015;  
19 SCHEMBERGER et al., 2019). In *Rineloricaria* species known for presenting Rb fusion  
20 chromosomes, the integration of genomic prospection of microsatellite types with *in situ*  
21 localization method can be a good tool to evaluate the composition of these chromosomal  
22 sites. So, the main goal of this study was to obtain the repeat units composition and  
23 characterize the microsatellites and homopolymers (i.e., single nucleotide repeats)  
24 surrounding the proposed EBRs in *R. latirostris* populations with 2n = 46 and 48  
25 chromosomes, besides the evaluation of microsatellites composition on its genome.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Sampling

Two populations of *R. latirostris* were analyzed: 17 specimens (7 males and 10 females) from Laranjinha river - Cinzas basin (Ventania, Paraná State - Brazil, 23°58'13" S and 50°14'01" W) and 13 specimens (7 males and 6 females) from Piumhi river - São Francisco basin (Piumhi, Minas Gerais State - Brazil, 20°31'55" S and 46°02'42" W). Specimens were collected with the authorization of the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBIO), System of Authorization and Information about Biodiversity (SISBIO-License No. 15117-2), and National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge (SISGEN No. AE9B9C4). Voucher specimens were deposited in the Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) of the Universidade Estadual de Maringá, and Departamento de Zoologia of the UNESP São José do Rio Preto, Brazil (NUP 17129 and DZSJRP 10996, respectively). The procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Usage of the Universidade Estadual de Ponta Grossa (Process CEUA No. 0227067/2020) and Biosafety Certification according to Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (CQB No. 0063/98).

### 2.2 Next-generation sequence and RepeatExplorer analyzes

The Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) was used to obtain genomic DNA from a representative of *R. latirostris* from Laranjinha river. A paired-ends (2 x 150) DNA library was sequenced on the Illumina HiSeq platform. Paired-end reads were processed to check the quality of sequenced nucleotides with FASTQC (ANDREWS, 2012) and quality trimmed using the FASTX-Toolkit suit (GORDON, HANNON, 2010). According to the developer's recommendations, a random sample of 5 million reads was used in the RepeatExplorer pipeline for graph-based clustering and a de novo repeat identification (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/>; NOVAK et al., 2010; 2013). The clustering results were visually inspected with their graph composition, and each repeat DNA type has its proportion estimated. Since Glugoski et al. (2018) have

1 evidenced rDNA and fragments of TE *hAT* in chromosome fusion points of *R.*  
2 *latirostris*, RepeatExplorer enriched clusters assembling these repeat DNAs were  
3 investigated and had their composition estimated.

### 4 5 **2.3 Chromosome preparation**

6 Mitotic chromosomes were obtained following the air-drying method, according  
7 to Bertollo et al. (2015). Constitutive heterochromatin was detected by C-banding  
8 procedure (SUMNER, 1972).

### 9 10 **2.4 Probes and Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)**

11 Sequences to detect the more abundant microsatellites and homopolymers in  
12 RepeatExplorer output data were directly labeled as probes with Cy5 fluorochrome  
13 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) at the 5' end during DNA synthesis. The  
14 probes used were (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (TA)<sub>15</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (TAA)<sub>10</sub>, (CAT)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>,  
15 (GAG)<sub>10</sub>, (AAAT)<sub>8</sub>, and (CATAG)<sub>8</sub>, and their potential to detect tandem repeated  
16 microsatellites in different DNA frames are showed in Table 1. Besides that, the 18S  
17 and 5S rDNA probes were labeled by Polymerase Chain Reaction (PCR) with  
18 digoxigenin 11-dUTP (Jena Bioscience). The general telomeric motif of vertebrates  
19 (TTAGGG)<sub>n</sub> and *hAT* partial transposon were labeled by PCR with biotin 16-dUTP  
20 (Jena Bioscience). FISH was performed under high stringency (2.5 ng/μL probe, 50%  
21 formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate, at 37 °C for 16 h), following the protocol  
22 described by Pinkel et al. (1986). For signal detection, Streptavidin conjugated with  
23 Alexa Fluor 488 (Invitrogen) and Anti-digoxigenin conjugated with rhodamine  
24 (Roche Applied Science) were used. Chromosomes were counterstained with 0.2  
25 μg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI (Sigma-Aldrich) in mounting medium  
26 Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

### 27 28 **2.5 Karyotypic analysis**

29 Chromosomal preparations were analyzed in a light and epifluorescence  
30 microscope Leica DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled to a

1 DFC3000 G CCD camera (Leica). Chromosomes were classified based on the arm  
2 ratio according to Levan et al. (1964) and arranged in metacentric (m), submetacentric  
3 (sm), and subtelocentric + acrocentric (st/a) classes, as previously published by  
4 Glugoski et al. (2018) for *R. latirostris*  $2n = 46$  and  $2n = 48$ . At least 35 metaphase  
5 cells were analyzed for each slide/specimen. Representative idiograms of *R.*  
6 *latirostris*  $2n = 46$  and  $2n = 48$  karyomorphs were drawn using Inkscape 1.1.2  
7 software (<https://inkscape.org>).

### 3. RESULTS

#### 3.1 Microsatellites genomic composition

The RepeatExplorer analysis resulted in 90 clusters (CLs) with different graphing patterns found from the genomic data of the *R. latirostris* (Laranjinha river). The total of DNA repeats identified were grouped into DNA transposon superfamilies (63,87%), Long interspersed nuclear element (LINE) retrotransposon superfamilies (22,69%), Long terminal repeats (LTR) retrotransposon superfamilies (7,1%), Short interspersed nuclear element (SINE) retrotransposon superfamilies (0,82%), microsatellite units (3,02%), among others (Figure 1a, Supplementary Table S1). The most abundant TEs were DNA transposon Tc1-*Mariner*, RTE LINE, LTR Gypsy, DNA transposon *hAT*, and LINE Dong-R4 (Figure 1b, Supplementary Table S2). Several CLs were enriched with different classes of microsatellites. The ten most abundant expansion units in the clustered analysis were (TA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (TAA/TTA)<sub>n</sub>, (CATAG/CTATG)<sub>n</sub>, (CA/TG)<sub>n</sub>, (AC/GT)<sub>n</sub>, (ATA/TAT)<sub>n</sub>, (A/T)<sub>n</sub>, (AAT/ATT)<sub>n</sub>, and (AAAT/ATTT)<sub>n</sub> (Figure 1c, Supplementary Table 3). Other classes of microsatellites were also listed in the analysis (Figure 1c, Supplementary Table 3) and hybridized on *R. latirostris* chromosomes.

The CLs 18, 28, 31, 50, 66, and 71 are enriched with DNA transposon *hAT*, while the CLs 33 and 85 are enriched with *5S rRNA* and *45S rRNA*, respectively (Supplementary Table 4). The CLs possessing DNA transposon *hAT* and *5S rRNA* also presented high amounts of distinct types of T/A enriched units (Supplementary Table 4). CL 85 is predominantly composed of *45S rRNA* besides amounts of (GA)<sub>n</sub>, (AGCG)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (GGA)<sub>n</sub>, and other A/G rich expansions (Supplementary Table 4).

### 1 **3.2 Karyotype and *in situ* localization**

2 *Rineloricaria latirostris* from the Laranjinha river showed  $2n = 46$  chromosomes,  
3 karyotype formula  $10m + 4sm + 32st/a$  (Figure 2a). Heterochromatic blocks were  
4 detected in the pericentromeric regions of the chromosomes, with more evident blocks on  
5 the pairs 1, 2, 3, 7, and 16 (Figure 2b). (TTAGGG)<sub>n</sub> sites were evidenced at terminal  
6 regions in all chromosomes, in addition to metacentric pairs 1 and 3 with vestiges of ITS  
7 (Figure 2c). The pair 2 harbored the 18S rDNA sequence at the interstitial region (Figure  
8 2c). Double-FISH revealed 5 pairs with co-located markers of 5S rDNA/*hAT*: one  
9 chromosome pair 3 in the centromeric region (in synteny with ITS) and four *st/a* pairs  
10 (10, 11, 22 and 23) in the terminal regions (Figure 2d). Probe (A)<sub>30</sub> was scattered along  
11 all the chromosomes, with accumulations in the proximal regions of the chromosomes 1,  
12 2 (surrounding the secondary constriction), 3, and 7, and in a q interstitial region of the  
13 pairs 4 and 5 (Figure 2e). (CA)<sub>15</sub> probe signals showed dispersed distribution on the  
14 chromosomes and accumulations in the pericentromeric regions of the pairs 1, 3, and 7,  
15 p interstitial in the chromosome 2 (adjacent with the secondary constriction), besides  
16 evident interstitial signals on the chromosomes 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 17, and 20  
17 (Figure 2f). (GA)<sub>15</sub> presented blocks at the terminal regions of the metacentric pairs 1 and  
18 5, at the p interstitial region of the pair 2 (coincident with the secondary constriction), at  
19 the pericentromeric region of the acrocentric pairs 11 and 14, in addition to scattered or  
20 small accumulations along all the chromosomes (Figure 2g). Scattered (CAT)<sub>10</sub> and  
21 accumulated (CGG)<sub>10</sub> microsatellite signals were located in interstitial 2p (in the  
22 secondary constriction region) (Figure 2h,i respectively). (GAG)<sub>10</sub> hybridized dispersedly  
23 along all the chromosomes and had accumulations in interstitial 2p (in the secondary  
24 constriction), at the pericentromeric region of the chromosomes 5 and 16, and at the  
25 terminal region of the acrocentric 15 (Figure 2j). Signals of the (GAA)<sub>10</sub> probe were

1 detected to q proximal in chromosomes 1 and 2, pericentromeric regions of the  
2 chromosomes 3, 6, and 8, interstitial 9q, terminal regions 3, 8, 10, 18, and 20, and some  
3 scattered signals along the chromosomes (Figure 2k).

4 *Rineloricaria latirostris* from Piumhi river showed  $2n = 48$  chromosomes,  
5 karyotype formula  $6m + 6sm + 36st/a$  (Figure 3a). Heterochromatic markers were  
6 evidenced in the pericentromeric regions of all the chromosomes, mainly as a block on  
7 the pairs 1, 2 (only one member of the homologous), 3, 4, 5, 8, 10, and 19, and in the  
8 secondary constriction location on the 7p (Figure 3b). *In situ* location revealed only  
9 (TTTAGGG)<sub>n</sub> terminal chromosomal markers (Figure 3c). 18S rDNA sites were detected  
10 at the terminal regions of pair 7 (Figure 3c). Markers of 5S rDNA sequences were  
11 evidenced at terminal regions of st/a chromosome pairs 9 and 16 (Figure 3d). In the  
12 kariomorph  $2n = 48$ , no *hAT* signals were detected. (A)<sub>30</sub> probe hybridized to interstitial  
13 1q, 7p (in the secondary constriction), in pericentromeric region of chromosome 16,  
14 besides scattered signals on all chromosomes (Figure 3e). (CA)<sub>15</sub> was located at  
15 interstitial 1p, 4q, 5q, 6q, 14q, 16q, and 19q, at proximal regions of chromosomes 2p and  
16 q, and 4p, in pericentromeric region of chromosome 22, besides terminal sites on  
17 chromosomes 4, 5, 12, and 23 (Figure 3f). (GA)<sub>15</sub> probe showed accumulation in the  
18 interstitial regions of chromosome pairs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, and 10, in the terminal regions  
19 of the chromosomes 3p, 6, 10, 14, 18, and 19, an evident block in the 7p (in the secondary  
20 constriction), besides scattered signals along all chromosomes (Figure 3g). (CAT)<sub>10</sub>  
21 showed signals on the centromeric region of chromosome 1 and 7p (in the secondary  
22 constriction), and scattered signals along all chromosomes (Figure 3h). The probe  
23 (CGG)<sub>10</sub> was located in small accumulations at the interstitial region of chromosome 1q,  
24 in 7p arm (in the secondary constriction), besides scattered signals along all chromosomes  
25 (Figure 3i). (GAG)<sub>10</sub> probe showed small signals mainly in interstitial and terminal



1 regions of metacentric and submetacentric chromosomes, prominent signals in 7p (in the  
2 secondary constriction), and scattered signals along all chromosomes (Figure 3j).  
3 (GAA)<sub>10</sub> probe was scattered on the chromosomes, with accumulation signals in the  
4 chromosomes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, and 18 (Figure 3k).

5 The main signals of the repetitive DNAs that already have been *in situ* located in  
6 *R. latirostris*, karyomorphs 2n=46 and 2n=48, were comparatively represented in  
7 idiograms, highlighting the localization of the ITS, DNA transposon *hAT*, 5S rDNA, 45S  
8 rDNA, and microsatellite sites (Figure 4).

#### 1        4. DISCUSSION

2            NGS and bioinformatic tools, like RepeatExplorer, have allowed the high-  
3 throughput detection of repetitive DNAs into genomes even without a genome assembly  
4 (NOVAK *et al.*, 2010; 2013; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016). Moreover, several tools have  
5 been developed for detecting microsatellites in short-read sequencing data, but still is a  
6 challenge to their correct identification in size and type (UMMAT, BASHIR, 2014).  
7 These limitations make the long-read sequencing data a preferable method in  
8 microsatellites and homopolymers annotation, providing more accurate results  
9 (UMMAT, BASHIR, 2014). Despite the impossibility of generating the TEs annotation  
10 in the genome, the NGS data of *R. latirostris* submitted to the RepeatExplorer pipeline  
11 recognized a greater abundance of reads with identity to TEs superfamilies, especially  
12 those of DNA transposon. Studies have demonstrated that DNA transposons are the most  
13 abundant TEs in the fish genomes (GAO *et al.*, 2016; COAN, MARTINS, 2018;  
14 SCHEMBERGER *et al.*, 2019; SHAO *et al.*, 2019), being the Tc1-Mariner and hAT  
15 superfamilies the most representative in the Neotropical fish *Apareiodon* sp.  
16 (SCHEMBERGER *et al.*, 2019). Despite the few studies available, the analyzes of  
17 repetitive DNA contents in Neotropical fish have shown a great abundance of  
18 microsatellites and few units of classical satellites (SCHEMBERGER *et al.*, 2019). A  
19 characteristic of the data obtained for *R. latirostris* was the predominance of units  
20 enriched with A/T repeats (like AT, TA, ATT, among others), contrary to what was  
21 observed in *Apareiodon* sp., which presented the microsatellites rich in AC, CA, and GA  
22 as the most abundant. Although the A/T-rich microsatellite types were the most abundant  
23 in the identification by RepeatExplorer, the *in situ* locations of probes with this  
24 composition did not demonstrate significant accumulations in the chromosomes. Most

1 probes of A/T-rich units showed only scattered signals along the chromosomes, with the  
2 exception of the (A)<sub>n</sub>, which had some accumulations in proximal regions.

3 Detailed analysis of some CLs enriched with DNA transposons from the *hAT*  
4 and *Tc1-Mariner* superfamilies demonstrated associations with tandem repeats A/T-rich.  
5 Studies have shown that transposases prefer integrating into TA-rich sequences  
6 (PLASTERK et al., 1999; ARENSBURGER et al., 2011; ATKINSON, 2014). In *R.*  
7 *latirostris*, clusters enriched with the *hAT* and *Tc1-Mariner* also demonstrated a high  
8 proportion of A/T-rich microsatellites units. Moreover, the *Tc1-Mariner* element was *in*  
9 *situ* located in *Rineloricaria* species, including the populations of *R. latirostris* with 46  
10 and 48 chromosomes, which presented only scattered signals along the chromosomes  
11 (PRIMO et al., 2018). These data corroborate the assumption that part of the A/T-rich  
12 microsatellite loci are scattered in the genomes together with TEs, or even in euchromatic  
13 regions. Therefore, these A/T-rich units are not observed with consistent accumulations  
14 in the chromosomes.

15 CL85 demonstrated a large amount of 45S rRNA reads and A/G-rich expansions,  
16 mainly GA and AG. In fish, 45S rDNA loci form GC-rich heterochromatin blocks when  
17 stained with chromomycin or mithramycin (PENDÁS et al., 1993; ALMEIDA-  
18 TOLEDO, 1998; VICARI et al., 2003, 2008). The obtained data for RepeatExplorer,  
19 associated with *in situ* locations, corroborate the repetitive organization of the 45S rDNA  
20 cluster enriched with G-rich repeats in *R. latirostris*, which are in accordance with the  
21 GC-rich nature of this heterochromatic segment. In addition to the 45S rDNA locus, other  
22 chromosomal sites also demonstrated accumulations of G/C-rich repetitive units. In  
23 Neotropical fish, a greater accumulation of G/C-rich sequences is found when compared  
24 to those rich in A/T in the chromosomes (SCACCHETTI et al., 2015 a, b; PUCCI et al.,  
25 2016). These data indicate a tendency of G/C-rich units to accumulate in blocks of

1 heterochromatin in Neotropical fish. Still, as demonstrated in this study, they cannot be  
2 correlated with the greater abundance of these microsatellites in the genomes once this  
3 information must be obtained from genomic annotation.

4         The repetitive DNA content of species with highly rearranged karyotypes has  
5 been accessed to identify synteny breakpoints (LONGO *et al.*, 2009; FARRÉ *et al.*, 2011).  
6 *Rineloricaria* presents species with highly rearranged karyotypes and evidence of  
7 repetitive DNA enrichment adjacent to EBRs (GLUGOSKI *et al.*, 2018). Robust  
8 phylogenetic studies in *Rineloricaria* and its sister groups are still scarce, making it  
9 difficult to propose and establish a chromosomal diversification scenario for its species.  
10 However, some chromosomal studies suggested that lineages with  $2n$  less than 54  
11 chromosomes diversified their karyotypes by Rb fusion, while lineages with  $2n$  greater  
12 than 56 diversified by chromosomal fissions (ROSA *et al.*, 2012; ERRERO-PORTO *et*  
13 *al.*, 2014; PRIMO *et al.*, 2017, 2018; GLUGOSKI *et al.*, 2018; TAKAGUI *et al.*, 2020).  
14 *Rineloricaria latirostris* with karyomorphs 46 and 48 chromosomes diversified their  
15 karyotypes by reducing the number of chromosomes from the subtelo/acrocentric fusion  
16 to form metacentrics (PRIMO *et al.*, 2017, 2018; GLUGOSKI *et al.*, 2018).

17         *Rineloricaria latirostris* ( $2n = 46$ ) metacentric pair 3 is presumably originated  
18 from a Rb fusion of subtelo/acrocentric chromosomes containing degenerate 5S rDNA  
19 (Figure 4a; GLUGOSKI *et al.*, 2018). The degenerate 5S rDNA copy of *R. latirostris*  
20 contains a partial segment of the *hAT* transposon DNA and a segment A/T-rich  
21 (GLUGOSKI *et al.*, 2018). CL analyses also demonstrated the association of *hAT* and 5S  
22 rDNA sequences with microsatellite loci containing A/T-rich units. However, no A/T-  
23 rich microsatellite probe showed evident signals at sites previously recognized as Rb  
24 fusion points, such as the pericentromeric region of metacentric pair 3 of *R. latirostris*  $2n$   
25 = 46. In chromosomal breakage assumption, the sequences involved in DSB site

1 formation must adopt a non-B DNA conformation, a characteristic of the segments with  
2 purine/pyrimidine or polypyrimidine/polypurine repetitive regions which could form  
3 slipped structures during duplication (WELLS, 2007). Kurahashi *et al.* (2006) identified  
4 that some chromosomal rearrangements in the human genome emerge mediated by small  
5 segments with palindromic AT-rich repeats. These AT-rich repeats adopt a cruciform  
6 structure in meiotic cells, creating genomic instability and DSBs, leading to the recurrent  
7 events of chromosomal rearrangements (KURAHASHI *et al.*, 2006). In addition, it has  
8 been known that non-B DNA structures induce DSBs (SZAMALEK *et al.*, 2005), leaving  
9 the ends prone to chromosomal rearrangements (SLIJEPCEVIC, 2016). Thus, non-B  
10 DNA structures in AT-rich expansions in the *Rineloricaria* genome need to be  
11 investigated to understand the chromosomal instability in the lineage.

12 It is known that EBRs are enriched with repetitive sequences, including  
13 transposable elements, tandem repeats, and segmental duplications, providing conditions  
14 for non-allelic homologous recombination (PEVZNER, TESLER, 2003; BAILEY *et al.*,  
15 2004; MURPHY *et al.*, 2005), and thus, providing raw matter to chromosomal  
16 rearrangements (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; LONGO *et al.*, 2009; FARRÉ *et al.*,  
17 2011). Farré *et al.* (2011) also associated the occurrence of sites prone to chromosomal  
18 breaks in regions enriched with microsatellites. However, because it contains a short  
19 segment of DNA able to form non-B DNA structures (SZAMALEK *et al.*, 2005;  
20 KURAHASHI *et al.*, 2006; WELLS, 2007), the EBRs are difficult to recognize, but both  
21 sides of the breakpoint are enriched with repetitive DNA (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006;  
22 LONGO *et al.*, 2009; FARRÉ *et al.*, 2011). In *R. latirostris*, the clustering of repetitive  
23 DNA units previously recognized in Rb fusion points, such as the 5S rDNA and DNA  
24 transposon *hAT*, in addition to the finding that these points are A/T-rich, corroborate the

1 proposition of the occurrence of a prone to break DNA sequence surrounding this  
2 genomic region.

3           Comparing the karyomorphs of *R. latirostris*, it is also possible to suggest that  
4 the metacentric pair 2 (45S rDNA bearer) in the karyomorph  $2n = 46$  chromosomes  
5 originated from an Rb fusion (PRIMO et al., 2017, 2018; GLUGOSKI et al., 2018). In  
6 this assumption, the subtelocentrics bearing 45S rDNA in karyomorph  $2n=48$  fused,  
7 originating a large metacentric (pair 2) in the karyomorph  $2n = 46$  (Figure 4; PRIMO et  
8 al., 2017, 2018; GLUGOSKI et al., 2018). Integrated analysis of CL85 carrying 45S  
9 rDNA sequences and G/C-rich microsatellites with *in situ* localization of probes (GA)<sub>15</sub>,  
10 (CA)<sub>15</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> demonstrated that the NOR site was already enriched with  
11 G/C units in the karyomorph  $2n = 48$ , and according to the proposed instability generated  
12 by these repeats, they may have facilitated chromosomal rearrangements.

13           In addition to the movement of repetitive DNAs and their propensity to generate  
14 chromosomal rearrangements, a probable organization of dysfunctional telomeres  
15 generating unstable DNA sites (PERRY et al., 2004; PAÇO et al., 2013; SLIJEPCEVIC,  
16 2016; BOLZÁN, 2017) is another factor that can be correlated to the Rb rearrangements  
17 in *Rineloricaria* (PRIMO et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018). The metacentric pair 1  
18 of *R. latirostris*  $2n = 46$  has a pericentromeric ITS vestige indicating its origin by end-to-  
19 end fusion from dysfunctional telomere in acrocentrics (PRIMO et al., 2017). The  
20 accumulation of (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, and (GAG)<sub>n</sub> repetitive sequences in the centromere region  
21 of metacentric pair 1 (Figure 4) suggests their involvement in the differentiation of this  
22 chromosome. Moreover, the organization of non-B DNA structures in acrocentric  
23 chromosomes of an ancestral lineage carrying these microsatellite expansions could  
24 trigger DSBs and chromosomal rearrangements.

1           In this report, the findings of RepeatExplorer clustering integrated with *in situ*  
2 localization demonstrated enrichment of repetitive DNA sequences in chromosomal  
3 regions identified as Rb fusion points in *R. latirostris*. According to unstable  
4 chromosomal sites assumption, the enrichment of repetitive DNAs, in most cases, is  
5 located flanking the EBRs (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; LONGO *et al.*, 2009; FARRÉ  
6 *et al.*, 2011). In tandem repetitive DNAs, as multigenic families or microsatellites  
7 expansions, have already been recognized in other species groups as flanking both sides  
8 of a chromosomal rearrangement (HUANG *et al.*, 2008; CAZAUX *et al.*, 2011; FARRÉ  
9 *et al.*, 2011). Our findings suggested that some regions identified as chromosomal fusion  
10 points in *R. latirostris* are composed by multigenic families, ITS and microsatellites units.  
11 However, because it contains homologous sites, the repetitive segments may only have  
12 facilitated the rearrangements, while the central DSB point must be located in the  
13 sequences flanking these regions.

14

## 15 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

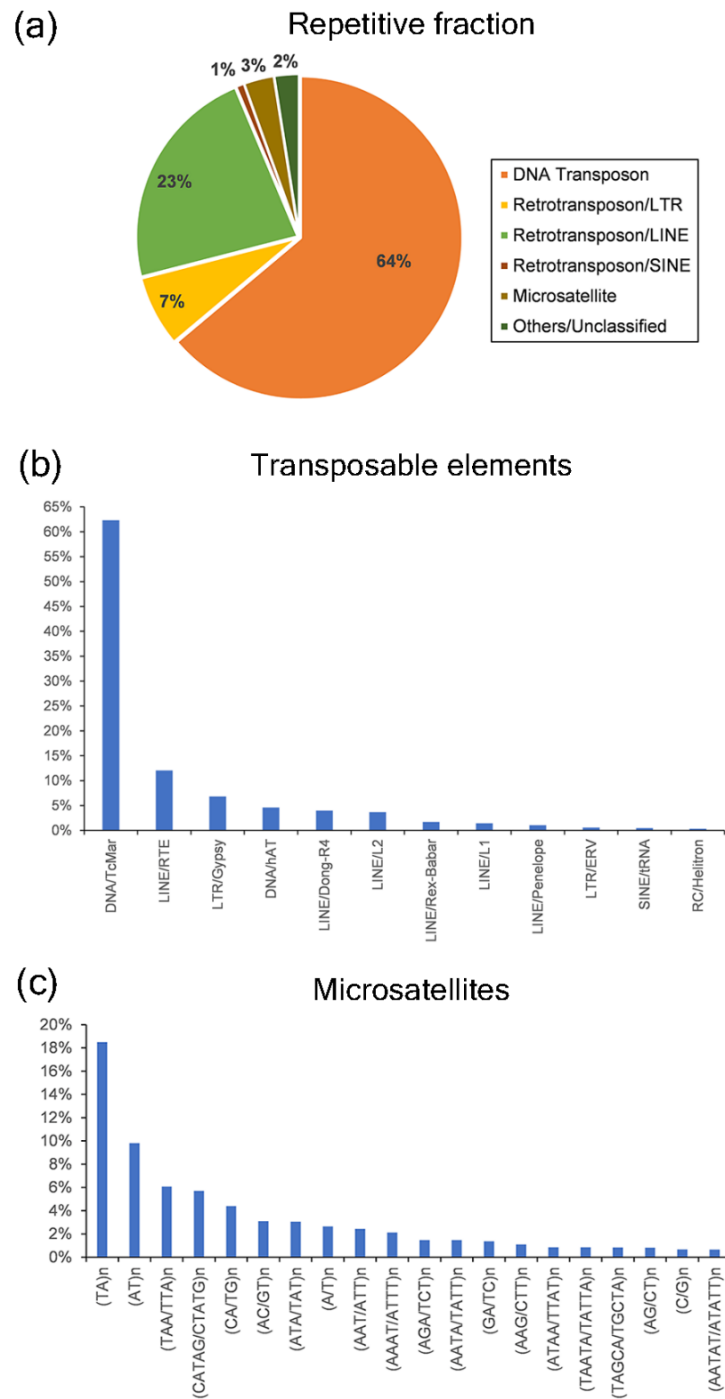
16 As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

## TABLES AND FIGURES

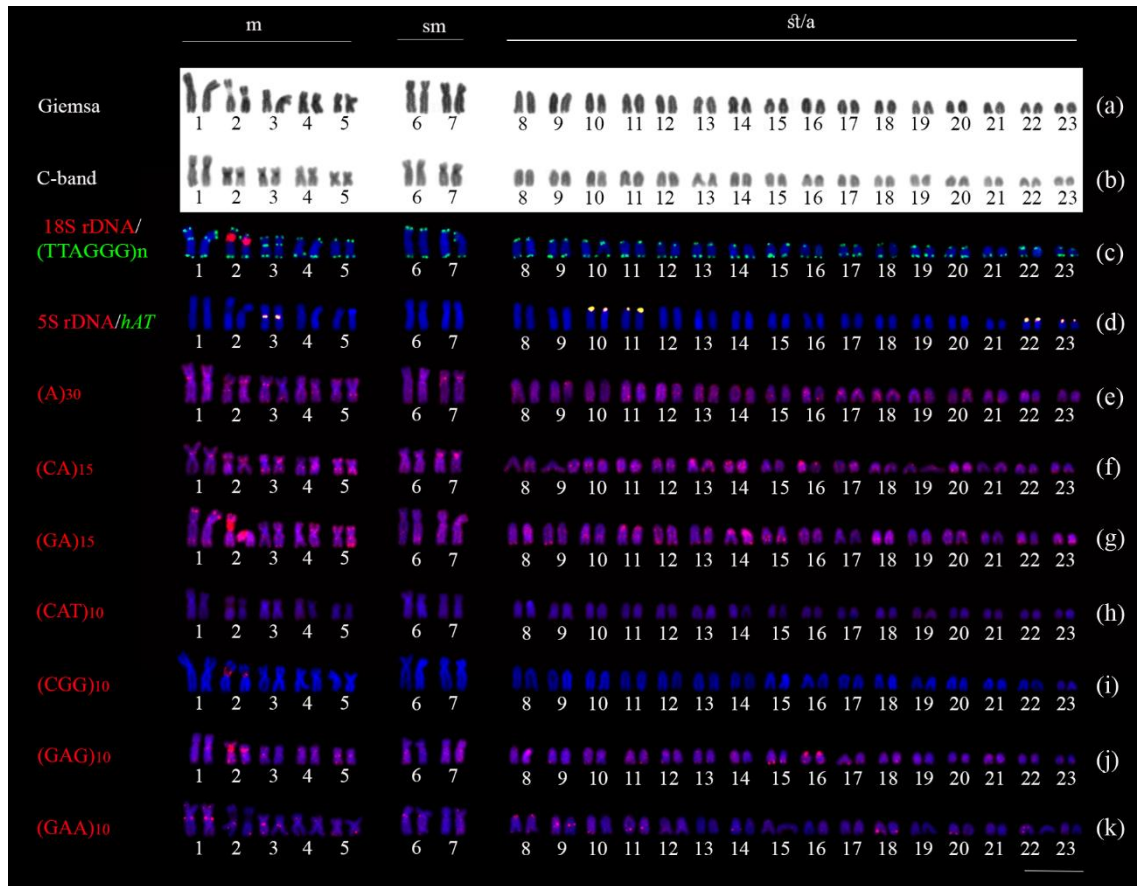
**Table 1.** Recognition possibilities between the probe and chromosomal microsatellite locus in six frames. The same probe could match the chromosomal DNA in three positive frames during the hybridization process due to slippage or mismatched base pairs. In this process, the same probe could recognize six distinct microsatellite loci.

<b>Probe</b>	<b>Frame 1</b>	<b>Frame 2</b>	<b>Frame 3</b>	<b>Frame -1</b>	<b>Frame -2</b>	<b>Frame -3</b>
(A) <sub>30</sub>	(A) <sub>n</sub>	(A) <sub>n</sub>	(A) <sub>n</sub>	(T) <sub>n</sub>	(T) <sub>n</sub>	(T) <sub>n</sub>
(C) <sub>30</sub>	(C) <sub>n</sub>	(C) <sub>n</sub>	(C) <sub>n</sub>	(G) <sub>n</sub>	(G) <sub>n</sub>	(G) <sub>n</sub>
(TA) <sub>15</sub>	(TA) <sub>n</sub>	(AT) <sub>n</sub>	(TA) <sub>n</sub>	(TA) <sub>n</sub>	(AT) <sub>n</sub>	(TA) <sub>n</sub>
(CA) <sub>15</sub>	(CA) <sub>n</sub>	(AC) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub>	(TG) <sub>n</sub>	(GT) <sub>n</sub>	(TG) <sub>n</sub>
(GA) <sub>15</sub>	(GA) <sub>n</sub>	(AG) <sub>n</sub>	(GA) <sub>n</sub>	(TC) <sub>n</sub>	(CT) <sub>n</sub>	(TC) <sub>n</sub>
(TAA) <sub>10</sub>	(TAA) <sub>n</sub>	(AAT) <sub>n</sub>	(ATA) <sub>n</sub>	(TTA) <sub>n</sub>	(ATT) <sub>n</sub>	(TAT) <sub>n</sub>
(CAT) <sub>10</sub>	(CAT) <sub>n</sub>	(ATC) <sub>n</sub>	(TCA) <sub>n</sub>	(ATG) <sub>n</sub>	(GAT) <sub>n</sub>	(TGA) <sub>n</sub>
(CGG) <sub>10</sub>	(CGG) <sub>n</sub>	(GGC) <sub>n</sub>	(GCG) <sub>n</sub>	(CCG) <sub>n</sub>	(GCC) <sub>n</sub>	(CGC) <sub>n</sub>
(GAG) <sub>10</sub>	(GAG) <sub>n</sub>	(AGG) <sub>n</sub>	(GGA) <sub>n</sub>	(CTC) <sub>n</sub>	(CCT) <sub>n</sub>	(TCC) <sub>n</sub>
(AAAT) <sub>8</sub>	(AAAT) <sub>n</sub>	(AATA) <sub>8</sub>	(ATAA) <sub>n</sub>	(ATTT) <sub>n</sub>	(TATT) <sub>n</sub>	(TTAT) <sub>n</sub>
(CATAG) <sub>8</sub>	(CATAG) <sub>n</sub>	(ATAGC) <sub>n</sub>	(TAGCA) <sub>n</sub>	(CTATG) <sub>n</sub>	(GCTAT) <sub>n</sub>	(TGCTA) <sub>n</sub>

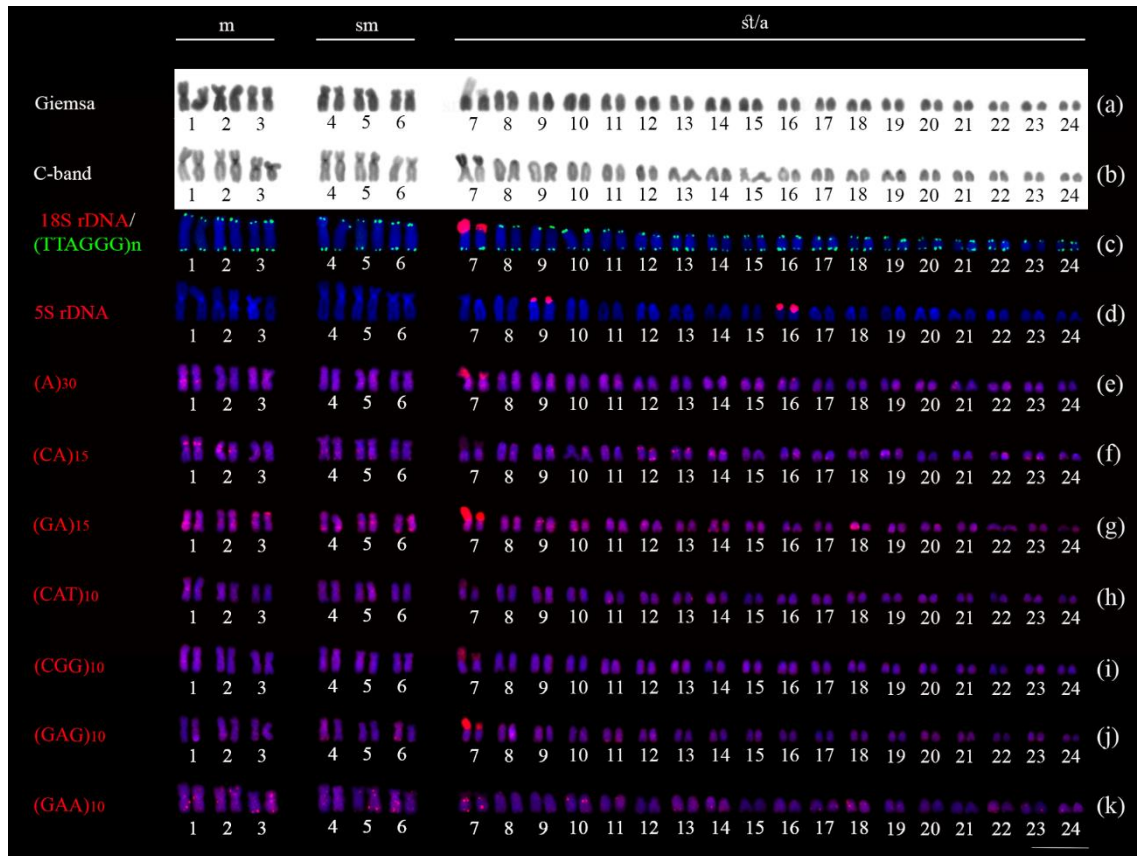




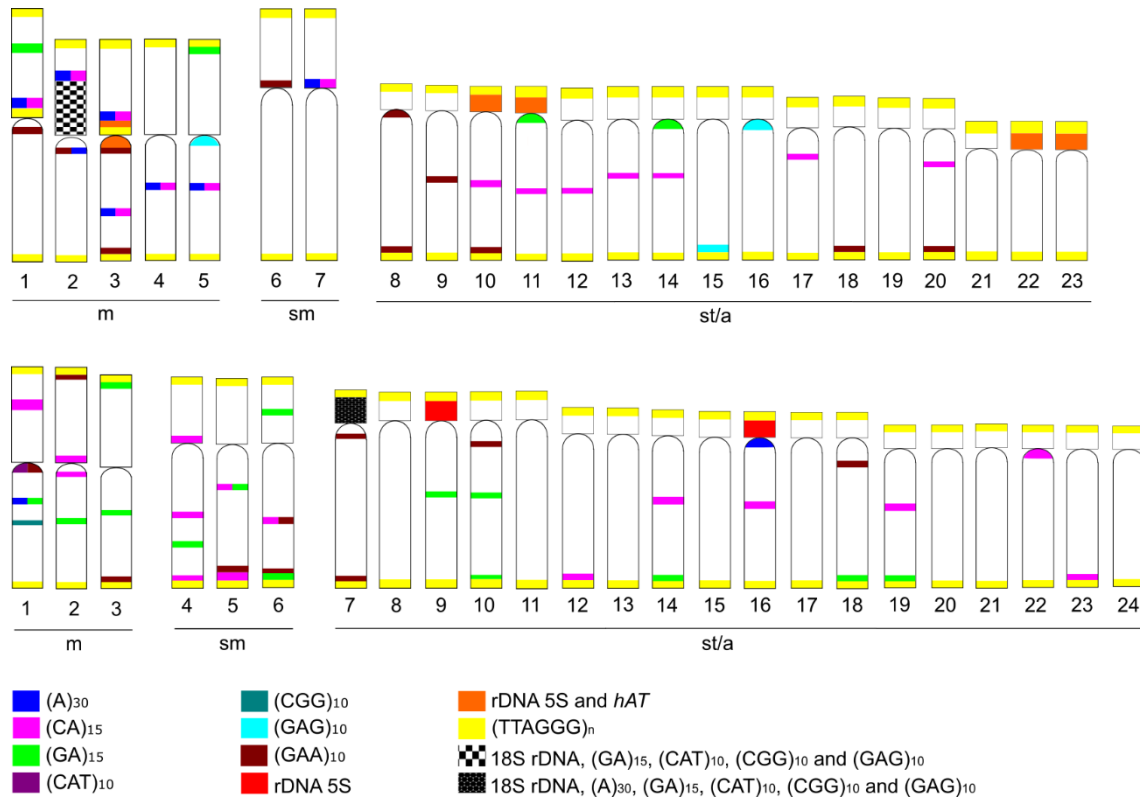
**Figure 1.** Repetitive DNA composition and abundance based on RepeatExplorer analysis in *R. latirostris* (karyomorph 2n = 46 chromosomes) genome. In (a) percentage of repetitive DNA classes conducted with RepeatExplorer. In (b) percentages of more frequent TEs superfamilies versus total TEs in the *R. latirostris* RepeatExplorer analysis. In (c) percentages of more frequent microsatellites versus total of SSR identified in the *R. latirostris* RepeatExplorer analysis.



**Figure 2.** Karyotype of *R. latirostris* from Laranjinha river (karyomorph  $2n = 46$  chromosomes). In (a) Giemsa; (b) C-banding; (c) double FISH with 18S rDNA and (TTAGGG) $_n$  probes; (d) double FISH with *hAT* and 5S rDNA probes; and (e-k) FISH using microsatellite or homopolymers (A) $_{30}$ , (CA) $_{15}$ , (GA) $_{15}$ , (CAT) $_{10}$ , (CGG) $_{10}$ , (GAG) $_{10}$ , and (GAA) $_{10}$ , respectively. Barr = 10  $\mu$ m.



**Figure 3.** Karyotype of *R. latirostris* from Piumhi river (karyomorph  $2n = 48$  chromosomes). In (a) Giemsa; (b) C-banding, (c) double FISH with 18S and (TTAGGG) $_n$  probes; (d) double FISH with *hAT* and 5S rDNA probes; and (e-k) FISH using microsatellite or homopolymers (A) $_{30}$ , (CA) $_{15}$ , (GA) $_{15}$ , (CAT) $_{10}$ , (CGG) $_{10}$ , (GAG) $_{10}$ , and (GAA) $_{10}$ , respectively. Barr = 10  $\mu$ m.



**Figure 4.** Representative idiograms of *R. latirostris* (karyomorphs  $2n = 46$  and  $2n = 48$ ) showing repetitive DNAs chromosomal location. Scattered repetitive DNA signals were not represented. In the karyomorph  $2n = 46$ , the metacentrics 1, 2, and 3 were originated by Rb-fusions. In the karyomorph  $2n=48$ , the Rb-fusions are less evident, but it was suggested that metacentrics 1 and 2 could be originated from chromosome fusions.

### Supplementary material

**Table S1.** Classification and proportion of the Illumina reads submitted to RepeatExplorer analysis.

<b>Classification</b>	<b>Nucleotides</b>	<b>Proportion</b>
DNA Transposon	70157300	0,638745
Retrotransposon/LTR	7809170	0,071098
Retrotransposon/LINE	24926367	0,226941
Retrotransposon/SINE	901995	0,008212
Microsatellite	3323204	0,030256
Others/Unclassified	2718157	0,024747
<b>Total</b>	109836193	1

**Table S2.** Classification and proportion of distinct types/superfamilies of TEs over the total of TEs in RepeatExplorer analysis in *R. latirostris*.

Classification	Nucleotides	Proportion
DNA/TcMar	64893922	0,623176152
LINE/RTE	12523136	0,12025964
LTR/Gypsy	7092051	0,068104946
DNA/hAT	4789477	0,045993334
LINE/Dong-R4	4136950	0,039727119
LINE/L2	3831132	0,03679035
LINE/Rex-Babar	1750426	0,016809336
LINE/L1	1477173	0,014185288
LINE/Penelope	1065958	0,010236392
LTR/ERV	583541	0,005603743
SINE/tRNA	476626	0,004577038
RC/Helitron	339323	0,003258518
SINE/MIR	192925	0,001852658
SINE/5S	128744	0,001236328
DNA/CMC-EnSpm	100630	0,00096635
SINE/L2	98086	0,00094192
LTR/Pao	88267	0,000847628
LINE/I	73408	0,000704937
LINE/CR1	47027	0,0004516
DNA/Sola	43144	0,000414312
DNA/CMC-Transib	22596	0,000216989
DNA/Ginger	17602	0,000169032
LTR/Ngaro	16956	0,000162828
DNA/Chapaev	16890	0,000162195
DNA/Maverick	16228	0,000155837
DNA/P	14806	0,000142182
LTR/Ginger	13778	0,00013231
DNA/Dada	12363	0,000118722
LINE/R2	12250	0,000117637
DNA/PIF-Harbinger	11344	0,000108936
LTR/DIRS	5889	5,65521E-05
DNA/Kolobok	5755	5,52652E-05
DNA/MULE-MuDR	5560	5,33927E-05
DNA/Academ	5084	4,88216E-05
LINE/R1	4695	4,50861E-05
DNA/PIF-ISL2EU	3910	3,75477E-05
DNA/PiggyBac	3788	3,63762E-05

LINE/Jockey	3032	2,91163E-05
DNA/En-Spm	2076	1,99358E-05
LTR/Copia	1720	1,65172E-05
SINE/7SL	1405	1,34922E-05
SINE/Mermaid	1355	1,30121E-05
SINE/ID	1085	1,04193E-05
DNA/IS3EU	995	9,55498E-06
SINE/U	754	7,24066E-06
SINE/B2	527	5,06078E-06
SINE/Alu	277	2,66003E-06
DNA/Crypton	260	2,49678E-06
SINE/B4	211	2,02623E-06
LINE/LOA	98	9,41094E-07
DNA/Merlin	66	6,33798E-07
LINE/Proto2	53	5,08959E-07
DNA/Zator	29	2,78487E-07
Unclassified	198772	0,001908807
<b>Total</b>	1,04E+08	1

**Table S3.** Repeat unit motifs and proportion of different microsatellites and homopolymers over a total in RepeatExplorer analysis in *R. latirostris*.

<b>Repeat unit</b>	<b>Nucleotides</b>	<b>Proportion</b>
(TA)n	614844	0,185015
(AT)n	326096	0,098127
(TAA/TTA)n	201864	0,060744
(CATAG/CTATG)n	189564	0,057043
(CA/TG)n	146116	0,043968
(AC/GT)n	103351	0,0311
(ATA/TAT)n	101643	0,030586
(A/T)n	88070	0,026502
(AAT/ATT)n	80918	0,024349
(AAAT/ATTT)n	70350	0,021169
(AGA/TCT)n	48831	0,014694
(AATA/TATT)n	48619	0,01463
(GA/TC)n	45412	0,013665
(AAG/CTT)n	36413	0,010957
(ATAA/TTAT)n	28302	0,008516
(TAATA/TATTA)n	28270	0,008507
(TAGCA/TGCTA)n	27790	0,008362
(AG/CT)n	27128	0,008163
(C/G)n	22514	0,006775
(AATAT/ATATT)n	21950	0,006605
Others	1065159	0,320522
<b>Total</b>	<b>3323204</b>	<b>1</b>



**Table S4.** Details of repeats composition in RepeatExplorer clusters possessing 5S *rRNA*, 45S *rRNA*, and DNA transposon *hAT*.

Repetitive class	Nucleotides	Proportion
<b>CL18</b>		
Transposable elements		
DNA/ <i>hAT</i>	474493	0.769
DNA/ <i>TcMar</i>	20118	0.033
Others transposable elements	10293	0.017
Total of transposable elements	504904	0.819
Microsatellites		
(AT) <sub>n</sub>	23713	0.038
(TA) <sub>n</sub>	19475	0.032
(AATCAGT) <sub>n</sub> /(ACTGATT) <sub>n</sub>	7381	0.012
(ATTACTG) <sub>n</sub> /(CAGTAAT) <sub>n</sub>	6848	0.011
(ATAAAGT) <sub>n</sub> /(ACTTATT) <sub>n</sub>	5007	0.008
(A) <sub>n</sub> /(T) <sub>n</sub>	4214	0.007
(AATCAAGT) <sub>n</sub> /(ACTTGATT) <sub>n</sub>	3420	0.006
(AGTAA) <sub>n</sub> /(TACT) <sub>n</sub>	2304	0.004
(AGTAATA) <sub>n</sub> /(TATTACT) <sub>n</sub>	1762	0.003
(TCAGTAA) <sub>n</sub> /(TACTGA) <sub>n</sub>	1730	0.003
Others microsatellites	29094	0.047
Total of microsatellites	104948	0.170
Low complexity		
A-rich	5706	0.009
GA-rich	1136	0.001
Total of low complexity	6842	0.011
Total	616694	1
<b>CL28</b>		
Transposable elements		
DNA/ <i>hAT</i>	717491	0.943
DNA/ <i>TcMar</i>	14628	0.019
Others transposable elements	8568	0.011
Total of transposable elements	740687	0.974
Microsatellites		
(TA) <sub>n</sub>	2241	0.003
(ATA) <sub>n</sub> /(TAT) <sub>n</sub>	1484	0.002
(AAT) <sub>n</sub> /(ATT) <sub>n</sub>	1372	0.002
(AT) <sub>n</sub>	1292	0.002
(AATAT) <sub>n</sub> /(ATATT) <sub>n</sub>	797	0.001
(AAATA) <sub>n</sub> /(TATTT) <sub>n</sub>	775	0.001
(A) <sub>n</sub> /(T) <sub>n</sub>	602	0.001
(ATATA) <sub>n</sub> /(TATAT) <sub>n</sub>	434	0.001
Others microsatellites	8331	0.011

Total of microsatellites	17328	0.023
Low complexity		
A-rich	2615	0,003
Others	158	0.001
Total of low complexity	2773	0.004
Total	760788	1
<b>CL31</b>		
Transposable elements		
DNA/ <i>hAT</i>	239735	0.520
LINE/ <i>L2</i>	87995	0.191
DNA/ <i>TcMar</i>	32979	0.072
Others transposable elements	11955	0.026
Total of transposable elements	372664	0.809
Microsatellites		
(AT) <i>n</i>	12471	0.027
(TCA) <i>n</i> /(TGA) <i>n</i>	4713	0.010
(TA) <i>n</i>	4408	0.010
(TGCGCA) <i>n</i>	3530	0.008
(TAGAA) <i>n</i> /(TTCTA) <i>n</i>	3487	0.008
(AGAAT) <i>n</i> /(ATTCT) <i>n</i>	3270	0.007
(AAT) <i>n</i> /(ATT) <i>n</i>	2748	0.006
(ATAA) <i>n</i> /(TTAT) <i>n</i>	2434	0.005
(A) <i>n</i> /(T) <i>n</i>	2409	0.005
(CA) <i>n</i> /(TG) <i>n</i>	2072	0.004
Others microsatellites	39348	0.085
Total of microsatellites	80890	0.176
Low complexity		
A-rich	7053	0.015
Others	35	0.0001
Total of low complexity	7088	0.015
Total	460642	1
<b>CL33</b>		
Ribosomal DNA		
rDNA/5S	616961	0.712
Total of rDNA	616961	0.712
Transposable elements		
SINE/5S	126718	0.146
Others transposable elements	1183	0.001
Total of transposable elements	127901	0.148
Microsatellites		
(AAAT) <i>n</i> /(ATTT) <i>n</i>	51633	0.060
(AATA) <i>n</i> /(TATT) <i>n</i>	9501	0.011
(ATAA) <i>n</i> /(TTAT) <i>n</i>	6107	0.007
(TAAA) <i>n</i> /(TTTA) <i>n</i>	2398	0.003

(A)n/(T)n	2000	0.002
Others microsatellites	1504	0.002
Total of microsatellites	73143	0.084
<b>Low complexity</b>		
A-rich	48250	0.056
Total of low complexity	48250	0.056
Total	866255	1
<b>CL50</b>		
<b>Transposable elements</b>		
DNA/ <i>hAT</i>	358659	0.797
DNA/ <i>TcMar</i>	10773	0.024
Others transposable elements	10654	0.024
Total of transposable elements	380086	0.845
<b>Microsatellites</b>		
(ATA)n/(TATT)n	11754	0.026
(TA)n	5703	0.013
(ACTTG)n/(CAAGT)n	5639	0.013
(AATAT)n/(ATATT)n	2662	0.006
(ATATA)n/(TATAT)n	2490	0.006
(GTCTCAA)n/(TTGAGAC)n	2362	0.005
(GACTTGA)n/(TCAAGTC)n	1831	0.004
(AGACTTG)n/(CAAGTCT)n	1599	0.004
(AT)n	1576	0.004
(TAAA)n/(TTTA)n	1515	0.003
Others microsatellites	20265	0.045
Total of microsatellites	57396	0.128
<b>Low complexity</b>		
A-rich	12287	0.027
Others	111	0.001
Total of low complexity	12398	0.028
Total	449880	1
<b>CL66</b>		
<b>Transposable elements</b>		
DNA/ <i>hAT</i>	972498	0.931
DNA/ <i>TcMar</i>	8905	0.009
Others transposable elements	6118	0.006
Total of transposable elements	987521	0.946
<b>Microsatellites</b>		
(AAT)n/(ATT)n	13716	0.013
(ATA)n/(TAT)n	5411	0.005
(TAA)n/(TTA)n	4590	0.004
(ATTA)n/(TAAT)n	3447	0.003
(AATTA)n/(TAATT)n	3012	0.003
(AAATT)n/(AATTT)n	2268	0.002

(ATAA)n/(TTAT)n	2243	0.002
(AATT)n	1472	0.001
(AG)n/(CT)n	1412	0.001
(ATTAA)n/(TTAAT)n	1157	0.001
Others microsatellites	15015	0.014
Total of microsatellites	53743	0.051
Low complexity		
A-rich	2779	0.003
Others	74	7E-05
Total of low complexity	2853	0.003
Total	1044117	1
<b>CL71</b>		
Transposable elements		
DNA/ <i>hAT</i>	366145	0.876
DNA/ <i>TcMar</i>	9048	0.022
Others transposable elements	9119	0.022
Total of transposable elements	384312	0.919
Microsatellites		
(AAG)n/(CTT)n	5760	0.014
(AGA)n/(TCT)n	4966	0.012
(ACCAAG)n/(CTTGGT)n	2590	0.006
(GAA)n/(TTC)n	1418	0.003
(CCGAGA)n/(TCTCGG)n	1294	0.003
(AT)n	1223	0.003
(TA)n	1215	0.003
(CA)n/(TG)n	1152	0.003
(AGACCA)n/(TGGTCT)n	1066	0.003
(A)n/(T)n	851	0.002
Others microsatellites	10913	0.026
Total of microsatellites	32448	0.078
Low complexity		
A-rich	781	0.002
Others	428	0.001
Total of low complexity	1209	0.003
Total	417969	1
<b>CL85</b>		
Ribosomal DNA		
rDNA/SSU	529890	0.774
rDNA/LSU	129825	0.190
Total of rDNA	659715	0.964
Transposable elements		
DNA/ <i>hAT</i>	125	0.0002
Others transposable elements	67	0.0001
Total of transposable elements	192	0.0003

Microsatellites		
(GA) <sub>n</sub> /(TC) <sub>n</sub>	8697	0.013
(AG) <sub>n</sub> /(CT) <sub>n</sub>	4098	0.006
(AGCG) <sub>n</sub> /(CGCT) <sub>n</sub>	5616	0.008
(GGA) <sub>n</sub> /(TCC) <sub>n</sub>	1970	0.003
(GGGGGA) <sub>n</sub> /(TCCCCC) <sub>n</sub>	988	0.001
(AGG) <sub>n</sub> /(CCT) <sub>n</sub>	974	0.001
Others microsatellites	638	0.001
Total of microsatellites	22981	0.034
Low complexity		
GA-rich	1109	0.002
G-rich	306	0.0004
Total of low complexity	1415	0.002
Total	684303	1

### **Caracterização do sítio de fusão Robertsoniana em *Rineloricaria pentamaculata* (Siluriformes: Loricariidae): envolvimento de sequências rDNA 5S e satélites**

Larissa Glugoski, Geize Deon, Marcelo R. Vicari, Viviane Nogaroto,  
Orlando Moreira-Filho\*

#### **Resumo**

Loricariinae é uma subfamília rica em gêneros e espécies de cascudos e estudos cromossômicos em espécimes de seus diferentes grupos demonstraram ampla variação de  $2n$ , os quais são decorrentes de rearranjos Robertsonianos (Rb). Poucos são os estudos que buscaram caracterizar os sítios cromossômicos instáveis geradores da evolução cariotípica no grupo. As principais propostas evidenciaram que sítios cromossômicos instáveis estão localizados em clusters rDNAs ou adjacentes a esses em loricariíneos, a exemplo de algumas espécies de *Rineloricaria*. Sendo assim, esse estudo teve por objetivo caracterizar um polimorfismo cromossômico numérico observado em *Rineloricaria pentamaculata* (rio Barra Grande-PR). Os diferentes exemplares de *R. pentamaculata* avaliados apresentaram  $2n = 56, 55$  ou  $54$  cromossomos, sendo aqui denominados de cariótipos A, B e C, respectivamente. A caracterização dos cariótipos permitiu identificar que os acrocêntricos 15 e 18 do cariótipo A, portadores de rDNA 5S no braço curto, estiveram envolvidos na fusão Robertsoniana originando um metacêntrico grande, que ocorre em uma cópia no cariótipo B, e um par no C. Ainda, embora vestígios de sequências teloméricas tenham sido evidenciados no ponto de junção, nenhum resquício rDNA 5S foi encontrado no cromossomo fusionado. Os cromossomos acrocêntricos envolvidos na origem da fusão também demonstraram ser enriquecidos com as sequências microssatélites CA e GA, os quais, por conter sequências parálogas, podem ter facilitado o rearranjo. Os achados desse estudo foram discutidos quanto a possibilidade de fusão ponta-a-ponta ou cêntrica na origem do polimorfismo, bem como, quanto ao enriquecimento de sequências repetitivas como substrato para evolução cromossômica.

**Palavras-chave:** cascudos, evolução cariotípica, fusão cêntrica, fusão ponta-a-ponta, sítios cromossômicos instáveis.

## 1. INTRODUÇÃO

A correta organização da região telomérica tem papel central na manutenção da estabilidade e integridade dos cromossomos eucarióticos (PISANO et al., 2008; O'SULLIVAN, KARLSEDER, 2010; GALATI et al., 2013; LAZZERINI-DENCHI, SFEIR, 2016). Nos estudos de evolução cromossômica é proposto que a organização de um telômero funcional impede que as extremidades cromossômicas sejam reconhecidas como pontos de quebras de dupla fita (do inglês, *double strand breaks* - DSBs) pela maquinaria de reparo do DNA (LAZZERINI-DENCHI, SFEIR, 2016; SLIJEPCEVIC, 2016). Por outro lado, DSBs ou telômeros não funcionais (do inglês, *dysfunctional telomeres* - DT) acarretam rearranjos cromossômicos, entre esses, as fusões cromossômicas (SLIJEPCEVIC, 1998, 2016; BOLZÁN, 2012, 2017). As fusões cromossômicas usualmente envolvem a junção de cromossomos subtelo ou acrocêntricos na origem de um cromossomo meta/submetacêntrico, e podem ser denominadas fusões cêntricas ou fusões teloméricas (BOLZÁN, 2012), estando essas amplamente envolvidas nos eventos de redução do  $2n$  presente na diversificação cromossômica de inúmeros grupos de eucariotos (MEYNE et al., 1990).

As fusões cêntricas ocorrem mediante DSBs e reparo das extremidades pelo mecanismo de junção de extremidades não homólogas (do inglês, *non-homologous ending Joining* - NHEJ) (SLIJEPCEVIC, 1998, 2016). Como consequência das DSBs, usualmente as regiões terminais são perdidas e não há a manutenção de vestígios de sítios teloméricos intersticiais (do inglês, *interstitial telomeric sites* - ITS) no ponto de fusão (BOLZÁN, 2012; 2017). Por sua vez, as fusões teloméricas, também conhecidas como fusões *end-to-end*, podem ocorrer pela junção de duas extremidades teloméricas ou a junção de um telômero a uma DSB (BOLZÁN, 2012). Nessa via, as fusões teloméricas são desencadeadas por DTs e, usualmente, mantêm resquícios de ITS no ponto de junção (BOLZÁN, 2012). Um DT surge pela perda da estrutura da alça telomérica devido ao encurtamento da região, ou perda da função de alguma das shelterinas, principalmente a TRF-2 (LAZZERINI-DENCHI, SFEIR, 2016). Como consequência, um DT gera sítios instáveis de DNA, que se comportam como regiões DSBs, desencadeando rearranjos cromossômicos (BOLZÁN, 2012, 2017; SLIJEPCEVIC, 2016).

Loricariidae constitui uma família especiosa de peixes popularmente conhecidos como cascudos que ocorrem em rios das Américas Central e do Sul (FERRARIS, 2007). Suas espécies são extremamente diversificadas cariotipicamente, com variação tanto nos

1 números diploides (2n), quanto na estrutura dos cromossomos (ALVES et al., 2005;  
2 MARIOTTO et al., 2011; BUENO et al., 2012; ROSA et al., 2012; BARROS et al., 2017;  
3 DEON et al., 2020; GLUGOSKI et al., 2020). Entre os representantes da subfamília  
4 Loricariinae, os rearranjos Rb (fissão e fusão cromossômicas) foram descritos como  
5 propulsores da ampla variação do 2n encontrada em representantes de alguns gêneros  
6 (ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014; PRIMO et al., 2017; GLUGOSKI et  
7 al., 2018; TAKAGUI et al., 2020). Além desses, extensivos eventos de remodelagem  
8 cromossômica por rearranjos estruturais (BLANCO et al., 2017; DEON et al., 2020,  
9 2022a, b; SASSI et al., 2020; 2021), e origem de sistemas de cromossomos sexuais  
10 múltiplos (BLANCO et al., 2014, 2017; SASSI et al., 2020; 2021; DEON et al., 2022a,  
11 b) promoveram a ampla diversificação cariotípica entre os loricariíneos.

12 *Rineloricaria* Bleeker, 1862 é o gênero mais especioso de Loricariinae, com 66  
13 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2022) além de inúmeras outras não descritas na  
14 literatura científica (COVAIN et al., 2016). As espécies do gênero apresentam ampla  
15 variação no 2n (36 a 70 cromossomos), além de rearranjos estruturais (ALVES et al.,  
16 2005; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014; PRIMO et al., 2017, 2018;  
17 GLUGOSKI et al., 2018; TAKAGUI et al., 2020). A ocorrência de polimorfismos  
18 cromossômicos numéricos balanceados ou desbalanceados desencadeados por rearranjos  
19 Rb também foram descritos para populações de *R. latirostris*, *R. pentamaculata*, *R. lima*  
20 e *R. lanceolata* (GIULIANO-CAETANO, 1998; ERRERO-PORTO et al., 2011; 2014;  
21 ROSA et al., 2012, PRIMO et al., 2017).

22 Estudos cromossômicos que buscaram elucidar as causas da variação do 2n em  
23 espécies de *Rineloricaria* identificaram clusters *rRNA 5S*, colocalizados ou não para ITS,  
24 em pontos de fusões Rb em *R. lima* e *R. latirostris* (ROSA et al., 2012; GLUGOSKI et  
25 al., 2018). Aliado a esses, a visualização do envolvimento de sítios rDNA 5S em fusões  
26 Rb em outros loricariídeos, a exemplo de *Ancistrus* e *Harttia* enraizaram a hipótese que  
27 a região repetitiva adjacente ou o próprio cluster *rRNA 5S* poderia constituir uma região  
28 de ruptura evolutiva (do inglês, *evolutionary breakpoint region* - EBR) nesses genomas,  
29 os quais desencadearam rearranjos estruturais e numéricos (BARROS et al., 2017;  
30 GLUGOSKI et al., 2018, 2020; DEON et al., 2020, 2022).

31 Análises citogenéticas demonstraram que populações de *R. pentamaculata*  
32 apresentam 2n = 56 cromossomos, além da ocorrência de cromossomos B, e um caso de  
33 fusão Rb (ERRERO-PORTO et al., 2010, 2011; PRIMO et al., 2017). Nesse estudo, foi



- 1 descrito e avaliado um polimorfismo cromossômico numérico em *R. pentamaculata* com
- 2 objetivo de elucidar mecanismos atuantes na instabilidade cromossômica que geram
- 3 diversificação e evolução cromossômica no grupo.

## 2. MATERIAL E METODOS

### 2.1. Local de amostragem e citogenética clássica

Foram analisados citogeticamente 20 exemplares de *R. pentamaculata* (10 machos e 10 fêmeas) coletados no rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí (Prudentópolis – PR, 25°05'21" S e 50°57'22" O). A captura dos animais na natureza foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), mediante a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO No. 15117-3). Os procedimentos realizados nesse estudo foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN No. AE9B9C4) e aprovados no Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Process CEUA No. 0227067/2020) e na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (CQB No. 0063/98). Exemplares testemunho foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) da Universidade Estadual de Maringá (NUP 17141).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos pelo procedimento de *air drying*, de acordo com o descrito por BERTOLLO *et al.* (2015). As lâminas contendo as preparações metafásicas foram coradas em solução de Giemsa 5%. A detecção da heterocromatina seguiu o protocolo descrito por SUMNER (1972).

### 2.2. Síntese das sondas e Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Nesse estudo foram utilizadas sequências repetitivas de rDNA, a sequência telomérica geral dos vertebrados, e diferentes microssatélites em procedimento de localização *in situ* nos cromossomos de *R. pentamaculata*. Para a localização dos rDNAs foram utilizados os clones contendo o rDNA 5S de *R. latirostris* (GLUGOSKI *et al.*, 2018) e a sequência parcial do rDNA 18S de *Prochilodus lineatus* (HATANAKA, GALETTI Jr, 2004). O rDNA 5S foi marcado como sonda por PCR utilizando-se o Aminoallyl-dUTP-Cy5 (Jena Bioscience) e também com a biotina 16-dUTP (Roche Applied Science®), enquanto o rDNA 18S foi marcado com biotina 16-dUTP (Roche Applied Science®). A sequência geral do telômero de vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> foi amplificada de acordo com o descrito em IJDO *et al.* (1991) e marcada como sonda utilizando-se o Aminoallyl-dUTP-Cy5 (Jena Bioscience) de acordo com o descrito por

1 VICARI et *al.* (2010). Sondas marcadas por biotina tiveram a etapa de detecção  
2 utilizando-se o anticorpo Streptavidin Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

3 As sondas microssatélites (A)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CAT)<sub>10</sub> e (CGG)<sub>10</sub> foram  
4 marcadas durante o processo de sua síntese com a adição do fluoróforo Cy3 na  
5 extremidade 5', conforme descrito por Kubat et *al.* (2008).

6 O procedimento de FISH foi realizado com mistura de hibridação contendo (2.5  
7 ng/μL de sonda, 50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato dextrano) a temperatura de 37 °C  
8 por um mínimo de 16 h, conforme descrito em Pinkel et *al.* (1986). Após procedimento  
9 de FISH, os cromossomos foram contracolorados com 4',6-diamidino-2-phenylindole  
10 (DAPI 0.2 μg mL<sup>-1</sup>) e meio de montagem Vectashield (Vector). As imagens foram  
11 analisadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica DM2000 (Leica  
12 Microsystems, Wetzlar, Germany) acoplado a câmera CCD DFC3000 G (Leica). Os  
13 cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm),  
14 subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com a relação de braços (LEVAN et  
15 *al.*, 1964) e os cariótipos foram organizados nas classes m, sm e st+a, usual para  
16 *Rineloricaria* (PRIMO et *al.*, 2017). Para a definição dos sinais de FISH, cerca de 30  
17 metáfases foram analisadas para cada sonda.

### 3. RESULTADOS

Os exemplares de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande demonstraram um polimorfismo do  $2n$  de 54 a 56 cromossomos, sendo aqui denominados de cariótipo A ( $2n = 56$ ), cariótipo B ( $2n = 55$ ) e cariótipo C ( $2n = 54$ ) (Figuras 1, 2 e 3), com a frequência de cada um desses e organização das fórmulas cariotípicas descritas na Tabela 1. O polimorfismo é detectado pela diminuição de dois st/a não homólogos e origem de um cromossomo metacêntrico (maior metacêntrico) no cariótipo B, e pela ausência de dois pares st/a e visualização do par metacêntrico no cariótipo C, quando esses são comparados ao cariótipo A (Figuras 1, 2 e 3).

O bandamento C revelou em comum aos três cariótipos a presença de pequenos blocos heterocromáticos na região pericentromérica dos cromossomos, além de um bloco colocalizado a região organizadora do nucléolo (RON) no braço curto do par cromossômico 5 (Figuras 1B, 2B e 3B). Nos cariótipos B e C, um bloco heterocromático pericentromérico também é visualizado no maior metacêntrico (Figuras 2B e 3B).

A localização *in situ* do rDNA 18S apresentou marcação no braço curto do par st/a 5 (Figuras 1C, 2C e 3C). Por sua vez, o número de sítios rDNA 5S foi variável entre os três cariótipos: quatorze sítios no cariótipo A, sendo nos pares 6, 7, 8, 9, 11, 15 e 18 (Tabela 1, Figura 1C); doze sítios no cariótipo B, sendo nos pares 6, 7, 8, 9 e 11, além de um dos homólogos para os cromossomos 15 e 18 (Tabela 1, Figura 2C); e dez sítios no cariótipo C, sendo nos pares 6, 7, 8, 9 e 11 (Tabela 1, Figura 3C). A localização *in situ* da sonda (TTAGGG)<sub>n</sub> evidenciou marcações somente na região terminal de todos os cromossomos no cariótipo A (Figura 1D), além de ITS no maior metacêntrico dos cariótipos B e C (Figuras 2D e 3D - caixas).

A localização *in situ* da expansão (A)<sub>n</sub> foi evidenciada, nos três cariótipos, no braço curto do cromossomo 5 (colocalizado a RON), na região pericentromérica do par 12, além de sinais dispersos pelos cromossomos (Figuras 1E, 2E e 3E). A sequência (CA)<sub>n</sub> mostrou inúmeros sinais no cariótipo A, com os principais acúmulos na região intersticial do braço longo dos cromossomos 1, 2, 9, 13, 14, 15, 16 e 18, marcações terminais nos cromossomos 3, 4, 5, 11, 14, 15, 18, 21, 22, 25, 26 e 27, e proximal do braço longo nos cromossomos 14, 15 e 23 (Figura 1F). As principais diferenças nos cariótipos B e C são as correspondências dos sinais (CA)<sub>n</sub> no braço longo do cromossomo 15 ao braço longo do maior metacêntrico, e do braço longo do cromossomo 18 ao braço curto do maior

1 metacêntrico (Figuras 2F, 3F e 4), além da ausência do cluster rDNA 5S no metacêntrico  
2 oriundo da fusão (Figura 4).

3 O microssatélite (GA)<sub>n</sub> também apresentou inúmeros sinais nos cromossomos,  
4 com acúmulos nas regiões intersticiais em diferentes intensidades em todos os  
5 cromossomos (Figuras 1G, 2G e 3G). Os cromossomos com maiores acúmulos da  
6 expansão e formação de grandes blocos GA foram os pares 1, 2, 7, 14, 15, 18, 20 e 23  
7 (Figuras 1G, 2G e 3G). Nos cariótipos B e C, os sinais do microssatélite GA também  
8 demonstraram correspondência entre braço longo do cromossomo 15 ao braço longo do  
9 maior metacêntrico, e do braço longo do cromossomo 18 ao braço curto do maior  
10 metacêntrico (Figuras 1G, 2G, 3G e 4), além da ausência do cluster rDNA 5S no  
11 metacêntrico oriundo da fusão (Figura 4). As sondas (CAT)<sub>10</sub> e (CGG)<sub>10</sub> mostraram  
12 acúmulo colocalizado ao sítio rDNA 45S, isto é, no braço curto do par 5 (Figuras 1H-I,  
13 2H-I, 3H-I).

#### 4. DISCUSSÃO

Espécies com polimorfismos cromossômicos oriundos de fusão Rb apresentam diminuição do  $2n$  e manutenção do FN (MEYNE et al., 1990; RICHARDS et al., 1991; SLIJEPCEVIC, 1998). Algumas populações de diferentes espécies de *Rineloricaria* já demonstraram polimorfismos numéricos decorrentes de fusão Rb em seus cariótipos, com os exemplos marcantes em *R. latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998), *R. lima* (ROSA et al., 2012) e *R. lanceolata* (ERRERO-PORTO et al., 2014). No estudo citogenético da população de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande também é detectado um polimorfismo numérico de 54 a 56 cromossomos e manutenção do NF = 64, o qual demonstrou ser oriundo de fusão Rb.

Dados citogenéticos obtidos em outras populações de *R. pentamaculata* no sistema do Alto Rio Paraná demonstraram um  $2n = 56$  cromossomos (ERRERO-PORTO et al., 2010, 2011; MAIA et al., 2010; PRIMO et al., 2017). A observação do  $2n = 56$  em outras populações de *R. pentamaculata*, aliado aos vestígios ITS presentes no maior par metacêntrico dos cariótipos B e C do presente estudo, evidenciam o cariótipo A para a origem do polimorfismo numérico. Nessa via, o maior metacêntrico com vestígios de ITS observado nos cariótipos B e C teria origem por fusão Rb envolvendo dois cromossomos acrocêntricos. Esse tipo de rearranjo cromossômico com a manutenção de resquícios de unidades (TTAGGG) $_n$  no ponto de junção pode ser originado por fusão ponta-a-ponta (*end-to-end fusion*) (MEYNE et al., 1990; METCALFE et al., 1996). Fusões ponta-a-ponta são desencadeadas quando ambos os cromossomos envolvidos apresentam DTs ou quando um acrocêntrico com DSB é fusionado a outro acrocêntrico com DT (METCALFE et al., 1996; BOLZÁN, 2012). Em outra via, ambos os acrocêntricos apresentaram DSBs em seus braços curtos, conseqüentemente, a perda de suas regiões teloméricas, e em seguida, são fusionados pelo mecanismo NHEJ alternativo (*non-homologous ending joining*). É proposto que a telomerase pode catalisar a adição de unidades (TTAGGG) $_n$  nas pontas livres oriundas de DSBs, durante o mecanismo NHEJ alternativo (AZZALIN et al., 2001; RUIZ-HERRERA et al., 2008). Nessa proposta, o vestígio de ITS visualizado no metacêntrico fusionado de *R. pentamaculata* seria oriundo do mecanismo de reparo da DSB e não representaria parte do telômero dos acrocêntricos.

A distinção entre fusão ponta-a-ponta, desencadeada por DT, ou fusão devido DSBs e adição de ITS durante o mecanismo de reparo, ocorre com o sequenciamento da região fusionada (BOLZÁN, 2012). Fusões ponta-a-ponta mantêm sequências

1 teloméricas com orientações 5'-5' opostas (cabeça a cabeça) no ponto de junção  
2 (METCALFE et al., 1996; BOLZÁN, 2012, 2017). Na adição de ITS durante o  
3 mecanismo de reparo, as unidades (TTAGGG)<sub>n</sub> mantêm apenas a orientação 5'-3'  
4 (RUIZ-HERRERA et al., 2008; BOLZÁN, 2012, 2017). Devido a necessidade de  
5 caracterização genômica, a distinção entre os tipos de fusão é difícil em organismos sem  
6 genomas organizados, como no caso de *R. pentamaculata*. Com os marcadores  
7 cromossômicos utilizados no presente estudo foi possível identificar uma provável  
8 homeologia dos acrocêntricos 15 e 18 com os braços longo e curto, respectivamente, do  
9 metacêntrico fusionado. Em comum, esses dois pares de acrocêntricos são portadores de  
10 sítios rDNA 5S em seus braços curtos. Contudo, nenhum resquício rDNA 5S é  
11 evidenciado por FISH no ponto de junção do cromossomo metacêntrico fusionado.

12       Como base nesses dados cromossômicos obtidos para *R. pentamaculata* é possível  
13 propor duas vias de origem para a fusão Rb: DSBs levando a perda dos braços curtos dos  
14 acrocêntricos, adição do ITS durante o mecanismo de NHEJ alternativo, e consequente  
15 fusão cromossômica; ou crossing-over desigual levando a diminuição progressiva e perda  
16 do sítio rDNA 5S nos braços curtos dos acrocêntricos 15 e 18, encurtamento dos  
17 telômeros gerando DTs, e fusão ponta-a-ponta. Em ambas as propostas há envolvimento  
18 do rDNA 5S na fusão cromossômica. Sequências de rDNA 5S defectivas, ou regiões  
19 repetitivas adjacentes a esse cluster cromossômico, foram propostas em atuar como sítios  
20 propensos as DSBs em espécies de diferentes gêneros de Loricariidae, as quais  
21 desencadearam rearranjos cromossômicos (BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al.,  
22 2018, 2020; DEON et al., 2020, 2022a, b). DSBs adjacentes ao rDNA 5S nos  
23 acrocêntricos 15 e 18 levaria a perda dos braços curtos. Nessa via, o ITS presente no  
24 cromossomo metacêntrico fusionado seria catalisado pela telomerase durante o reparo e  
25 junção das extremidades livres dos acrocêntricos, como proposto no mecanismo de NHEJ  
26 alternativo (RUIZ-HERRERA et al., 2008; BOLZÁN, 2012, 2017; LAZZERINI-  
27 DENCHI, SFEIR, 2016).

28       A ocorrência de DTs também foi considerada para explicar a origem de fusões  
29 cromossômicas em *R. latirostris* (GLUGOSKI et al., 2018). De modo similar, essas  
30 fusões em *R. latirostris* também ocorreram em pares cromossômicos portadores de rDNA  
31 5S (GLUGOSKI et al., 2018). É conhecido que sítios rDNA apresentam crossing-over  
32 desigual, levando a duplicação e deleção de unidades, até mesmo a perda da região  
33 (SZOSTAK, WU, 1980). Também é proposto que regiões terminais e subterminais dos

1 cromossomos ricas em unidades repetitivas parálogas realizam extensas trocas não  
2 recíprocas entre cromossomos homólogos e entre não homólogos (recombinação não  
3 homóloga), levando a eventos de duplicação ou deleção próximo aos telômeros (KELLIS  
4 et al., 2003). Ambos os mecanismos poderiam levar a perda dos sítios rDNA 5S e  
5 encurtamento do telômero, com isso gerar DTs, os quais estariam sujeitos ao mecanismo  
6 de fusão ponta-a-ponta.

7 Os cromossomos envolvidos no evento de fusão Rb detectado em *R.*  
8 *pentamaculata* compartilham o enriquecimento de sequências microssatélites,  
9 principalmente com as unidades CA e GA. É proposto que microssatélites adjacentes ao  
10 ponto de fusão, por conter sítios de sequências parálogas em cromossomos não  
11 homólogos, podem atuar como facilitadores do rearranjo (FARRÉ et al., 2011,  
12 GLUGOSKI, capítulo 2). Em especial, em *R. pentamaculata*, por se tratar da avaliação  
13 de um caso de polimorfismo, é possível verificar que as sequências CA e GA já estão  
14 acumuladas nos cromossomos que deram a origem ao rearranjo, isto é, pares  
15 acrocêntricos 15 e 18, descartando a possibilidade dessas terem se acumulado após o  
16 evento de fusão. Assim, é possível inferir que os sítios CA e GA presentes nos  
17 cromossomos 15 e 18 do cariótipo A de *R. pentamaculata* atuaram como facilitadores de  
18 eventos de trocas não homólogas, auxiliando em eventuais eventos de reparo DSBs, como  
19 proposto na via de recombinação não homóloga (PARKS et al., 2015). De modo similar,  
20 as expansões microssatélites foram detectadas adjacentes aos pontos de fusão  
21 cromossômica na espécie *R. latirostris* (GLUGOSKI, capítulo 2). Contudo, o fato do  
22 cromossomo fusionado estar enriquecido com sequências microssatélites pode estar  
23 relacionado a eventos de modificação da cromatina para a organização do centrômero.

24 De acordo com a hipótese *centromere-from-telomere* (VILLASANTE et al.,  
25 2007), a integridade cromossômica é mantida pela ocorrência de centrômeros e telômeros  
26 funcionais, e como esses são estruturas heterocromáticas, são provavelmente regulados  
27 por mecanismos epigenéticos (SLIJEPCEVIC, 2016). Nessa proposta, a priori da fusão  
28 Rb entre cromossomos acrocêntricos, sequências teloméricas são diferenciadas em  
29 unidades subteloiméricas, e essas seriam selecionadas para ancorar as proteínas do  
30 citoesqueleto (VILLASANTE et al., 2007; SLIJEPCEVIC, 2016). Com a ocorrência da  
31 fusão Rb, as sequências subteloiméricas dos acrocêntricos seriam reposicionadas para o  
32 ponto de junção do cromossomo de dois braços, isto é, para a porção centromérica, e  
33 mecanismos epigenéticos atuariam na geração do neocentrômero (VILLASANTE et al.,



1 2007; SLIJEPCEVIC, 2016). Aliado a esse fato, em *Schizosaccharomyces* foi constatado  
2 que centrômeros ancestrais diferenciaram de um núcleo central montado em CENP-  
3 ACnp1 cercado por clusters de tDNA e rDNAs 5S (TONG et al., 2019). Nessa via, o  
4 enriquecimento de sequências repetitivas microssatélites e de rDNA 5S nos acrocêntricos  
5 que dão origem a fusão Rb em *R. pentamaculata* abre perspectiva de investigação dessas  
6 terem sido diferenciadas na organização do centrômero no cromossomo fusionado.

7 Ainda a respeito da localização *in situ* das sequências microssatélites, os principais  
8 acúmulos observados nos cromossomos de *R. pentamaculata* foram em porções terminais  
9 e proximais dos cromossomos, além do sítio da NOR. Análise genômica associada à  
10 localização *in situ* de microssatélites em *R. latirostris* (rio Laranjinha- PR) demonstrou  
11 que o sítio da NOR detém acúmulos de unidades ricas em G/C (GLUGOSKI, capítulo 2),  
12 assim como em *R. pentamaculata*. Ainda, assim como em *R. latirostris* (GLUGOSKI,  
13 capítulo 2), *R. pentamaculata* possui acúmulos microssatélites em regiões adjacentes ao  
14 ponto de fusão Rb.

15 Os dados obtidos permitiram identificar cromossomos acrocêntricos envolvidos  
16 na fusão Rb e formação do polimorfismo cromossômico numérico em *R. pentamaculata*  
17 do rio Barra Grande. Em comum, os acrocêntricos envolvidos na fusão Rb detêm rDNA  
18 5S no braço curto, contudo nenhum rDNA é detectado no ponto de junção. Esses  
19 resultados tornam a destacar a atuação de sítios cromossômicos instáveis dentro ou  
20 adjacentes as sequências rDNA 5S em loricariíneos. Nesse estudo discutimos prováveis  
21 vias de formação de fusão ponta-a-ponta ou centromérica na reorganização do  
22 cromossômica de *R. pentamaculata*.

23

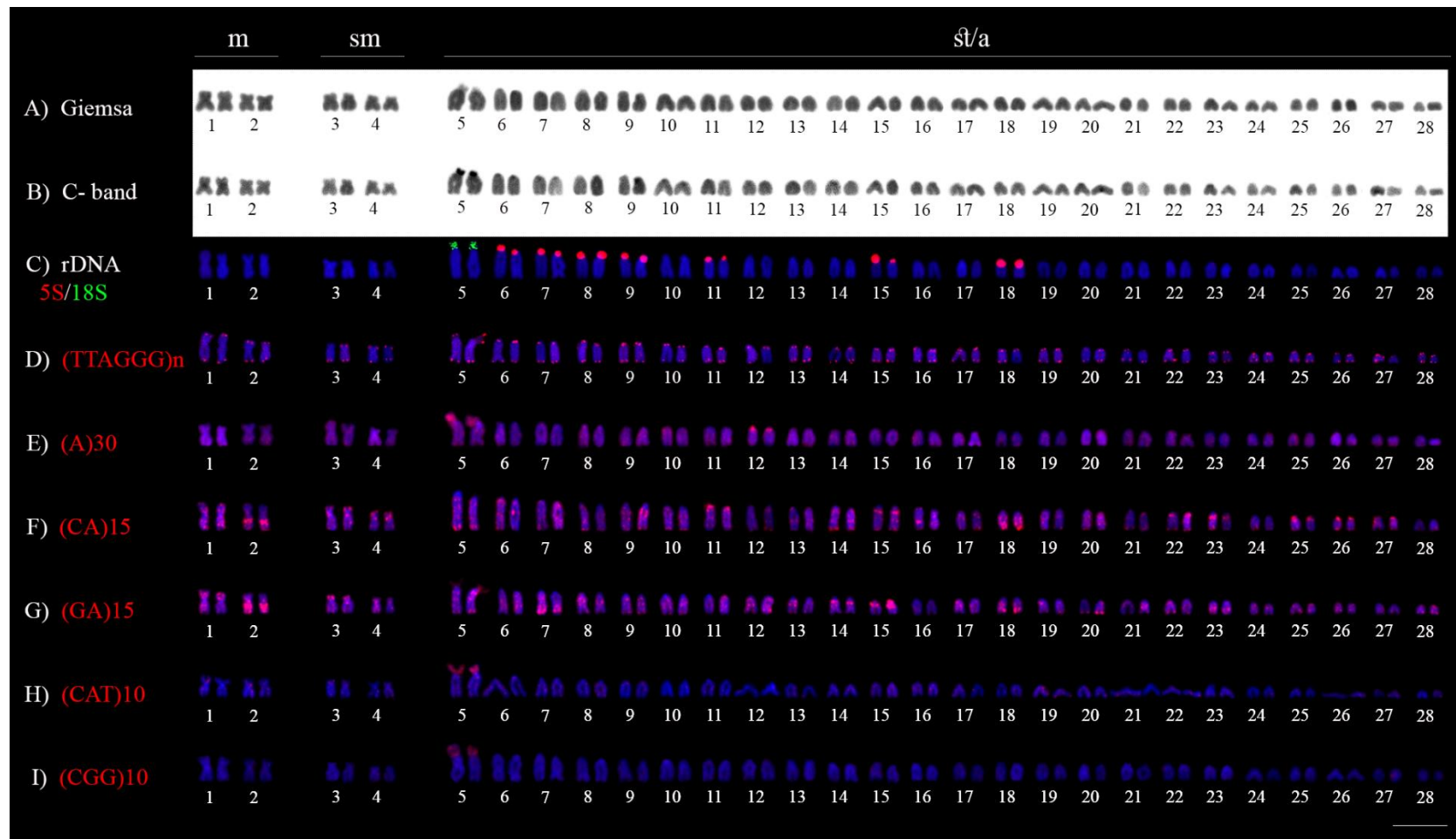
## 24 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

25 As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese

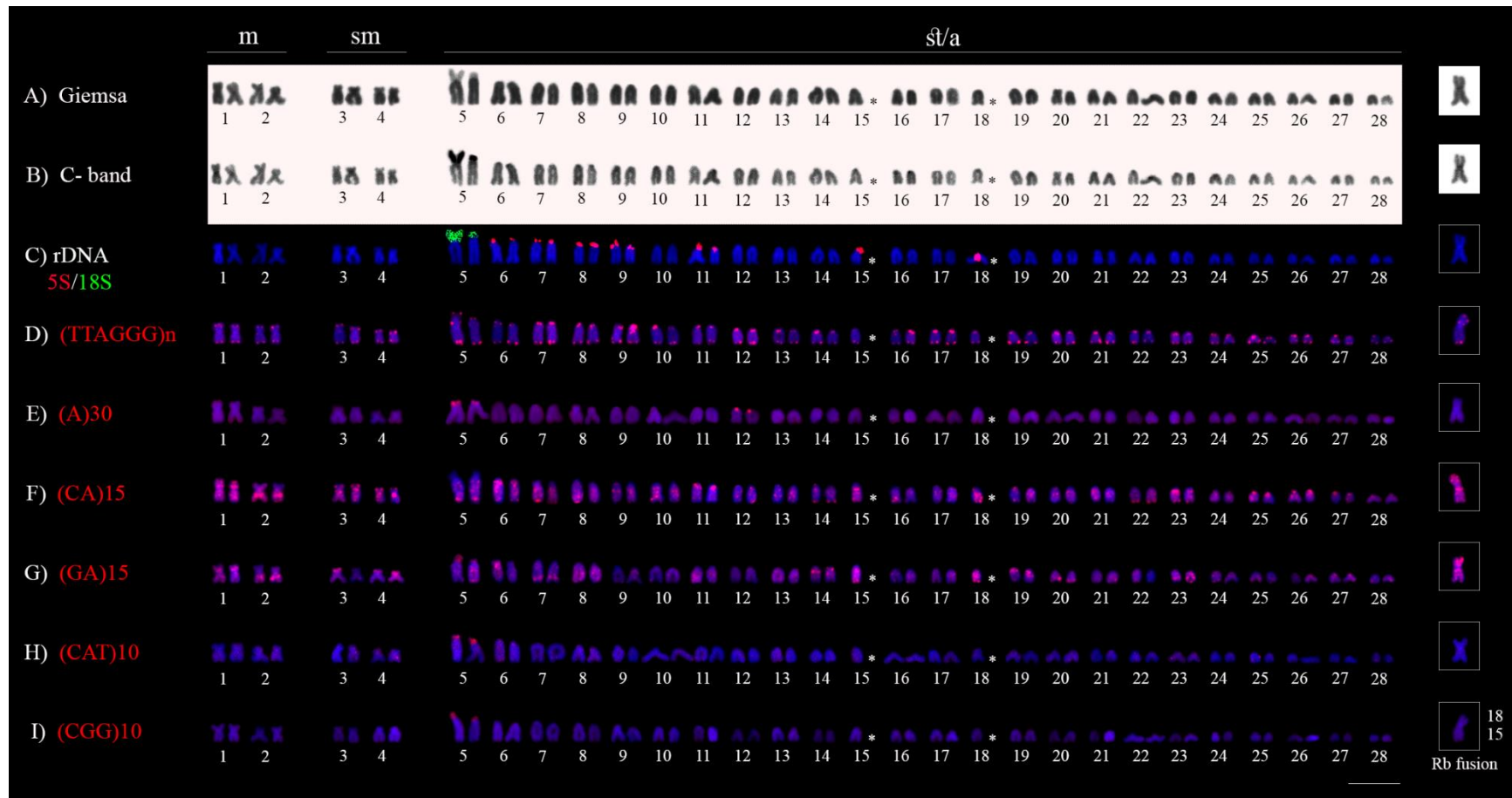
## TABLES AND FIGURES

**Tabela 1.** Análise da organização cariotípica e frequência dos cariótipos A, B e C na população de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande. N: número de indivíduos analisados. 2n: número diploide; FN: número fundamental; m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; st/a: subteloicêntrico/ acrocêntrico. \* apenas um dos homólogos apresentando o sítio rDNA 5S.

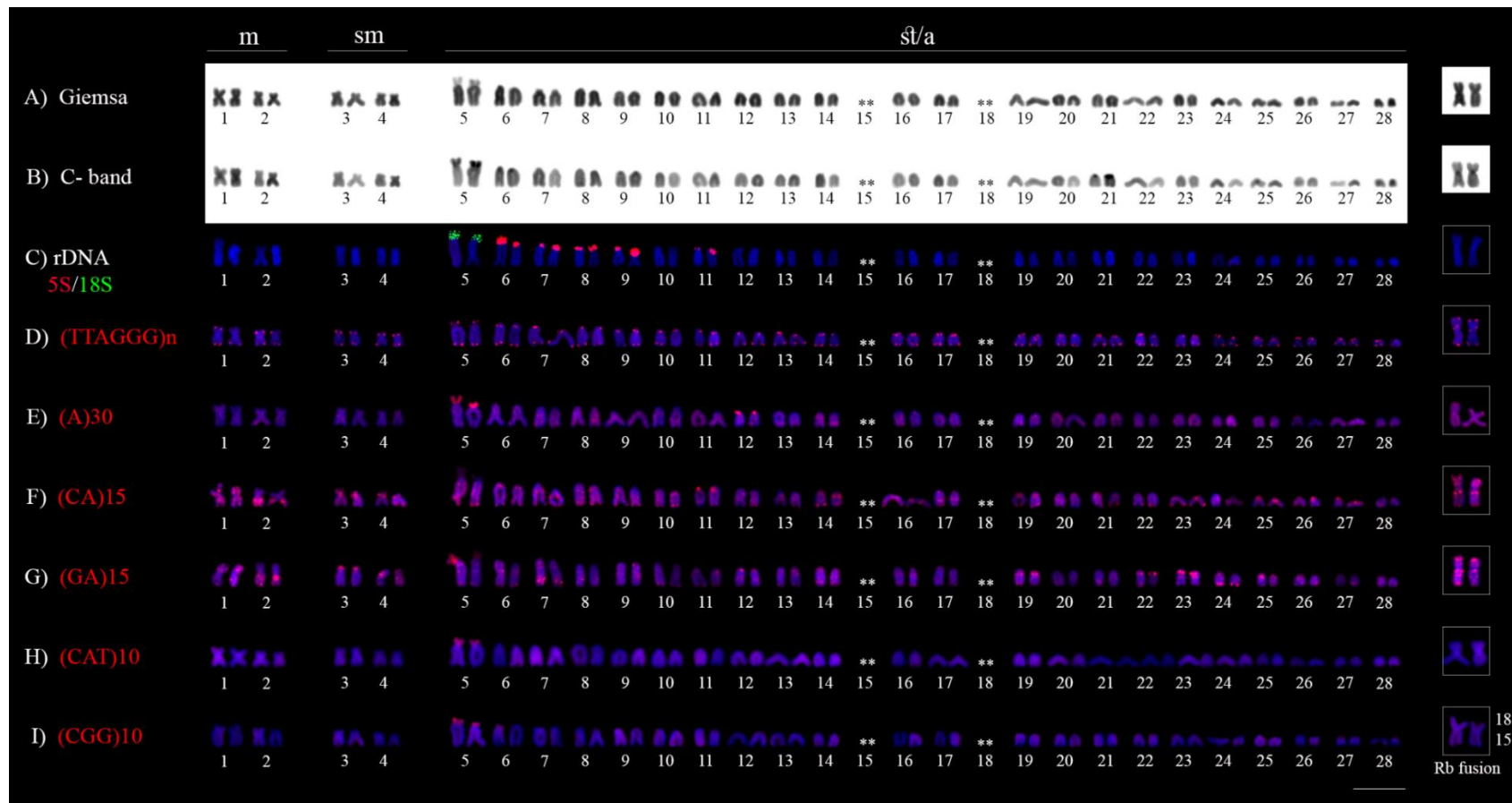
	N♂	N♀	2n	NF	Fórmula cariotípica	rDNA 5S	rDNA 18S
<b>Cariótipo A</b>	4	4	56	64	4m+4sm+48st/a	6, 7, 8, 9, 11, 15, 18	5
<b>Cariótipo B</b>	2	3	55	64	5m+4sm+46st/a	6, 7, 8, 9, 11, 15*, 18*	5
<b>Cariótipo C</b>	4	3	54	64	6m+4sm+44st/a	6, 7, 8, 9, 11	5



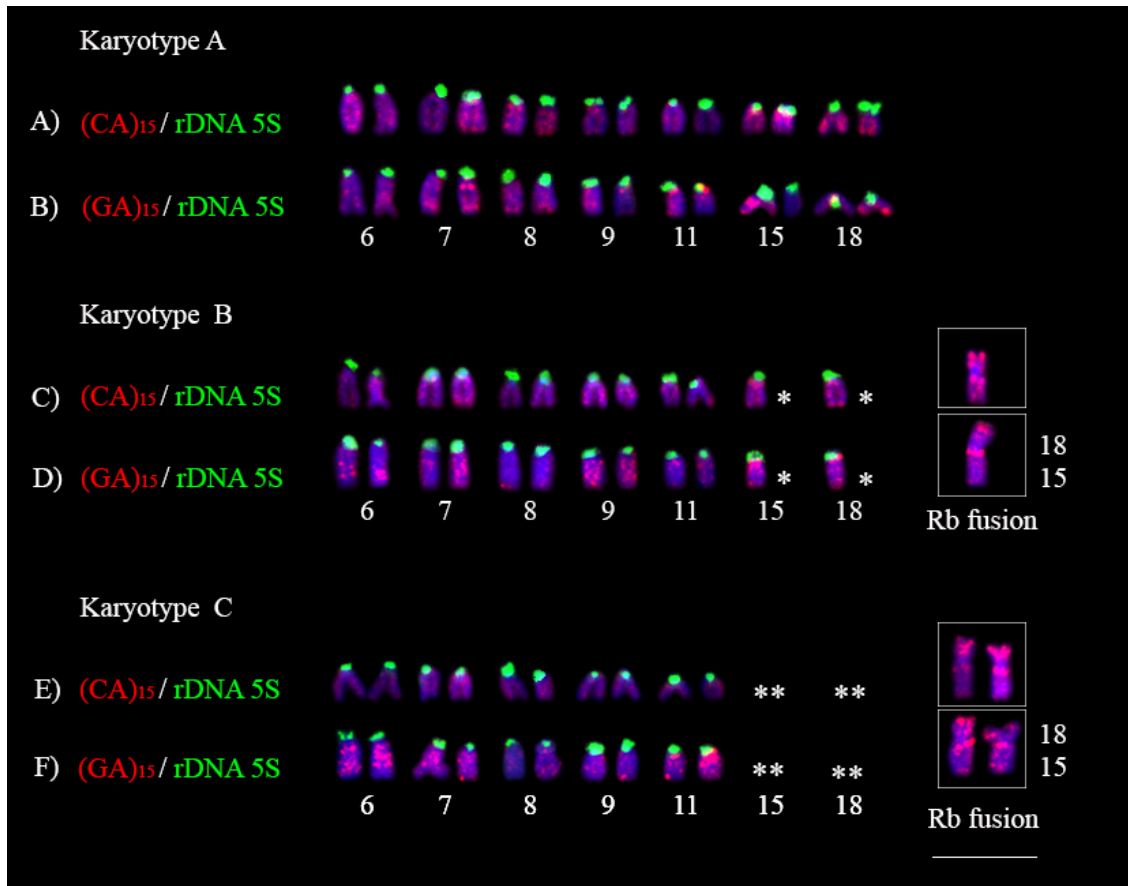
**Figura 1.** Cariótipo A ( $2n = 56$ ) de *R. pentamaculata*. Em (A) coloração convencional por Giemsa; (B) bandamento C; (C) dupla FISH com as sondas de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho); (D-I) localização *in situ* das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, respectivamente. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 2.** Cariótipo B ( $2n = 55$ ) de *R. pentamaculata*. Em (A) coloração convencional por Giemsa; (B) bandamento C; (C) dupla FISH com as sondas de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho); (D-I) localização *in situ* das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, respectivamente. Na caixa, o cromossomo metacêntrico oriundo de fusão Rb a partir dos braços longos dos cromossomos 15 e 18. \* ausência de um cromossomo homólogo. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 3.** Cariótipo C ( $2n = 54$ ) de *R. pentamaculata*. Em (A) coloração convencional por Giemsa; (B) bandamento C; (C) dupla FISH rDNA com as sondas de 18S (verde) e 5S (vermelho); (D-I) localização *in situ* das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub> e (CGG)<sub>n</sub>, respectivamente. Na caixa, o par metacêntrico oriundo de fusão Rb a partir dos braços longos dos cromossomos 15 e 18. \*\* ausência do par cromossômico. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 4.** Duplas FISH com as sondas  $(CA)_{15}/rDNA\ 5S$  e  $(GA)_{15}/rDNA\ 5S$  nos cari6tipos A, B e C de *R. pentamaculata*. S6o mostrados os pares cromoss6micos portadores dos s6itos rDNA 5S. No cari6tipo A, os pares 15 e 18 est6o representados pelos hom6logos. No cari6tipo B, 6 visualizado um acroc6ntrico 15, um acroc6ntrico 18, e um cromossomo metac6ntrico com correspond6ncias de sinais microssat6lites CA e GA entre seu bra6o longo e o acroc6ntrico 15, e entre o bra6o curto e o acroc6ntrico 18. J6 no cari6tipo C, nenhum acroc6ntrico dos pares 15 e 18 s6o observados na forma livre, sendo esses correspondentes aos bra6os longo e curto do par metac6ntrico oriundo de fus6o. Barra = 10  $\mu m$ .

## 1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 Alekseyev MA, Pevzner PA. Breakpoint graphs and ancestral genome reconstructions.  
3 Genome Res. 2009;19(5): 943-957.
- 4 Almeida-Toledo LF. Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. In: Malabarba  
5 LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CA (eds). Phylogeny and classification  
6 of Neotropical fishes. 1998. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, BR. p. 583-588.
- 7 Alves AL, Oliveira C, Foresti F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies  
8 Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). Caryologia.  
9 2003; 56(1):57-63.
- 10 Alves AL, Oliveira C, Foresti F. Comparative cytogenetics analyses in eleven species of  
11 the subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae).  
12 Genetica. 2005; 124: 127–136
- 13 Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. Karyotypic relationship among  
14 the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex  
15 chromosome system in a Neotropical fish species. Genetica. 2006; 128:1-9.
- 16 Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA. Chromosome studies in  
17 Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I.XX/XY sex chromosomes  
18 heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. Cytologia. 1992; 57: 369-372.
- 19 Andrews S. 2012. FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data.
- 20 Arensburger P, Hice RH, Zhou L, Smith RC, Tom AC, Wright JA, Knapp J, O’Brochta  
21 DA, Craig NL, Atkinson PW. Phylogenetic and functional characterization of the  
22 *hAT* transposon superfamily. Genetics. 2011; 188: 145-57.
- 23 Armbruster JW. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes  
24 (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. Zool J Linn  
25 Soc. 2004; 141:1–80.
- 26 Armbruster JW. The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a  
27 reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes:  
28 Loricariidae). Zootaxa. 2008; 1822:1–76.
- 29 Artoni RF. Estudos Citogenéticos na Família Loricariidae, com ênfase no gênero  
30 Hypostomus Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado em  
31 Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.  
32 1996; 162 pp.
- 33 Artoni RF, Venere PC, Bertollo LAC. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system  
34 in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). The Japan Mendel Society. 1998; 63: 421-  
35 425.
- 36 Artoni RF, Bertollo LAC. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish  
37 (Siluriformes). Hereditas. 2001; 134:201–210.
- 38 Artoni RF, Vicari MR, Almeida MA, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Karyotype diversity  
39 and fish conservation of southern field from south Brazil. Reviews in Fish Biology  
40 and Fish. 2009; 19: 393-401.
- 41 Atkinson PW. 2014. *hAT* Transposable Elements. In Mobile DNA III. Edited by M.  
42 Chandler, M. Gellert, A.M. Lambowitz, P.A. Rice and S.B. Sandmeyer. ASM Press.  
43 pp. 773-800.

- 1 Azambuja M, Schemberger MO, Nogaroto V, Moreira-Filho O, Martins C, Vicari MR.  
2 Major and minor U small nuclear RNAs genes characterization in a neotropical fish  
3 genome: Chromosomal remodeling and repeat units dispersion in Parodontidae.  
4 *Gene*. 2022; 826.
- 5 Azzalin CM, Nergadze SG, Giulotto E. Human intrachromosomal telomeric like repeats:  
6 Sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*. 2001; 110: 75–82.
- 7 Bacolla A, Wells RD. Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human  
8 disease. *J Biol Chem*. 2004; 279: 47411–47414.
- 9 Bagshaw AT. Functional mechanisms of microsatellite DNA in eukaryotic  
10 genomes. *Genome Biol Evol*. 2017; 9(9): 2428-2443.
- 11 Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model for the origin and expansion of  
12 human segmental duplications. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;  
13 73(4): 823-834.
- 14 Bailey JA, Baertsch R, Kent WJ, Haussler D, Eichler EE. Hotspots of mammalian  
15 chromosomal evolution. *Genome Biol*. 2004; 5: R23.
- 16 Bailey JA, Eichler EE. Primate segmental duplications: Crucibles of evolution, diversity  
17 and disease. *Natl Rev*. 2006; 7: 552–564.
- 18 Barbosa P, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Vicari MR. Karyotype  
19 analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern  
20 Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. *Neotrop Ichthyol*. 2017;  
21 15(1):e160056.
- 22 Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR.  
23 Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: what is 5S rDNA  
24 role? *Gene*. 2017; 608:20–27.
- 25 Bellafrente E, Margarido VP, Moreira-Filho O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and  
26 *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by  
27 cytogenetic analyses. *Genet Mol Biol*. 2005; 28(4):710-716.
- 28 Berra TM. Freshwater fish distribution. Academic Press. London, 2001.
- 29 Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O. Direct chromosome preparation from  
30 freshwater teleost fishes. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo  
31 LF, editors. Fish cytogenetic techniques (Chondrichthyans and Teleosts). CRC Press:  
32 Enfield USA. 2015; 21–26.
- 33 Biet E, Sun J, Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among  
34 recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids*  
35 *Research*. 1999; 27: 596-600.
- 36 Bitencourt JA, Affonso PRAM, Giuliano-Caetano L, Carneiro PLS, Dias AL. Population  
37 divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariidfish *Hypostomus*  
38 *aff. unae* from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 2012; 11: 933–  
39 943.
- 40 Blanco DR. Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia*  
41 (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução  
42 cariotípica do grupo. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São  
43 Carlos, São Paulo. 2012; 187pp.



- 1 Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Traldi JB, Bertollo LA, Moreira-Filho O. The role of the  
2 Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system  
3 and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes,  
4 Loricariidae). Rev Fish Biol Fish. 2013; 23:127–134.
- 5 Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP,  
6 Moreira-Filho O. Origin of the X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system of *Harttia*  
7 *punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH  
8 with ribosomal DNA markers. Genetica. 2014; 142:119–126.
- 9 Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Traldi JB, Bueno V, Martinez JdF, Brandão H, Oyakawa  
10 OT, Moreira-Filho O. Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Armored  
11 Catfish Species of the Genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). Zebrafish. 2017;  
12 14: 169–176.
- 13 Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN. Transposable elements as  
14 drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. Chromosome Research.  
15 2008; 16: 203-215.
- 16 Bolzán A. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric  
17 sequences. Mutagenesis. 2012; 27(1): 1-15.
- 18 Bolzán AD. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function,  
19 instability and Evolution. Mutat Res. 2017; 773: 51-65
- 20 Boulenger GA. Description of three new species of Siluroid Fishes from Southern Brazil.  
21 Ann Mag Nat Hist. 1900; 5: 165–166.
- 22 Briggs JC. The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new  
23 appraisal. Journal of Biogeography. 2005; 32(2): 287-294.
- 24 Bringmann P, Luhrmann R. Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6  
25 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. EMBO39 Journal.  
26 1986; 5(13):3509-3516.
- 27 Britsky HA, Sato Y, Rosa ABS. Manual de identificação de peixes da região de Três  
28 Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3<sup>a</sup>  
29 ed. Brasília: CODEVASF; 1988; 115 pp.
- 30 Bruford MW, Wayne RK. Microsatellites and their application to population genetic  
31 studies. Curr Opin Genet Dev. 1993; 3(6): 939-43.
- 32 Bruschi DP, Rivera M, Lima AP, Zúñiga AB, Recco-Pimentel SM. Interstitial Telomeric  
33 Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical  
34 evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). Mol  
35 Cytogenet. 2014; 7: 22.
- 36 Buck S, Sazima I. An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in southeastern Brazil:  
37 distribution, activity, and feeding. Ichthyological Exploration of Freshwaters. 1995;  
38 6: 325– 332.
- 39 Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP. Trends in chromosome evolution in the genus  
40 *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about  
41 the correlation between diploid number and chromosomes types. Rev Fish Biol Fish.  
42 2011; 22: 241–250.

- 1 Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP. Trends in chromosome evolution in the genus  
2 *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about  
3 the correlation between diploid number and chromosomes types. Rev Fish Biol Fish.  
4 2012; 22: 241–250.
- 5 Bueno V, Venere PC, Konerat JT, Zawadzki CH, Vicari MR, Margarido VP. Physical  
6 mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803  
7 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. Sci World J. 2014;  
8 1-8.
- 9 Bueno V, Konerat JT, Zawadzki CH, Venere PC, Blanco DR, Margarido VP. Divergent  
10 Chromosome Evolution in Hypostominae Tribes (Siluriformes: Loricariidae):  
11 Correlation of Chromosomal Data with Morphological and Molecular Phylogenies.  
12 Zebrafish. 2018; 15(5):492-503.
- 13 Cabral-De-Mello DC, Valente GT, Nakajima RT, Martins C. Genomic organization and  
14 comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in  
15 cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. Chromosome Research.  
16 2012; 20: 279–292.
- 17 Carbone L, Harris RA, Vessere GM, Mootnick AR, Humphray S, Rogers J, Kim KS, Wall  
18 JD, Martin D, Jurka J, Milosavljevic A, Jong PJ. Evolutionary Breakpoints in the  
19 Gibbon Suggest Association between Cytosine Methylation and Karyotype  
20 Evolution. PLoS Genetics. 2009; 5(6): e1000538.
- 21 Cardoso AL, Sales KAH, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Noronha RCR. Comparative  
22 cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae,  
23 Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. Comparative Cytogenetics. 2013; 7(1): 43–  
24 41.
- 25 Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJ, Britton-Davidian J. Are ribosomal DNA  
26 clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae).  
27 BMC Evol Biol. 2011; 11: 124.
- 28 Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Cytogenetic characterization and  
29 description of an XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi*  
30 (Siluriformes, Loricariidae). Cytogenetic and Genome Research. 2006; 112: 320–  
31 324.
- 32 Cereali SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, Froehlich O, Giuliano-Caetano L.  
33 Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of  
34 the Planalto da Bodoquena, Brazil. Genet Mol Res. 2008; 7: 583-591.
- 35 Charlesworth B, Snegowski P, Stephan W. The evolution dynamics of repetitive DNA in  
36 eukaryotes. Nature. 1994; 371:215-220.
- 37 Chaves R, Santos S, Guedes-Pinto H. Comparative analysis (Hippotragini versus caprini,  
38 Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction  
39 endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution.  
40 Genetica. 2004; 121: 315-325.
- 41 Chen MW, Anné J, Volckaert G, Huysmans E, Vandenberghe A, Dewachter R. The  
42 nucleotide sequences of the 5S rRNAs of sevenmoids and a yeast and their use  
43 instudying ascomycete phylogeny. Nucleic Acids Research. 1984; 12: 4881–4892.

- 1 Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LA. The chromosomal distribution of microsatellite  
2 repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex  
3 chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 132: 289–296.
- 4 Coan RLB, Martins C. Landscape of transposable elements focusing on the B  
5 chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genes.* 2018; 9: 269.
- 6 Covain R, Fisch-Muller S, Oliveira C, Mol JH, Montoya-  
7 Burgos JI, Dray S. Molecular phylogeny of the highly diversified catfish  
8 subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with  
9 morphological classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2016; 94: 492–  
10 517.
- 11 Covain R, Fisch-Muller S. The genera of the Neotropical armored catfish subfamily  
12 Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa.*  
13 2007; 1462: 1-40.
- 14 Crollius HR, Jaillon O, Dasilva C, Ozouf-Costaz C, Fizames C, Fischer C, Bouneau L,  
15 Billault A, Quetier F, Saurin W, Bernot A, Weissenbach J. Characterization and  
16 repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon*  
17 *nigroviridis*. *Genome Research.* 2000; 10: 939-949.
- 18 Cross I, Rebordinos L. 5S rDNA and U2 snRNA are linked in the genome of  
19 *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* oysters: does the (CT)<sub>n</sub>(GA)<sub>n</sub>  
20 microsatellite stabilize this novel linkage of large tandem arrays? *Genome.* 2005; 48:  
21 1116-1119.
- 22 Cuadrado A, Jouve N. Similarities in the chromosomal distribution of AG and AC repeats  
23 within and between *Drosophila*, human and barley chromosomes. *Cytogenet*  
24 *Genome Res.* 2007; 119: 91-99.
- 25 Cuadrado N, Jouve N. Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using  
26 non-denaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma.* 2010; 19: 495-503.
- 27 Cuadrado Á, Jouve N. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by NDFISH in  
28 heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics.* 2011; 12: 205.
- 29 Da Silva M, Matoso DA, Ludwig LAM, Gomes E, Almeida MC, Vicari MR, Artoni RF.  
30 Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçú  
31 basin, southern Brazil. *Environmental Biology of Fishes.* 2011; 91: 361-366.
- 32 Damas J, Kim J, Farré M, Griffin DK, Larkin DM. Reconstruction of avian ancestral  
33 karyotypes reveals differences in the evolutionary history of macro- and  
34 microchromosomes. *Genome Biol.* 2018; 19: 155.
- 35 De La Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med.* 2003; 349(3): 209-210.
- 36 De Lange T. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*  
37 2004; 5:323–329.
- 38 De Lange T. A loopy view of telomere evolution. *Frontiers in Genetics.* 2015; 6: e321.
- 39 de Oliveira R, Souza I, Venere P. Karyotype description of three species of Loricariidae  
40 (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus*  
41 *spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology.* 2006; 4(1): 93-97.
- 42 de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J. Karyotype characterization and ZZ/ZW  
43 sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner,

- 1 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop Ichthyol.* 2007;  
2 5:301-306.
- 3 de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J. Occurrence of multiple sexual  
4 chromosomes (XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> and Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>) in catfishes of the genus  
5 *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica.* 2008; 134:  
6 243–249.
- 7 de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J. Mechanisms of chromosomal evolution  
8 and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes  
9 (Siluriformes: Loricariidae). *J Fish Biol.* 2009; 75: 2209–2225.
- 10 de Oliveira RR, Feldberg E, Dos Anjos MB, Zuanon J. Karyotype  
11 characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the  
12 catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon  
13 basin. *Neotropical Ichthyology.* 2018; 5(3): 301-306.
- 14 De Pinna MCC. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes  
15 (Teleostei:Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. p. 279-  
16 330. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (Eds.).  
17 *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.* Porto Alegre, EDIPUCRS. 1998;  
18 p.603.
- 19 Deon GA, Glugoski L, Vicari MR, Nogaroto V, Sassi FMC, Cioffi MB, Liehr T, Bertollo  
20 LAC, Moreira-Filho O. Highly Rearranged Karyotypes and Multiple Sex  
21 Chromosome Systems in Armored Catfishes from the Genus *Harttia* (Teleostei,  
22 Siluriformes). *Genes.* 2020; 11: 1366.
- 23 Deon GA, Glugoski L, Sassi FMC, Hatanaka T, Nogaroto V, Bertollo LAC, Liehr T, Al-  
24 Rikabi A, Moreira-Filho O, Cioffi MB, Vicari MR. Chromosomal Rearrangements  
25 and Origin of the Multiple XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> Sex Chromosome System in *Harttia* Species  
26 (Siluriformes: Loricariidae). *Front Genet.* 2022a; 13: 877522.
- 27 Deon GA, Glugoski L, Hatanaka T, Sassi FMC, Nogaroto V, Bertollo LAC, Liehr T, Al-  
28 Rikabi A, Moreira Filho O, Cioffi MB, Vicari MR. Evolutionary breakpoint regions  
29 and chromosomal remodeling in *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae) species  
30 diversification. *Genet Mol Biol.* 2022b; 45(2):e20210170.
- 31 Dimitri P, Junakovic N. Revising the selfish DNA hypothesis: New evidence on  
32 accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet.* 1999;  
33 15(4): 123-124.
- 34 Douet J, Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is  
35 epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity.*  
36 2007; 99: 5–13.
- 37 Ducrot C, Lefebvre O, Landrieux E, Guirouilh-Barbat J, Sentenac A, Acker J.  
38 Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all  
39 recombinant factors. *The Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281: 11685–11692.
- 40 Dulz TA, Azambuja M, Nascimento VD, Lorscheider CA, Noletto RB, Moreira-Filho O,  
41 Nogaroto V, Diniz D, Affonso PRADeM, Vicari MR. Karyotypic Diversification in  
42 Two *Megaleporinus* Species (Characiformes, Anostomidae) Inferred from *In situ*  
43 Localization of Repetitive DNA Sequences. *Zebrafish.* 2020; 17(5): 333-341.

- 1 Eichler EE, Sankoff D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution.  
2 Science. 2003; 301: 793–797.
- 3 Eigenmann CH, Eigenmann RS. Preliminary notes on South American Nematognathi.  
4 Proceedings of the California Academy of Sciences, San Francisco. 1888; 1: 1-508.
- 5 Eirín-López JM, Ruiz MF, González-Tizón AM, Martínez A, Sánchez L, Méndez J.  
6 Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene  
7 family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an  
8 H1 subtype with “orphan” features. Journal of Molecular Evolution. 2004; 58:131-  
9 144.
- 10 Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences.  
11 Nat Genet. 2000; 24(4): 400–402.
- 12 Ellegren H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. Nat Ver Genet.  
13 2004; 5: 435–445.
- 14 Errero-Porto F, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC. Possible origins of B  
15 chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the  
16 Parana River basin. Genetics and Molecular Research. 2010; 9(3): 1654–1659.
- 17 Errero-Porto F, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC. Chromosome polymorphism in  
18 *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin.  
19 Ichthyological Research. 2011; 58: 225–231.
- 20 Errero-Porto F, Vieira MM, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, Portela-Castro  
21 AL, Martins-Santos IC. Chromosomal Polymorphism in *Rineloricaria Lanceolata*  
22 Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do  
23 Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population.  
24 Zebrafish. 2014; 11(4): 318-324.
- 25 Fan H, Wu Q, Wei F, Yang F, Ng BL, Hu Y. Chromosome-level genome assembly for  
26 giant panda provides novel insights into Carnivora chromosome evolution. Genome  
27 Biol. 2019; 20, 267.
- 28 Faria R, Navarro A. Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of  
29 evidence. Trends Ecol Evol. 2010; 25(11):660-69.
- 30 Farré M, Bosch M, López-Giráldez F, Ponsà M, Ruiz-Herrera A. Assessing the role of  
31 tandem repeats in shaping the genomic architecture of great apes. PLoS One. 2011;  
32 6(11): e27239.
- 33 Favarato RM, Silva M, Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E, Matoso DA. Cytogenetic  
34 diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in  
35 the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). Zebrafish. 2016; 13:103-111.
- 36 Ferraris, C.J. Catfishes and knifefishes. In: Encyclopedia of fishes (Paxton, J.R.,  
37 Eschmeyer, W.N., eds.). 2a. ed., Academic Press, San Diego. 1998;106-112.
- 38 Ferraris Jr CJ. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and  
39 catalogue of Siluriform primary types. Zootaxa. 2007; 1418: 1-628.
- 40 Feschotte C, Pritham EJ. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes.  
41 Annual Review of Genetic. 2007; 41: 331–368.
- 42 Finnegan DJ. Transposable elements in eukaryotes. International Review of Cytology.  
43 1985; 93: 281-326.

- 1 Finnegan DJ. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genetics*.  
2 1989; 5: 103–107.
- 3 Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD. Species by subfamily/ subfamily [Internet]. San  
4 Francisco: California Academy of Science. 2020. Available from:  
5 [http://researcharchive.  
6 SpeciesByFamily.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp)
- 7 Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD. Genera/Species by Family/Subfamily in Eschmeyer's  
8 Catalog of Fishes.  
9 [http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFami  
10 ly.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp). Acessado em: 2 de março de 2022
- 11 Froese R, Pauly D. Editors. 2022. FishBase. World Wide Web electronic publication.  
12 [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (02/2022).
- 13 Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D. Telomeric DNA damage is  
14 irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell  
15 Biology*. 2012; 14: 355–365.
- 16 Galati A, Micheli E, Cacchione S. Chromatin Structure in Telomere Dynamics. *Frontiers  
17 in oncology*. 2013; 3:46.
- 18 Gao B, Shen D, Xue S, Chen C, Cui H, Song C. The contribution of transposable elements  
19 to size variations between four teleost genomes. *Mobile DNA*. 2016; 7: 4.
- 20 Garcia C, Moreira-Filho O. Cytogenetical analyses in three fish  
21 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco:  
22 considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology*.  
23 2005; 3(2): 285-290.
- 24 García-Souto D, Troncoso T, Pérez M. Molecular Cytogenetic Analysis of the European  
25 Hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA Gene  
26 Clusters Map to the Same Location. *PLoS ONE*. 2015; 10(12).
- 27 Geerinckx T, Herrel A, Adriaens D. Suckermouth armored catfish resolve the 1073  
28 paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of  
29 1074 *Pterygoplichthys disjunctivus*. *Journal of Experimental Biology*. 2011;  
30 315:121–131.
- 31 Giuliano-Caetano, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de  
32 *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese (Doutorado em Ciências) –  
33 Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São  
34 Carlos. 1998.
- 35 Glugoski L, Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V. Co-located  
36 *hAT* transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest  
37 the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene*. 2018; 650: 49–54.
- 38 Glugoski L, Deon G, Schott S, Vicari MR, Nogaroto V, Moreira-Filho O. Comparative  
39 cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae). *Neotrop  
40 Ichthyol*. 2020; 18(2): e200013.
- 41 Goddard C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian  
42 chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 1975; 53:37-50.

- 1 Goodier JL, Davidson WS. Characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic  
2 salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. *Journal of Molecular*  
3 *Evolution*. 1998; 46: 245-255.
- 4 Gordon A, Hannon GJ. Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools. 2010.
- 5 Gouveia JG, Wolf IR, Moraes-Manécolo VPO, Bardella VB, Ferracin LM, Giuliano-  
6 Caetano L, Rosa R, Dias AL. Isolation and characterization of 5S rDNA sequences  
7 in catfishes genome (Heptapteridae and Pseudopimelodidae): perspectives for rDNA  
8 studies in fish by C0t method. *Cytotechnology*. 2016; 68: 2711-2720.
- 9 Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis  
10 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41:95–98.
- 11 Hatanaka T, Henrique-Silva F, Galetti Jr PM. A polymorphic, telomeric-like sequence  
12 microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetic and Genome*  
13 *Research*. 2002; 98: 308-310.
- 14 Hatanaka T, Galetti Junior PM. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the  
15 fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae).  
16 *Genetica*. 2004; 122:239-244.
- 17 Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a  
18 protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36:1014–1015.
- 19 Huang J, Ma L, Yang F, Shui-Zhang F, Li L. 45S rDNA regions are chromosome fragile  
20 sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic  
21 cells in *Lolium* spp. *PLoS One*. 2008; 3(5): e2167.
- 22 Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST. Improved telomere detection using a telomere  
23 repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19:17.
- 24 John, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. *Heterochromatin: Molecular*  
25 *and Structural Aspects*. Cambridge, Cambridge University Press. 1988.
- 26 Kantek DLZ, Vicari MR, Peres WAM, Cestari MM, Artoni RF, Bertollo LAC, Moreira-  
27 Filho O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species  
28 of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). *J Fish Biol*. 2009; 75:  
29 408–421.
- 30 Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Heterochromatin characterization  
31 of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*. 2004;  
32 141:237-242.
- 33 Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Karyotypic diversity and evolution  
34 of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*. 2005; 94: 180-186.
- 35 Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement  
36 during primate evolution. *Chromosome Research*. 2008; 16: 41-56.
- 37 Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES.  
38 Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory  
39 elements. *Nature*. 2003; 423(6937): 241-254.
- 40 Kidwell MG, Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and  
41 plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 7704–7711.
- 42 Kidwell MG, Lisch DR. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome  
43 evolution. *Evolution*. 2001; 55(1): 1-24.

- 1 Kidwell MG. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes.  
2 *Genetica*. 2002; 115: 49-63.
- 3 Kilburn AE, Shea MJ, Sargent RG, Wilson JH. Insertion of a telomere repeat sequence  
4 into a mammalian gene causes chromosome instability. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 126-  
5 135.
- 6 Konerat JT, Bueno V, Margarido VP, Portela-Castro, ALB, Martins-Santos IC. Diversity  
7 of Sex Chromosome Systems in *Ancistrini* (Loricariidae, Hypostominae): ZZ/ZW in  
8 *Ancistrus taunayi* Miranda Ribeiro, 1918. *Cytogenet Genome Res*. 2015; 146: 306-  
9 310.
- 10 Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. Microsatellite accumulation in the Y  
11 chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*. 2008; 51: 350-356.
- 12 Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Emanuel BS. Palindrome-mediated  
13 chromosomal translocations in humans. *DNA Repair*. 2006; 5: 1136-1145.
- 14 Lazzarini-Denchi E, Sfeir A. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the  
15 DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17(6): 364-78.
- 16 Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on  
17 chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52:201-220.
- 18 Li YC, Kord AB, Fahima T, Berles A, Nero E. Microsatellites: genomic distribution,  
19 putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 2002;  
20 11: 2453-2465.
- 21 Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a  
22 dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*. 1989; 44:  
23 397-401.
- 24 Liu Z, LI P, Kocabas A, Karsi A, Ju Z. Microsatellite containing genes from the channel  
25 catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of  
26 nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research  
27 Communication*. 2001; 289: 317-324.
- 28 Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA. Mapping simple repeated DNA sequences in  
29 heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1993; 134(4): 1149-1174.
- 30 Long EO, Dawid ID. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 1980; 49: 727-  
31 764.
- 32 Longo MS, Carone DM, Green ED, O'Neill MJ, O'Neill RJ. Distinct retroelement classes  
33 define evolutionary breakpoints demarcating sites of evolutionary novelty. *BMC  
34 Genomics*. 2009; 10(1): 334.
- 35 Lorscheider CA, Oliveira JIN, Dulz TA, Nogaroto V, Martins-Santos IC, Vicari MR.  
36 Comparative Cytogenetics Among Three Sympatric *Hypostomus* Species  
37 (Siluriformes: Loricariidae): An Evolutionary Analysis in a High Endemic Region.  
38 *Braz Arch Biol Technol*. 2018; 61: e18180417.
- 39 Lujan NK, Roach KA, Jacobsen D, Winemiller KO, Vargas VM, Ching VR, Maestre JA.  
40 Aquatic community structure across an Andes-to-Amazon fluvial gradient. *J  
41 Biogeogr*. 2013; 40:1715-1728.



- 1 Lujan NK, Armbruster JW, Lovejoy NR, López-Fernández H. Multilocus molecular  
2 phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a  
3 focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenetics Evol.* 2015; 82: 269-288.
- 4 Lundberg JG, Friel JP. *Siluriformes. Catfishes.* 2003; 20. January 2003 (under  
5 construction). 2003
- 6 Machado CRD, Domit C, Pucci MB, Gazolla CB, Glugoski L, Nogaroto V, Vicari MR.  
7 Heterochromatin and microsatellites detection in karyotypes of four sea turtle  
8 species: Interspecific chromosomal differences. *Genet Mol Biol.* 2020; 43(4):  
9 e20200213.
- 10 Maia T, Giuliano-Caetano L, Rodriguez M, Rubert M, Takagui F, Dias A. Chromosomal  
11 banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae,  
12 Loricariinae). *Ichthyological Research.* 2010; 57(2): 209-213.
- 13 Malimpensa GDeC, Traldi JB, Martinez JDeF, Deon G, Azambuja M, Nogaroto V, Vicari  
14 MR, Moreira-Filho O. Chromosomal Diversification in Two Species of *Pimelodus*  
15 (Siluriformes: Pimelodidae): Comparative Cytogenetic Mapping of Multigene  
16 Families. *Zebrafish.* 2020; 17(4): 278-286.
- 17 Manchado M, Zuasti E, Cross I, Merlo A, Infante C, Rebordinos L. Molecular  
18 characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea*  
19 *senegalensis*: A new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes.  
20 *Genome.* 2006; 49: 79-86.
- 21 Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS. Occurrence of sexual chromosome, of the type  
22 ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae: Ancistrinae) of the Paraguay River  
23 Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia.* 2004; 57: 327-331.
- 24 Mariotto S, Miyazawa CS. *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes: Ancistrinae), a complex of  
25 species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sex  
26 chromosomes of the type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil.  
27 *Caryologia.* 2006; 59: 299-304.
- 28 Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Chromosome  
29 polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae:  
30 Ancistrini). *Neotrop Ichthyol.* 2009; 7: 595–600.
- 31 Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O. Chromosomal  
32 diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae,  
33 Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet.*  
34 2011; 5: 289–300.
- 35 Mariotto S, Centofante L, Moreira-Filho O. Diversity and chromosomal evolution in the  
36 genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins  
37 of Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2013; 11:125–131.
- 38 Martins C, Galetti Junior PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus*  
39 Fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 1999; 7(5):363-367.
- 40 Martins C, Wasko AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish  
41 genome. In: Williams CR, ed, *Focus on Genome Research.* Hauppauge,  
42 NY,USA:Nov a Science Publishers. 2004; 289-318.

- 1 Martins C. Chromosomes and repetitive DNA: a contribution to the knowledge of the fish  
2 genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPPOR, B. G.  
3 Fish cytogenetics. Enfield: Science Publisher. 2007; 421-453.
- 4 Mathieu O, Jasencakova Z, Vaillant I, Gendrel AV, Colot V, Schubert I, Tourmente S.  
5 Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during  
6 heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2003; 15: 2929–2939.
- 7 Matoso DA, Almeida-Val VMF, Silva M, Moraes-Neto A, Almeida MC, Vicari MR,  
8 Moreira-Filho O, Artoni RF. Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion*  
9 *melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodiade): a reappraisal the  
10 existence of sex chromosome system in the species. Reviews on Fish Biology and  
11 Fisheries. 2011; 21: 497-508.
- 12 Matsubara K, O'Meally D, Azad B, Georges A, Sarre SD, Graves JAM, Matsuda Y, Ezaz  
13 T. Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary  
14 differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in  
15 Sauropsida. Chromosoma. 2016; 125: 111–123.
- 16 Maxon R, Cohn R, Kedes L. Expression and organization of histone genes. Annu Rev  
17 Genet. 1983; 17: 239–277.
- 18 Mees GF. The Auchenipteridae and Pimelodidae os Suriname (Pisces, Nematognathi).  
19 Zool Verhandl Leinden. 1974; 132: 1-256.
- 20 Meglécz E, Nève G, Biffin E, Gardner MG. Breakdown of Phylogenetic Signal: A Survey  
21 of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model  
22 Eukaryote Species. PLoS ONE. 2012; 7: 1-15.
- 23 Mendes-Neto EO, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O. Description of karyotype in  
24 *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei: Loricariidae) from the Piumhi river in  
25 Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. Comparative  
26 Cytogenetics. 2011; 5(2): 133–142.
- 27 Messier W, Li S, Stewart C. The birth of microsatellites. Nature. 1996; 381: 483–483.
- 28 Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, Taylor AM. Accelerated  
29 telomere shortening in ataxia telangiectasia. Nat Genet. 1996; 13(3): 350-353.
- 30 Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill  
31 DH, Yates TL, Moyzis RK. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub>  
32 telomeric sequence in vertebrate chromosomes. Chromosoma. 1990; 99: 3–10.
- 33 Michele JL, Takahashi CS, Ferrari I. Karyotypic study of some species of the family  
34 Loricariidae (Pisces). Cytologia. 1977; 42: 539-546.
- 35 Milhomem SSR, Castro RR, Nagamachi CY, Souza ACP, Feldberg E, Pieczarka JC.  
36 Different cytotypes in fish of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803. (Siluriformes:  
37 Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). Comparative Cytogenetics.  
38 2010; 4(1): 45-54.
- 39 Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A, Bourque G, Tesler G, Auvil L, Beaver  
40 JE, Chowdhary BP, Galibert F, Gatzke L, Hitte C, Meyers SN, Milan D, Ostrander  
41 EA, Pape G, Parker HG, Raudsepp T, Rogatcheva MB, Schook LB, Skow LC, Welge  
42 M, Womack JE, O'brien SJ, Pevzner PA, Lewin HA. Dynamics of mammalian

1 chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science*. 2005;  
2 309: 613-617.

3 Nascimento VD, Coelho KA, Nogaroto V, Almeida RB, Ziemniczak K, Centofante L,  
4 Pavanelli CS, Torres RA, Moreira-Filho O, Vicari MR. Do multiple karyomorphs  
5 and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate  
6 chromosomal speciation? *Zool Anz*. 2018; 272: 93-103.

7 Navarro A, Barton NH. Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new  
8 twist on chromosomal speciation. *Evolution*. 2003; 57(3): 447-459.

9 Nei M, Rooney AP. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu*  
10 *Rev Genet*. 2005; 39(1): 121–152.

11 Novak P, Neumann P, Macas J. Graph-based clustering and characterization of repetitive  
12 sequences in 592 next-generation sequencing data. *BMC Bioinform*. 2010; 11: 378.

13 Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web  
14 server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-  
15 generation sequence reads. *Bioinformatics*. 2013; 29(6): 792–793.

16 O’Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome  
17 instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11:171–181.

18 Oliveira NL, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, Moura RC.  
19 Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper  
20 *rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal  
21 dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement  
22 and B chromosome. *Molecular Cytogenetics*. 2011; 4:24.

23 Oliveira SG, Bao W, Martins C, Jurka J. Horizontal transfers of Mariner transposons  
24 between mammals and insects. *Mobile DNA*. 2012; 3:14.

25 Oliveira MLM, Utsunomia R, Alves JCP, Scacchetti PC, Primo CC, Vicari MR, Artoni  
26 RF, Centofante L, Moreira Filho O, Oliveira C, Foresti F. Microstructural  
27 chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes:  
28 *Trichomycteridae*). *Neotrop Ichthyol*. 2016; 14(2): e150084.

29 Paço A, Chaves R, Vieira-da-Silva A, Adegas F. The involvement of repetitive sequences  
30 in the remodelling of karyotypes: The *Phodopus* genomes (Rodentia, Cricetidae).  
31 *Micron*. 2013; 46: 27-34.

32 Pardue ML, Lowenhaupt K, Rich A, Nordheim A. (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> sequences have  
33 evolutionarily conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for  
34 roles in chromosome structure and function. *EMBO J*. 1987; 6: 1781-1789.

35 Parks MM, Lawrence CE, Raphael BJ. Detecting non-allelic homologous recombination  
36 from high-throughput sequencing data. *Genome Biol*. 2015; 16:1-19.

37 Pendás AM, Mórán P, Freije JP, García-Vázquez E. Chromosomal location and nucleotide  
38 sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and*  
39 *Cell Genetics*. 1994; 67: 31-36.

40 Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E. Ribosomal genes are interspersed throughout a  
41 heterochromatic arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet*. 1993; 63(2): 128-  
42 130.

- 1 Perez J, Moran P, Garcia-Vasquez E. Physical mapping of three minisatellite sequences  
2 in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. *Animal Genetics*. 1999; 30: 371-374.
- 3 Perry J, Slater HR, Choo KA. Centric fission - simple and complex mechanisms.  
4 *Chromosome Res*. 2004; 12(6): 627-640.
- 5 Peterson RC, Doering JL, Brown DD. Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs  
6 and one minor oocyte-specific 5S DNA. *Cell*. 1980; 20: 131-141.
- 7 Pevzner P, Tesler G. Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from  
8 human and mouse genomes. *Genome Res*. 2003a; 13: 37-45.
- 9 Pevzner PA, Tesler G. Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint  
10 reuse in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci*. 2003b; 100: 7672-7677.
- 11 Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity,  
12 fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(9): 2934-2938.
- 13 Pisano S, Galati A, Cacchione S. Telomeric nucleosomes: Forgotten players at  
14 chromosome ends. *Cellular and molecular life sciences*. 2008; 65(22):3553-63.
- 15 Piscor D, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP. Conserved number of U2 snDNA sites in  
16 *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two *Bryconamericus* species  
17 (Characidae, Stevardiinae). *Neotropical Ichthyology*. 2018; 16(1).
- 18 Plasterk RHA, Izsvák Z, Ivics Z. Resident aliens: the *Tc1*/mariner superfamily of  
19 transposable elements. *Trends Genet*. 1999; 15(8): 326-332.
- 20 Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E. Microsatellite distribution on sex chromosomes  
21 at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard  
22 species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and lacertidae: *Eremias velox*).  
23 *BMC Genet*. 2011; 12: 90.
- 24 Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB.  
25 Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species  
26 (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W Chromosomes.  
27 *Cytogenet Genome Res*. 2013; 142: 40-45.
- 28 Pons J, Gillespie RG. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of  
29 the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide  
30 composition of the repeats. *Gene*. 2003; 313: 169-177.
- 31 Primo CC, Glugoski L, Almeida MC, Zawadzki HC, Moreira-Filho O, Vicari MR,  
32 Nogaroto V. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria*  
33 (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish*. 2017; 14:161-168.
- 34 Primo CC, Glugoski L, Vicari MR, Nogaroto V. Chromosome Mapping and Molecular  
35 Characterization of the *Tc1/Mariner* Element in *Rineloricaria* (Siluriformes:  
36 Loricariidae). *Braz Arch Biol Technol*. 2018; 61: e18170623.
- 37 Prizon AC, Borin-Carvalho LA, Bruschi DP, Ribeiro MO, Barbosa LM, Ferreira GEB,  
38 Cius A, Zawadzki CH, Portela-Castro ALB. Cytogenetic data on *Ancistrus* sp.  
39 (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on  
40 intrageneric karyotype diversification. *Comp Cytogenet*. 2016; 10(4):625-636.
- 41 Prizon AC, Bruschi DP, Borin-Carvalho LA, Cius A, Barbosa LM, Ruiz HB, Zawadzki  
42 CH, Fenocchio AS, Portela-Castro ALdB. Hidden Diversity in the Populations of the

- 1 Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná  
2 River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Front Genet.* 2017; 8:185.
- 3 Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Pansonato-Alves JC,  
4 Scacchetti PC, Foresti F, Moreira-Filho O, Vicari MR. Chromosomal spreading of  
5 microsatellites and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi*  
6 genomes (Characiformes: Crenuchidae). *Cytogenet Genome Res.* 2016; 149(3): 182-  
7 190.
- 8 Pucci MB, Nogaroto V, Moreira-Filho O, Vicari MR. Dispersion of transposable elements  
9 and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes:  
10 Crenuchidae) genomes. *Genetics and Molecular Biology.* 2018; 41: 585–592.
- 11 Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR. Microsatellites and kinship. *Trends Ecol Evol.*  
12 1993; 8(8): 285-8.
- 13 Rebordinos L, Cross I, Merlo A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state  
14 of the art. *Cytogenet Genome Res.* 2013; 141:1–11.
- 15 Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JH. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily  
16 (Teleostei: Siluriformes), with revisions of *Delterus* and *Hemipsilichthys*. *Zool J Linn*  
17 *Soc.* 2006; 143: 277–299.
- 18 Reis DAR, Brandão KO, Toledo LFA, Pazza R, Kavalco KF. Localização física dos genes  
19 ribossomais 5S e 18S em *Ancistrus* sp. (Loricariidae: Ancistrini) de Angra dos  
20 Reis/RJ, Bacia dos Rios Costeiros. *Evol Conserv Biodivers.* 2012; 3: 39–44.
- 21 Ribeiro MO, Noleto RB, Lorscheider CA, Porto FE, Prizon AC, Zawadzki CH, Oliveira  
22 LC, Portela Castro ALB. Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes:  
23 Loricariidae) from Iguazu River basin, southern Brazil. *Genet Mol Res.* 2015; 14:  
24 4051–4057.
- 25 Richards EJ, Goodman HM, Ausubel FM (1991) The centromere region of *Arabidopsis*  
26 *thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Res.*  
27 1991;19: 3351–3357.
- 28 Rodrigues RM. Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariidae com ênfase em  
29 espécies *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva.  
30 Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Biologia-Genética do Instituto de  
31 Biociências da Universidade de São Paulo. 2010; 218 pp.
- 32 Rogers SO, Bendich AJ. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and  
33 in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology.* 1987; 9: 509-520.
- 34 Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF,  
35 Vicari MR. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima*  
36 (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence  
37 vestiges. *Rev Fish Biol Fish.* 2012; 22: 739-749.
- 38 Ruiz-Herrera A, Castresana J, Robinson TJ. Is mammalian chromosomal evolution driven  
39 by regions of genome fragility? *Gen Biol.* 2006; 7: R115.
- 40 Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E. Telomeric repeats far from  
41 the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome*  
42 *Research.* 2008; 122: 219–228.

- 1 Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado Á, Montiel EE, Camacho JPM, López-León MD. Next  
2 generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite  
3 distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*. 2015; 124: 221–234.
- 4 Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. High-throughput analysis of  
5 the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci Rep*. 2016; 6: 28333.
- 6 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: Cold  
7 Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 8 Sassi FMC, Deon GA, Moreira-Filho O, Vicari MR, Bertollo LAC, Liehr T, de Oliveira  
9 EA, Cioffi MB. Multiple sex chromosome and evolutionary relationships in  
10 Amazonian Catfishes: the outstanding model of the genus *Harttia* (Siluriformes:  
11 Loricariidae). *Genes*. 2020; 11(10): 1179.
- 12 Sassi FMC, Moreira-Filho O, Deon GA, Sember A, Bertollo LAC, Liehr T, Oliveira VCS,  
13 Viana PF, Feldberg E, Vicari MR, Cioffi MB. Adding New Pieces to the Puzzle of  
14 Karyotype Evolution in *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae): Investigation of  
15 Amazonian Species. *Biology*. 2021; 10(9): 922.
- 16 Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Costa-Silva JG, Oliveira C, Foresti F.  
17 Extensive spreading of interstitial telomeric sites on the chromosomes of  
18 *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Genetica*. 2015a; 143: 263-270.
- 19 Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C,  
20 Foresti F. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei,  
21 Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes.  
22 *Cytogenet Genome Res*. 2015b; 146: 136–143.
- 23 Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, Artoni RF,  
24 Moreira-Filho O, Vicari MR. Differentiation of repetitive DNA sites and sex  
25 chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii:  
26 Characiformes). *Genetica* ('s-Gravenhage). 2011; 139: 1499-1508.
- 27 Schemberger MO, Oliveira JIN, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Cestari MM,  
28 Moreira-Filho O, Vicari MR. Construction and Characterization of a Repetitive DNA  
29 Library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A Genomic and  
30 Evolutionary Approach to the Degeneration of the W Sex Chromosome. *Zebrafish*.  
31 2014; 11(6): 518-527.
- 32 Schemberger MO, Nascimento VD, Coan R, Ramos E, Nogaroto V, Ziemniczak K,  
33 Valente GT, Moreira-Filho O, Martins C, Vicari MR. DNA transposon invasion and  
34 microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical  
35 fish genome. *Chromosoma*. 2019; 128: 547-560.
- 36 Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Artoni RF, Vicari MR. Chromosomal evolution  
37 of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and  
38 structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fisheries*. 2012; 18(4): 1-16.
- 39 Shao F, Han M, Peng Z. Evolution and diversity of transposable elements in fish  
40 genomes. *Sci Rep*. 2019; 9: 15399.
- 41 Shimada T, Okihama Y, Murata C, Shukuya R. Occurrence of H1o-like protein and  
42 protein A24 in the chromatin of bullfrog erythrocytes lacking histone 5. *Journal of*  
43 *Biological Chemistry*. 1981; 256(20): 10577-10582.

- 1 Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates  
2 measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n)  
3 microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 974–980.
- 4 Silva DMZA, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. Chromosomal  
5 Mapping of Repetitive DNA Sequences in Five Species of *Astyanax* (Characiformes,  
6 Characidae) Reveals Independent Location of U1 and U2 snRNA Sites and  
7 Association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research.* 2015;  
8 146(2): 144-152.
- 9 Silvano RAM, Oyakawa OT, Do Aniaral BD, Begossi A. Peixes do alto rio Juruá  
10 (Amazônia, Brasil). São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Imprensa  
11 Oficial do Estado. 2001; 298p.
- 12 Simpson RT. Structure of chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs  
13 of DNA and all the histones. *Biochemistry.* 1978; 17: 5524-5531.
- 14 Slijepcevic P, Hande MP, Bouffler SD, Lansdorp P, Bryant PE. Telomere length,  
15 chromatin structure and chromosome fusogenic potential. *Chromosoma.* 1997; 106:  
16 413-421.
- 17 Slijepcevic P, Bryant PE. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of  
18 radiation-induced chromosome breakage, *Int J Radiat Biol.* 1998; 73: 1–13.
- 19 Slijepcevic P. Mechanisms of the Evolutionary Chromosome Plasticity: Integrating the  
20 'Centromere-from-Telomere' Hypothesis with Telomere Length Regulation.  
21 *Cytogenetic Genome Research.* 2016; 148: 268-278.
- 22 Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the  
23 genome. *Nature.* 2007; 8: 272-285.
- 24 Smit AFA, Hubley R, Green P. RepeatMasker Open-4.0. (2013-2015).  
25 <http://www.repeatmasker.org>.
- 26 Snustad P, Simmons MJ. Fundamentos de Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,  
27 6ª ed, 2013
- 28 Souza ACP. Descrição cariotípica de peixes dos gêneros *Baryancistrus*, *Parancistrus*,  
29 *Peckoltia* e *Ancistrus* (Ancistrinae, Loricariidae) da Bacia Amazônica. Dissertação  
30 de Mestrado. Zoologia, Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio  
31 Goeldi. 2003; 130pp.
- 32 Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell*  
33 *Res.* 1972; 75: 304-306.
- 34 Sumner AT. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing, New York,  
35 USA. 304 pp, 2003.
- 36 Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pinthong K, et al.  
37 Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome  
38 of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Molecular*  
39 *Cytogenetics.* 2013; 6(51).
- 40 Szamalek JM, Goidts V, Chuzhanova N, Hameister H, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H.  
41 Molecular characterization of the pericentric inversion that distinguishes human  
42 chromosome 5 from the homologous chimpanzee chromosome. *Hum Genet.* 2005;  
43 117: 168–176.

- 1 Szostak J, Wu R. Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces*  
2 *cerevisiae*. *Nature*. 1980; 284: 426–430.
- 3 Takagui FH, Venturelli NB, Dias AL, Swarça AC, Vicari MR, Fenocchio AS, Giuliano-  
4 Caetano L. The Importance of Pericentric Inversions in the Karyotypic  
5 Diversification of the Species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys*  
6 *platymetopon*. *Zebrafish*. 2014; 11: 300-305.
- 7 Takagui FH, Baumgärtner L, Venturelli NB, Paiz LM, Viana P, Dionisio JF, Pompeo  
8 LRS, Margarido VP, Fenocchio AS, da Rosa R, Giuliano-Caetano L. Unrevealing the  
9 karyotypic evolution and cytotaxonomy of armored catfishes (Loricariinae) with  
10 emphasis in *Sturisoma*, *Loricariichthys*, *Loricaria*, *Proloricaria*, *Pyxiloricaria*, and  
11 *Rineloricaria*. *Zebrafish*. 2020; 17(5): 319-332.
- 12 Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA  
13 markers. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17(16): 6463–6471.
- 14 Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, Passos KB, Feldberg E.  
15 Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes,  
16 Prochilodontidae): a fish model for sex chromosome differentiation. *Sex Dev*. 2013;  
17 7: 325-333.
- 18 Teugels GG. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes  
19 (Ostariophysi, Siluroidei): an over-view. *Aquatic Living Resources*. 1996; 9: 9-34.
- 20 Tong P, Pidoux AL, Toda NR, Ard R, Berger H, Shukla M, Allshire RC. Interspecies  
21 conservation of organisation and function between nonhomologous regional  
22 centromeres. *Nature communications*. 2019; 10(1): 1-13.
- 23 Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, Artoni RF, Moreira-Filho O. First  
24 karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of  
25 heterochromatic polymorphism. *Comp Cytogen*. 2012; 6(2): 115–125.
- 26 Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, Artoni RF, Moreira-  
27 Filho O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with  
28 emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res*. 2013; 12:  
29 463-471.
- 30 Traldi JB, Vicari MR, Martinez JdF, Blanco DR, Lui RL, Moreira-Filho O. Chromosome  
31 Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisii* (Characiformes,  
32 Parodontidae): An Extensive Chromosomal Polymorphism of 45S and 5S Ribosomal  
33 DNAs. *Zebrafish*. 2016; 13(1): 19–25.
- 34 Úbeda-Manzanaro M, Merlo M, Palazón J, Cross IS, Rebordinos L. Chromosomal  
35 mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by  
36 double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*. 2010; 138:  
37 787-794.
- 38 Ummat A, Bashir A. Resolving complex tandem repeats with long reads, *Bioinformatics*.  
39 2014; 683 30:(24), 3491-349815.
- 40 Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Scachetti PC, Oliveira C,  
41 Foresti F. Scattered organization of the histone multigene family and transposable  
42 elements in *Synbranchus*. *Genetics and Molecular Biology*. 2014; 37: 30-36.



- 1 Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. Comparative  
2 chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* Species  
3 (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex  
4 chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and Genome Research*. 2014; 142:  
5 286–292.
- 6 Valadkhan S. snRNAs as the catalysis of pre-mRNA splicing. *Current Opinion in*  
7 *Chemical Biology*. 2005; 9: 603-608.
- 8 Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, Ruas CF, Sbalqueiro IJ, Giuliano-  
9 Caetano L. Differential distribution of (GA)<sub>9</sub>+C microsatellite on chromosomes of  
10 some animal and plant species. *Cytologia*. 2002; 67: 9-13.
- 11 Venturelli NB, Takagui FH, Pompeo LRS, Rodriguez MS, da Rosa R, Giuliano-Caetano  
12 L. Cytogenetic markers to understand chromosome diversification and conflicting  
13 taxonomic issues in *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from Rio Grande do  
14 Sul coastal drainages. *Biologia*. 2021; 76: 2561–72.
- 15 Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC. Heterochromatin polymorphism associated with  
16 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations.  
17 *Cytogenet Genome Res*. 2003; 101: 24-28.
- 18 Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF. Cytogenetic  
19 analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish  
20 *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genet Mol Biol*. 2006; 29:  
21 621–625.
- 22 Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Colocalization of repetitive DNAs  
23 and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*.  
24 *Cytogenet Genome Res*. 2008; 122: 67-72.
- 25 Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari, MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-  
26 Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical  
27 fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol*. 2010; 76: 1094–1116.
- 28 Villasante A, Abad JP, Mendez-Logo M: Centromeres were derived from telomeres  
29 during the evolution of the eukaryotic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;  
30 104:10542–10547.
- 31 Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed  
32 using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989; 44(3): 388–396.
- 33 Wells RD. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci*.  
34 2007; 32: 271-278.
- 35 Wicker T, Sabot F, Hua-Van A. A unified classification system for eukaryotic  
36 transposable elements. *Nature Reviews Genetics*. 2007; 8: 973–982.
- 37 Wilder J, Hollocher H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans.  
38 *Mol Biol Evol*. 2001; 18: 384–392.
- 39 Wolffe AP. The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in  
40 5S RNA gene regulation. *Journal of Cell Science*. 1994; 107: 2055–2063.
- 41 Yang G, Zheng RY, Jin ZS. Correlations between microsatellite instability and the  
42 biological behaviour of tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019; 145(12): 2891-  
43 2899.

- 1 Yano CF, Bertollo LAC, Rebordinos L, Merlo MA, Liehr T,  
2 Portela-Bens S, Cioffi MB. Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 small nuclear  
3 DNAs in *Triportheus* (characiformes, triporthidae): high variability and particular  
4 syntenic organization. *Zebrafish*. 2017; 14: 146-154.
- 5 Yano CF, Merlo MA, Portela-Bens S, Cioffi MB, Bertollo LAC, Santos-Junior CD,  
6 Rebordinos L. Evolutionary Dynamics of Multigene Families in *Triportheus*  
7 (Characiformes, Triporthidae): A Transposon Mediated Mechanism? *Frontiers in*  
8 *Marine Science*. 2020; 7: 1-12.
- 9 Zawadzki CH, Tencatt LFC, Froehlich O. A new unicuspid-toothed species of  
10 *Hypostomus Lacépède*, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin.  
11 *Neotropical Ichthyology*. 2014; 12(1): 97-104.
- 12 Zane L, Bargelloni L, Partanello T. Strategies for microsatellite isolation: a review.  
13 *Molecular Ecology*. 2002; 11(1): 1-16.
- 14 Zerbino D, Birney E. Velvet: Algorithms for De Novo Short Read Assembly Using De  
15 Bruijn Graphs. *Genome research*. 2008; 18: 821-829.
- 16 Zhu Y, Strassmann JE, Queller DC. Insertions, substitutions, and the origin of  
17 microsatellites. *Genet Res*. 2000; 76: 227–236.
- 18 Ziemniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-  
19 Filho O, Artoni RF, Vicari MR. Comparative cytogenetics of Loricariidae  
20 (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and  
21 Hypoptopomatinae. *Ital J Zool*. 2012; 79:492-501.
- 22 Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari  
23 MR. *In situ* localization of (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> repeated DNAs and W sex  
24 chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes).  
25 *Cytogenet Genome Res*. 2014; 144: 325-332.
- 26

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como já descrito em trabalhos anteriores por nosso grupo de pesquisa, é notório o envolvimento de diferentes classes de DNAs repetitivos em eventos de rearranjos cromossômicos, os quais contribuíram na evolução cariotípica presente em espécimes de Loricariidae. Em *Ancistrus* e *Rineloricaria* já foram caracterizadas sequências de DNA r5S, pseudogenes, sequências teloméricas e TEs em pontos de quebras cromossômicas e fusão Rb. Sabe-se que os EBRs são enriquecidos com sequências repetitivas proporcionando condições para recombinação homóloga não alélica, e assim, fornecendo matéria-prima para rearranjos cromossômicos.

Os dados citogenéticos apresentados para *Ancistrus* ampliam a diversidade já documentada para o gênero e auxiliam no entendimento do papel dos rearranjos cromossômicos na diversificação de Ancistrini. Sítios de pseudogenes de rDNA 5S já foram associados anteriormente a eventos de fusão Rb em *Ancistrus*. Nossas análises sugerem que a redução do  $2n$  em *A. aguaboensis*  $2n = 50$  (primeira descrição cariotípica realizada neste estudo) foi também desencadeada por quebras na dupla fita e rearranjos cromossômicos em sítios de rDNA 5S, resultante de fusão cêntrica sem a presença de vestígios de ITS. Estes dados corroboram a proposta do re-uso evolutivo de sequências de rDNAs na geração da diversificação cromossômica no grupo.

Sítios rDNA 45S enriquecidos com expansões microssatélites, principalmente o  $(GA)_n$  e  $(CA)_n$ , indicam o re-uso evolutivo desta região genômica em diversos eventos de quebras, fusões Rb e rearranjos cromossômicos estruturais em *R. latirostris* e *R. pentamaculata*. Os dados genômicos obtidos de *R. latirostris* indicaram que a fração repetitiva é predominantemente formada de transposons e sequências de microssatélites ricas A/T. Finalmente, polimorfismos cromossômicos numéricos ( $2n = 54, 55$  e  $56$  cromossomos, com manutenção do NF) foram analisados em espécies de *R. pentamaculata* do Rio Barra Grande, inferindo-se o papel do rDNA 5S e microssatélites (principalmente CA e GA) flanqueando pontos de fusão, culminando na formação de cromossomos metacêntricos com vestígios de ITS. Foi discutido ainda que resquícios de ITS podem ter sido originados por *end-to-end fusion*, resultante de cromossomos acrocêntricos com DT. Ou ainda, cromossomos acrocêntricos portadores de DSBs nos braços curtos podem ser reconhecidos pela telomerase que adiciona  $(TTAGGG)_n$  nas pontas livres, durante o mecanismo NHEJ alternativo. A participação do rDNA 5S está

1 presente em ambas as inferências quanto à origem da fusão Rb, como já foi proposto para  
2 outros grupos de Loricariidae.

3 Os dados apresentados neste trabalho forneceram ainda mais subsídios para o  
4 entendimento da composição dos sítios cromossômicos instáveis em membros de  
5 Loricariidae. O acúmulo de DNAs repetitivos em regiões de quebras cromossômicas  
6 contribui para a ocorrência de rearranjos cromossômicos em Loricariidae e tem papel  
7 fundamental na diversidade e evolução cariotípica do grupo.



# Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae)

Correspondence:  
Viviane Nogaroto  
vivianenogaroto@uepg.br

<sup>1</sup>Larissa Glugoski<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Geize Deon<sup>1</sup>, <sup>2</sup>Stephane Schott<sup>2</sup>,  
<sup>1</sup>Marcelo R. Vicari<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Viviane Nogaroto<sup>2</sup> and  
<sup>1</sup>Orlando Moreira-Filho<sup>1</sup>

Submitted March 13, 2020

Accepted May 11, 2020

by Guilherme Ortí

Epub Jun 26, 2020

*Ancistrus* is a specious genus of armored catfishes that has been extensively used for cytogenetic studies in the last 17 years. A comparison of the extensive karyotypic plasticity within this genus is presented with new cytogenetic analysis for *Ancistrus* cf. *multispinis* and *Ancistrus aguaboensis*. This study aims to improve our understanding of chromosomal evolution associated with changes in the diploid number (2n) and the dispersion of ribosomal DNAs (rDNAs) within *Ancistrus*. *Ancistrus* cf. *multispinis* and *A. aguaboensis* exhibit 2n of 52 and 50 chromosomes, respectively. Given that *A. cf. multispinis* shares a 2n = 52 also found in Pterygoplichthyini, the sister group for Ancistrini, a Robertsonian (Rb) fusion event is proposed for the 2n reduction in *A. aguaboensis*. 5S rDNAs pseudogenes sites have already been associated with Rb fusion in *Ancistrus* and our analysis suggests that the 2n reduction in *A. aguaboensis* was triggered by double strand breaks (DSBs) and chromosomal rearrangements at 5S rDNA sites. The presence of evolutionary breakpoint regions (EBRs) into rDNA cluster is proposed to explain part of the Rb fusion in *Ancistrus*. Cytogenetic data presented extends the diversity already documented in *Ancistrus* to further understand the role of chromosomal rearrangements in the diversification of Ancistrini.

**Keywords:** Armored catfish, FISH, 5S rDNA, 18S rDNA, telomeric sequence.

Online version ISSN 1982-0224

Print version ISSN 1679-6225

Neotrop. Ichthyol.  
vol. 18, no. 2, Maringá 2020

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, Km 235, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil. (LG) lariglugoski@hotmail.com; (GD) geizeadeon@gmail.com; (OMF) omfilho@ufscar.br.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil. (SS) stephane.qs@hotmail.com; (MRV) vicarimr@uepg.br; (VN) vivianenogaroto@uepg.br (corresponding author).

*Ancistrus* é um gênero rico em espécies de peixes conhecidos como cascudos e tem sido alvo de estudos citogenéticos nos últimos 17 anos. Uma comparação da plasticidade presente no gênero é apresentada com novas análises citogenéticas para *Ancistrus* cf. *multispinis* e *Ancistrus aguaboensis*. Este estudo visa melhorar nossa compreensão da evolução cromossômica associada as alterações do número diploide ( $2n$ ) e a dispersão de DNAs ribossômicos (rDNAs) em *Ancistrus*. *Ancistrus* cf. *multispinis* e *A. aguaboensis* apresentaram  $2n$  de 52 e 50 cromossomos, respectivamente. Visto que *A. cf. multispinis* compartilha  $2n = 52$  também encontrado em Pterygoplichthyini, o grupo irmão para Ancistrini, um evento de fusão Robertsoniana (Rb) é proposto para a redução do  $2n$  em *A. aguaboensis*. Sítios de pseudogenes de rDNA 5S já foram associados a eventos de fusão Rb em *Ancistrus* e nossas análises sugerem que a redução do  $2n$  em *A. aguaboensis* foi desencadeada por quebras na dupla fita e rearranjos cromossômicos em sítios de rDNA 5S. A presença de *evolutionary breakpoint regions* (EBRs) em clusters de rDNA foi proposta para explicar parte da fusão Rb em *Ancistrus*. Os dados citogenéticos apresentados ampliam a diversidade já documentada em *Ancistrus* visando melhor entender o papel dos rearranjos cromossômicos na diversificação de Ancistrini.

**Palavras-chave:** Cascudo, FISH, rDNA 5S, rDNA 18S, sequência telomérica.

## INTRODUCTION

Loricariidae is the largest family of the Siluriformes, which includes about 1.000 species distributed in the Neotropical region, and comprises fishes vulgarly called as armored catfishes (Fricke *et al.*, 2020). It consists of six subfamilies: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae and Rhinelepineae (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006). The former subfamily Ancistrinae was considered synonymous with Hypostominae by Armbruster (2004) and, currently, Hypostominae presents 483 valid species (Fricke *et al.*, 2020), grouped in the tribes: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthyini and Ancistrini (Armbruster, 2004; Lujan *et al.*, 2015). In a systematic review study, Ancistrini was proposed to possess ten genera considered valid (Lujan *et al.*, 2015). Previously, this tribe was distributed in a larger number of genera which ones were found to be paraphyletic, and is therefore restricted to a weakly supported clade (Lujan *et al.*, 2015). Currently, Ancistrini remains a clade rich in genera and with a high morphological diversity (Lujan *et al.*, 2015), which presents constant systematic reformulations and with a lot of undescribed species waiting for scientific validation.

Pterygoplichthyini was considered sister group for Ancistrini (Armbruster, 2004) and cytogenetic data demonstrated  $2n$  of 52 chromosomes in Pterygoplichthyini species (Alves *et al.*, 2006). Previous cytogenetic studies in Ancistrini also showed a large number of species with  $2n = 52$  chromosomes, predominantly of meta and submetacentric chromosomes (Artoni, Bertollo, 2001; de Oliveira *et al.*, 2006). Based on phylogenetic relationships of Hypostominae proposed by Lujan *et al.* (2015), and considering the

presence of  $2n = 52$  chromosomes in Pterygoplichthyini, the sister group for Ancistrini, Bueno *et al.* (2018) suggested that the putatively ancestral condition for Ancistrini is a diploid number of 52 chromosomes, from which chromosomal diversification occurred to explain the observed karyotypic plasticity among studied species.

*Ancistrus* is the specious genus of Ancistrini and is widely distributed in South America (Ferraris, 2007; Armbruster, 2008; Lujan *et al.*, 2013). In this tribe, only *Ancistrus* species presents a diversified condition from  $2n = 52$  chromosomes, with a higher frequency of acrocentric chromosomes (de Oliveira *et al.*, 2007, 2008, 2009; Mariotto *et al.*, 2009, 2011; Konerat *et al.*, 2015; Favarato *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017; Bueno *et al.*, 2018). Cytogenetic data in *Ancistrus* revealed a diversity of  $2n$  and karyotype formulas (details of available *Ancistrus* cytogenetic data can be found in Tab. 1), which range from  $2n = 34$  to 54 chromosomes (Mariotto *et al.*, 2011). In addition, different heteromorphic sex chromosome systems are found in the genus, such as: XX/X0, XX/XY, XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, ZZ/ZW and Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>. In *Ancistrus*, with the exception of species with  $2n = 52$  and 54 chromosomes, it was suggested a reduction in  $2n$  via Rb fusion events (de Oliveira *et al.*, 2007, 2008, 2009; Mariotto *et al.*, 2009, 2011; Konerat *et al.*, 2015; Favarato *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017) and structural chromosomal changes, such as inversions, translocations, deletions and duplications (Mariotto *et al.*, 2011).

In addition to *Ancistrus*, other members of Loricariidae present species with  $2n$  reduction via Rb fusions, when vestiges of interstitial telomeric sites (ITS) can be visualized in some karyotypes (Rosa *et al.*, 2012; Errero-Porto *et al.*, 2014; Favarato *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017; Primo *et al.*, 2017; Glugoski *et al.*, 2018). Some of these Rb events were associated with the presence of EBRs inside 5S and 45S rDNAs sites, which triggered breaks and chromosomal reorganizations (Rosa *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2017; Primo *et al.*, 2017; Glugoski *et al.*, 2018). However, the presence of other repetitive DNA sequences, able of explaining the occurrence of other EBRs in the Loricariidae genomes, still remain uncertain (Primo *et al.*, 2018).

Repetitive DNAs are organized as grouped blocks (microsatellites, mini-satellites, satellites and multigene families) or are dispersed (transposons and retrotransposons) on the chromosomes (Charlesworth, 1994). These repetitive sequences have been shown to be fundamental in studies related to genomic evolution (Maxon *et al.*, 1983; Charlesworth *et al.*, 1994; Vicari *et al.*, 2010). Multigene families of rRNAs are composed of repetitions organized in tandem (Long, Dawid, 1980). They constitute two gene families with different loci in the karyotypes: the major rDNA 45S comprises the genes that encode the 18S, 5.8S and 28S rRNAs; while the minor rDNA codifies the 5S rRNA (Long, Dawid, 1980). In situ localization of rDNA sites showed that the dispersion and distribution of these repetitive DNAs may have contributed to genomic diversification and chromosomal remodeling among armored catfish (Rosa *et al.*, 2012; Errero-Porto *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2017; Primo *et al.*, 2017; Glugoski *et al.*, 2018).

Cytogenetic studies contribute to taxonomy by demonstrating difference in karyotypes of cryptic species (Vicari *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2018) or by detecting synonym species (Bellafronte *et al.*, 2005). Given the morphological similarity present in some members of *Ancistrus* and the occurrence of a lot of scientific undescribed species in the scientific literature, the taxonomy of the group has been suffered numerous reformulations (de Oliveira *et al.*, 2009; Lujan *et al.*, 2015). In this study, the cytogenetic data of two species of *Ancistrus* were described and



**TABLE 1** | Review of available *Ancistrus* cytogenetic data. “Unknown” means that the data was not available in the original manuscript. NOR: Nucleolar Organizer Region; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric; a: acrocentric; FN: Fundamental number. \*one member of the homologous pairs with FISH markers.

Species	2n	FN	Karyotype formula	Sex chromosome system	rDNA 5S (pair)	rDNA 18S (pair)	Localization	Reference
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	68	20m+8sm+6st	Absent	Unknown	2	Arrombado bay-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	67	19m+8sm+6st+1a	Absent	Unknown	2	Arrombado bay-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	66	18m+8sm+6st+2a	Absent	Unknown	2 (NOR)	Arrombado bay-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	68	20m+8sm+6st	Absent	3, 6, 9	2	Arrombado bay-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> sp. Purus	34	68	♂21m+11sm+2st ♀20m+2sm+2st	XX/XY	3, 5, 12, 13	4	Purus river-AM	de Oliveira <i>et al.</i> (2009) Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus</i> sp. Catalão	34	68	22m+8sm+4st	XX/XY	3, 6, 7, 12	4	Lake Catalão-AM	Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus</i> sp. Trombetas	38	73	22m+8sm+5st+3a	Absent	Unknown	5 (NOR)	Trombetas river-PA	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> n.sp. 1	38	76	30m/sm+8st	Absent	Unknown	5 (NOR)	São Francisco river-AC	Alves <i>et al.</i> (2003)
<i>Ancistrus dubius</i> <i>Ancistrus</i> sp. “Balbina”	♀38 ♂39	76 78	26m+10sm+2st 27m+10sm+2st	XX/XY, Y <sub>2</sub>	4	12	Barretinho stream-AM	de Oliveira <i>et al.</i> (2008) Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus</i> sp. 13	40	80	26m+10sm+4st	Absent	5, 15	18	Salgadinho stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> sp. 13	40	80	30m+6sm+4st	Absent	Unknown	18 (NOR)	Salgadinho stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus</i> n.sp. 1	♂39 ♀40	78 80	33m+6sm 34m+6sm	XX/X0	Unknown	20 (NOR)	Vermelho river-GO	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	Absent	Unknown	16 (NOR)	Coxipó river-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2006)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	XX/XY	4, 14, 16	16	Pari stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	XX/XY	4, 14, 16	16	Flechas stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	84	24m+10sm+8st	XX/XY	4, 14, 16	16	Fundo stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> sp. Vermelho	42	78	26m+6sm+4st+6a	Absent	Unknown	20 (NOR)	Demeni river-AM	de Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> sp.	42	84	18m+16sm+8st	Absent	1, 10*	10	Criminoso stream-MS	Prizon <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	44	72	18m+10sm+16st/a	ZZ/ZW	Unknown	13 (NOR)	Serra das Araras stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2004)
<i>Ancistrus</i> sp. 08	44	80	18m+10sm+8st+8a	ZZ/ZW	1, 13	13	Currupira river-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus maximus</i> <i>Ancistrus</i> sp. Macoari	46 ♂81 ♀82	81 82	18m+11sm+6st+11a 18m+12sm+6st+10a	XX/XY	19	19	Branco river-RR	Oliveira <i>et al.</i> (2006) Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus abelhoai</i>	48	90	22m+14sm+6st+6a	Absent	13	13	Iguaçu river-PR	Ribeiro <i>et al.</i> (2015)
<i>Ancistrus ranunculus</i>	48	82	♂20m+8sm+6st+14a ♀19m+9sm+6st+14a	ZZ/ZW	16	16	Xingu river-PA	de Oliveira <i>et al.</i> (2007) Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus aguaboensis</i>	50	80	16m+10sm+4st+20a	Absent	2, 21, 25	25	Ribeirão Bandeirinha river-GO	Present study
<i>Ancistrus</i> sp. 06	50	86	18m+10sm+8st+14a	Absent	21	21	Matrixã river-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011, 2013)
<i>Ancistrus tombador</i>	50	84	14m+12sm+8st+16a	Absent	Unknown	21 (NOR)	Preto river-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus cirrhosus</i>	50	86	10m+14sm+12st+14a	Absent	1, 18, 23	17	Arroyo San Juan-Posadas (Argentina)	Prizon <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus taunayi</i>	50	92	22m+10sm+10st+8a	ZZ/ZW	21	24	Cascalho stream-SC	Konerat <i>et al.</i> (2015)
<i>Ancistrus</i> sp.	50	88	20m+12sm+6st+12a	Absent	4, 13, 15, 18	13	Unknown	Barros <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “Mourão River”	50	92	12m+18sm+12st+8a	Absent	1, 14, 19, 20	12	Mourão river-PR	Prizon <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “19 Stream”	50	92	♂11m+18sm+13st+8a ♀12m+18sm+12st+8a	XX/XY	1, 12, 15, 20, 22, 25	12	Stream 19-PR	Prizon <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “Keller River”	50	92	♂11m+18sm+13st+8a ♀12m+18sm+12st+8a	XX/XY	1, 12, 15, 20, 25	12	Keller river-PR	Prizon <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. “São Francisco Verdadeiro River”	50	94	14m+16sm+14st+6a	Absent	1, 15, 18, 21	18	São Francisco Verdadeiro river-PR	Prizon <i>et al.</i> (2017)



TABLE 1 | (Continued)

Species	2n	FN	Karyotype formula	Sex chromosome system	rDNA 5S (pair)	rDNA 18S (pair)	Localization	Reference
<i>Ancistrus</i> sp. "Ocoí River"	50	94	10m+18sm+16st+6a	Absent	18, 21, 22	18	Ocoí river-PR	Prizon <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus</i> sp. "São Francisco Falso River"	50	94	10m+18sm+16st+6a	Absent	11, 14, 18, 19	18	São Francisco Falso river-PR	Prizon <i>et al.</i> (2017)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>multispinis</i>	52	84	16m+10sm+6st+20a	Absent	21, 25	24	Ribeirão Grande river-SP	Present study
<i>Ancistrus</i> sp.	52	76	12m+10sm+30st/a	Absent	13	3, 14	Angra dos Reis-SP	Reis <i>et al.</i> (2012)
<i>Ancistrus</i> n.sp. 2	52	90	10m+16sm+12st+14a	Absent	Unknown	15 (NOR)	Garuva river-SC	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>Ancistrus</i> sp. 04	52	82	16m+8sm+6st+22a	Absent	Unknown	22 (NOR)	Sepotuba river -MT	Mariotto <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus</i> n.sp. 2	52	84	32m/sm+20st/a	Absent	Unknown	24 (NOR)	Betari river-SP	Alves <i>et al.</i> (2003)
<i>Ancistrus multispinnis</i>	52	80	28m/sm+24st/a	Absent	Unknown	17 (NOR)	Itapocu river-SC	Alves <i>et al.</i> (2003)
<i>Ancistrus</i> aff. <i>dolichopterus</i> <i>Ancistrus</i> sp. "Piagaçu"	52	♂78 ♀79	16m+8sm+2st+26a 16m+9sm+2st+25a	ZZ/ZW	1, 5, 9, 14, 15, 20, 22, 24, 25, 26	26	Purus river-AM	de Oliveira <i>et al.</i> (2007) Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus</i> sp. Dimona	52	78	16m+8sm+2st+26a	Absent	Unknown	13 (NOR)	Fazenda Dimona stream-AM	de Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> sp. 4	52	82	16m+8sm+6st+22a	Absent	17, 25, 26*	22	Sepotuba river-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011, 2013)
<i>Ancistrus dolichopterus</i> <i>Ancistrus</i> sp. "Barcelos"	52	♂80 ♀79	12m+12sm+4st+24a 11m+12sm+4st+25a	Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> Z <sub>3</sub> Z <sub>4</sub> / Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> W <sub>1</sub> W <sub>2</sub>	1, 2, 6, 8, 9, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 26	23	Demeni river-AM	de Oliveira <i>et al.</i> (2008) Favarato <i>et al.</i> (2016)
<i>Ancistrus claro</i>	54	84	14m+8sm+8st+24a	Absent	4, 19, 21	21	Coxipó river-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2011, 2013)
<i>Ancistrus</i> sp. 03	54	84	14m+8sm+8st+24a	Absent	Unknown	21 (NOR)	Pari stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus</i> sp. 01	54	84	14m+8sm+8st+24a	Absent	Unknown	21 (NOR)	Pipa stream-MT	Mariotto <i>et al.</i> (2013)

compared in order to add information to understand the chromosomal evolution in the genus and contribute to taxonomic and systematic aspects.

## MATERIAL AND METHODS

**Species analyzed.** Twenty five specimens (13 males and 12 females) of *Ancistrus* cf. *multispinis* (Regan, 1912) from Ribeirão Grande river, Paraíba do Sul basin (Pindamonhangaba-SP, 22°47'8" S and 45°27'19" W) and 20 specimens (10 males and 10 females) of *Ancistrus aguaboensis* Fisch-Muller, Mazzoni, Weber, 2001 from Bandeirinha river, Tocantins basin (Formosa-GO, 15°19'25" S and 47°25'26" W) were cytogenetically analyzed. Specimens were deposited in the Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil (voucher numbers: *Ancistrus aguaboensis*, NUP 22305; *Ancistrus* cf. *multispinis*, NUP 22308).

**Conventional cytogenetic procedures.** The chromosomes were obtained from the air-drying method according to Bertollo *et al.* (2015). Detection of the constitutive heterochromatin was performed by C-banding according to Sumner (1972) and the nucleolar organizer regions (NORs) were detected by silver nitrate staining (Howell, Black, 1980). For karyotype assembly, homologs chromosomes were paired and grouped into metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) and acrocentric (a), according to Levan *et al.* (1964). To establish the fundamental number (FN), we

considered the m, sm and st chromosomes as two arms, and acrocentric chromosomes were considered as a single arm. About 30 cells with chromosomes in metaphase were analyzed for each species/method.

**DNA extraction and isolation of repetitive DNAs.** Genomic DNA was extracted from liver using Phenol-Chloroform method (Sambrook *et al.*, 2001). Genomic DNA of both species was used as template in Polymerase Chain Reactions (PCRs) to obtain 5S rDNA sequences, using the following primers: 5Sa (5'- TACGCCCGATCTCGTCCGATC -3') and 5Sb (5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (Martins *et al.*, 1999). The amplification reaction followed Barros *et al.* (2017) protocol. Agarose gel electrophoresis evidenced DNA fragments of approximately 1200 bp, which were isolated ("PCR DNA and Gel Band Purification Kit" - GE Healthcare) and cloned ("InsTAclone PCR Cloning Kit" - Promega), following the manufacturers' instructions. The 5S rDNA clones were sequenced (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). The obtained sequences were analyzed by BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999), then submitted to an identity analysis on BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Rfam (<https://rfam.xfam.org/>) and CENSOR ([www.girinst.org/censor/index.php](http://www.girinst.org/censor/index.php)).

**Fluorescence *in situ* hybridization (FISH).** The FISH procedures were performed following Pinkel *et al.* (1986) protocol, with stringency ~77% (2.5 ng/ $\mu$ L probe, 50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate, at 37 °C for 16 h). It was used the following probes: 18S rDNA (Hatanaka, Galetti Junior, 2004), 5S rDNA (1200 bp DNA fragment amplified by PCR) and the general telomeric sequence of vertebrates (TTAGGG)<sub>n</sub> (Ijdo *et al.*, 1991). The probes 5S rDNA and (TTAGGG)<sub>n</sub> were labeled by PCR using digoxigenin 11-dUTP (Jena Bioscience); 18S rDNA probe was labeled with biotin through the nick translation technique ("Biotin16 NT Labeling Kit" - Jena Bioscience). For signal detection, the antibodies Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) and antidigoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science) were applied. Chromosomes were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) in mounting medium Vectashield (Vector) and analyzed under an epifluorescence microscope Olympus BX51, coupled to the Olympus DP-72 camera with the DP2-BSW software. The best images were photographed, and karyotypes edited using Adobe Photoshop CS6.

## RESULTS

**Karyotypic description.** *Ancistrus aguaboensis* presented 2n = 50 chromosomes, a karyotype formula arranged in 16m+10sm+4st+20a, FN = 80 and, without sex chromosome heteromorphism (Fig. 1A). C-banding revealed blocks of constitutive heterochromatin located on the centromeric and terminal regions of all chromosomes, in addition to one block on the pericentromeric region for the pair m2, on the interstitial long arm of the sm 9 and a large block on the terminal region of one member of the chromosome pair 18 (Fig. 1B). NORs sites were located on the short arms of acrocentric pair 25 (Fig. 1B, box).

*Ancistrus cf. multispinis* presented 2n = 52 chromosomes, a karyotype formula arranged in 16m+10sm+6st+20a, FN=84 and, no heteromorphism of sex chromosomes

was detected (Fig. 1C). The heterochromatin bands were located on the subterminal regions of the short arms of chromosomes pairs 1, 2, 3 and 10; in addition to blocks of heterochromatin on the subterminal regions of the long arms of chromosomes pairs 13, 17, 18 and 20, on the interstitial region of chromosome pair 23, and on one member of each homologs chromosome pairs 25 and 26 (Fig. 1D). NORs sites were visualized on the short arms of the acrocentric pair 24 (Fig. 1D, box).

**In situ localization of rDNAs and telomeric sites.** FISH mapping of 5S rDNA probe in chromosomes of *A. aguaboensis* showed three chromosomal sites: in pericentromeric regions of the short arms of chromosome pairs 2 and 25, and a subterminal site on the acrocentric 21 (Fig. 2A). In situ localization of 18S rDNA sites evidenced signals on the subterminal region of the short arms of chromosome pair 25, syntenic with 5S rDNA sites (Fig. 2A). FISH mapping of (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence showed telomeres regions marked (Fig. 2B), without ITS vestiges.

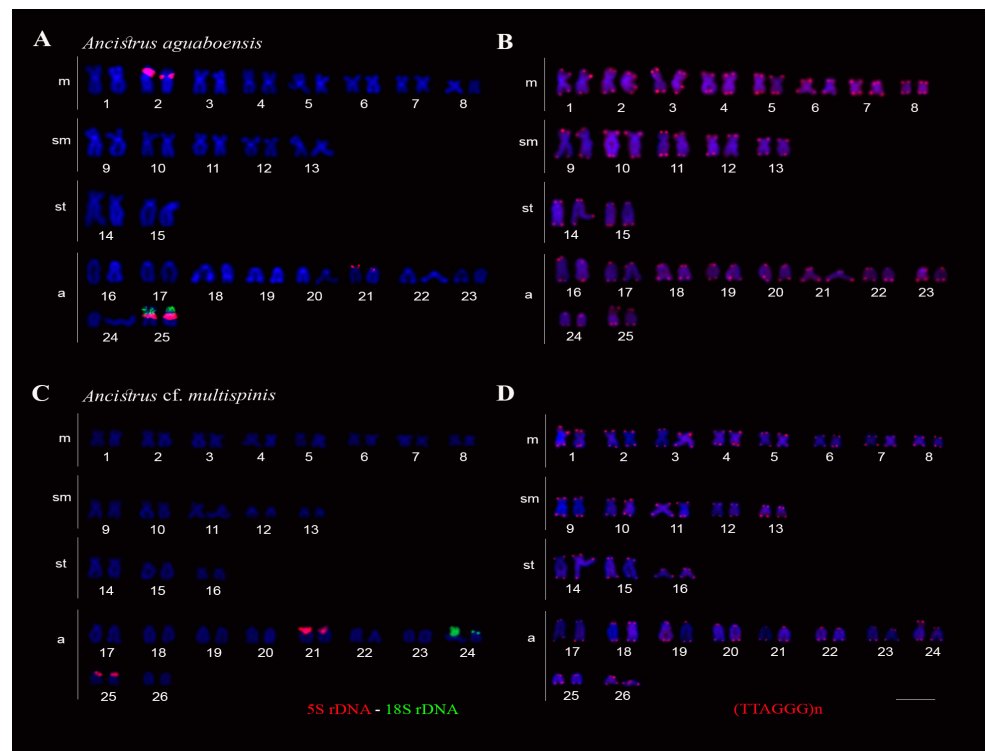
In situ localization of the 5S rDNA in *A. cf. multispinis* revealed sites on the subterminal regions of the short arms of acrocentric pairs 21 and 25, while 18S rDNA sites were located on the subterminal region of the short arms of acrocentric pair 24, which showed a variation in cistron size among the homologs (Fig. 2C). The FISH performed using telomeric sequence probes revealed only terminal chromosomal signals (Fig. 2D).



**FIGURE 1** | Karyotypes of *Ancistrus aguaboensis* (A–B) and *Ancistrus cf. multispinis* (C–D) submitted do Giemsa staining (A–C) and C-banding (B–D). The chromosomes pairs with NORs sites are evidenced in the figure details (boxes). Bar = 10  $\mu$ m.

**Analysis of 5S rDNA sequences.** The 1193 bp-long 5S rDNA sequence obtained from *A. aguaboensis* (GenBank accession no. MT018470) presented 95% identity with 5S rDNA gene of *Symphysodon* sp. (GenBank accession no. KP715274.1). This sequence shows an 120 bp open reading frame (ORF), 1073 bp of the non-transcribed spacer (NTS), an internal promoter comprising box A (47 - 59 bp), the intermediate element (IE) and the box C (78 - 95 bp) and, a poli-T cluster (downstream from transcribed region), a TATA-like region (-36 to -33), a GC box (-17 to -15) and a Cytosin -1. The analyses using the CENSOR software revealed a 30 bp DNA fragment (1048 to 1078 bp) with 90.62% identity with the transposable element (TE) *Helitron* from *Oryza sativa* (*HELITRON3\_OS*).

The 1082 bp-long 5S rDNA sequence obtained from *A. cf. multispinis* (GenBank accession no. MT018471) showed 98% identity with 5S rDNA from *Symphysodon* sp. (GenBank accession no. KP715274.1). This sequence presents an 120 bp ORF and a 962 bp NTS. The internal promoter comprising box A (47 - 59 bp), IE and the box C (79 - 96 bp). The poli-T cluster (downstream from transcribed region), the TATA-like region (-33 to -26), GC box (-17 to -16) and a Cytosin -1 were also detected. Analyses by CENSOR software revealed a 76 bp DNA fragment (736 to 812 bp) with 78.21% identity with the TE *hAT* from *Salmo salar* (*hAT-35N1\_SSa*). According to Rfam, the obtained 5S rDNAs have identity to 5S rRNAs between the segments 1-117, E-value =  $4.2^{-19}$  for *A. aguaboensis* and E-value =  $1.3^{-23}$  for *A. cf. multispinis*.



**FIGURE 2 |** Karyotypes of *Ancistrus aguaboensis* (A–B) and *Ancistrus cf. multispinis* (C–D) submitted to FISH using 5S rDNA, 18S rDNA and (TTAGGG)<sub>n</sub> probes. In (A–C), 5S rDNA (in red) and 18S rDNA (in green) sites; in (B–D), terminal red markers evidenced (TTAGGG)<sub>n</sub> sites. Bar = 10 μm.

## DISCUSSION

Ancistrini and Hypostomini tribes show a wide range of  $2n$  and karyotypes among their representatives (Bueno *et al.*, 2012, 2018; Traldi *et al.*, 2012; Lorscheider *et al.*, 2018). Hypostomini presents high  $2n$  values and diversified karyotypes, whilst in Ancistrini, numerous species of *Ancistrus* tend for the  $2n$  reduction (Mariotto *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2017; Bueno *et al.*, 2018). *Ancistrus* cf. *multispinis* exhibits  $2n = 52$  chromosomes with half of the chromosomes carrying *st/a* morphology, while *A. aguaboensis* has  $2n = 50$  chromosomes and 48% of its are *st/a* chromosomes. Bueno *et al.* (2018) showed that species of *Ancistrus* with  $2n$  close to 52 chromosomes have about 50% of *st/a* chromosomes in their karyotypes, while species with smaller  $2n$  have considerably lower amounts of chromosomes with this morphology. Corroborating this proposal, the occurrence of fusion events of *st/a* chromosomes leads to the formation of *m/sm* chromosomes, and consequent reduction of  $2n$  in some species of *Ancistrus* (Mariotto *et al.*, 2011; Favarato *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017).

*Ancistrus* cf. *multispinis* specimens (Ribeirão Grande, Paraíba do Sul basin) analyzed in this study share  $2n = 52$  chromosomes with *A. multispinis* of the Itapocu river from the coastal basin (Tab. 1, Alves *et al.*, 2003). However, differences in karyotype formulas between the two populations indicate microstructural chromosomal changes in allopatric populations. The absence of ITS vestiges also corroborates the indication of a conserved karyotype for the species. *Ancistrus aguaboensis* has its first karyotype description in this study, and  $2n = 50$  chromosomes suggests a numerical reduction by centric fusion. Aiming the location of ITS vestiges in fused chromosomes, few species of *Ancistrus* had the detection of (TTAGGG) $n$  sequence probes in their genome (Favarato *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017). In *Ancistrus* sp. (Barra Grande river, Paraná State, Ivaí basin), an ITS and 5S rDNA pseudogene were collocated on the metacentric pair 1 (Barros *et al.*, 2017), as observed on the chromosome pair *m2* of *A. aguaboensis*. In *A. aguaboensis*, no vestige of ITS was detected on the *m/sm* chromosomes, which may be a result of the loss of these ITS during the fusion event (Meyne *et al.*, 1990). However, since EBRs can be reused in karyotype evolution (Pevzner, Tesler, 2003), the presence of a 5S rDNA site in the proximal region of pair *m2* indicate its origin from centric fusion with consequent loss of (TTAGGG) $n$  sequences.

The distribution of heterochromatin in karyotypes is a feature widely evaluated in fishes (Kantek *et al.*, 2009; Vicari *et al.*, 2010). The location of chromosome-specific heterochromatic blocks can be useful and collaborate in the recognition of Rb fusion points (Rosa *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2017; Glugoski *et al.*, 2018), or in the recognition of heteromorphic sex chromosomes (de Oliveira *et al.*, 2007, 2008, 2009; Mariotto *et al.*, 2011; Konerat *et al.*, 2015; Favarato *et al.*, 2016; Schemberger *et al.*, 2019). *Ancistrus* cf. *multispinis* and *A. aguaboensis* presented large heterochromatic blocks in some chromosomal pairs, however, with no indication of sex chromosome heteromorphisms. The presence of large heterochromatic blocks is a feature widely shared in *Ancistrus* (Mariotto *et al.*, 2011; Konerat *et al.*, 2015; Favarato *et al.*, 2016), whereas the absence of large heterochromatin blocks has been described to be a plesiomorphic characteristic in Loricariidae (Ziemniczak *et al.*, 2012).

A single chromosome pair carrying 45S rDNA (NOR) is a characteristic shared in all analyzed *Ancistrus* species (Bueno *et al.*, 2018). *Ancistrus* cf. *multispinis* and *A. aguaboensis*

also had only a single pair carrying the 45S rDNA, but on different chromosomes. While *A. cf. multispinis* did not present co-located 45S/5S rDNAs, in *A. aguaboensis* these clusters were located in synteny in an acrocentric pair. In other *Ancistrus* species, the location of the 45S rDNA has also been shown to be widely varied (see Tab. 1). The 45S rDNAs sites in different chromosomal locations, in chromosomes pairs showing different sizes and morphologies and, in condition of synteny to the 5S rDNA, indicate several transpositions and/or other structural events involving the 45S rDNA in *Ancistrus*. Hence, the 45S rDNA site was considered an important cytotaxonomic marker in the group due to its wide chromosomal location variation, being in innumerous cases, species-specific (Mariotto *et al.*, 2011).

While the 45S rDNA is located in a single chromosome pair in *Ancistrus*, the 5S rDNA can be present in a large number of chromosomal sites (ranging from 1 to 13 chromosome pairs) in the different species analyzed (see Tab. 1). Barros *et al.* (2017) proposed the dispersion of 5S rDNAs, and their pseudogenes, in subterminal regions of st/a chromosomes. EBRs located close to 5S rDNA pseudogenes could promote DSB and Rb fusion events (Barros *et al.*, 2017). In fact, *A. cf. multispinis* and *A. aguaboensis* presented 5S rDNA sites in the subterminal regions of acrocentric pairs. In addition, *A. aguaboensis* presented 5S rDNA sequences at proximal region in the pair m2. Variations in the 5S rDNA location occurs in *Ancistrus* species, but the proximal 5S rDNA location in heterochromatic regions, with or without ITS vestiges, may explain a part of the Rb fusions present in the genus.

Previous cytogenetic studies in Trichomycteridae, Neoplecostominae and Hypoptopomatinae species proposed that the 45S/5S rDNA syntenic condition was present in the karyotypes of sister group for Loricariidae (Ziemniczak *et al.*, 2012). Syntenic condition of rDNAs is widely visualized in karyotypes of Loricariidae representatives (Kavalco *et al.*, 2004; Mariotto *et al.*, 2011; Ziemniczak *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2014; Favarato *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017). Analyzing the location of chromosome types and the position of rDNAs synteny sites in Ancistrini, it is more parsimonious to infer evolutionary recurrence indexes for this chromosome condition in this tribe. In fact, when evaluating the pattern of the karyotype distribution of rDNAs in *Ancistrus*, although it may be an allusive proposal, it is possible to corroborate the proposal of Barros *et al.* (2017), which rDNAs pseudogenes can organize EBRs and, these EBRs, have an evolutionary re-use to generate chromosome diversification in the group.

The analysis of the 5S rDNAs sequences of *A. cf. multispinis* and *A. aguaboensis* demonstrated that they have all the structures necessary for their function, although this analysis can be only predictive. Unlike the studies proposed by Barros *et al.* (2017) and Glugoski *et al.* (2018), 5S rDNA pseudogenes were not recovered in our analyzes. Pseudogenes are common in multigene families (Rebordinos *et al.*, 2013). It is difficult to detect EBRs in multigene families, which depends of a large number of sequence analysis or the use of comparative genomics. Thus, the detailed assessment of the presence of EBRs in 5S rDNA pseudogenes/degenerated sequences still remains predictive. However, in *Ancistrus* species with  $2n \leq 50$  chromosomes, the presence of 5S rDNA sites on m/sm chromosomes, originated from Rb fusion, could explain part of the chromosome diversification in the genus.

*Ancistrus aguaboensis* and *A. cf. multispinis* are found in sympatry and syntopy with species of *Harttia punctata* and *Harttia carvalhoi*, respectively. These species show

karyotype diversity, with the absence of sex chromosomes in *A. aguaboensis* and *A. cf. multispinis*, however with the presence of multiple sex chromosomes systems in *Harttia punctata* ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ) and in *Harttia carvalhoi* ( $XX/XY_1Y_2$ ) (Blanco *et al.*, 2013, 2014). These armored catfishes inhabit small tributaries, which favors the isolation of populations, providing events of chromosome rearrangements that could be more easily fixed. This cytogenetic differentiation may be functioning as a reproductive barrier between species, a fact confirmed by the absence of hybrid species.

The wide karyotype diversification present in *Ancistrus* (Bueno *et al.*, 2018) is compatible with the fact that the group is diverse and specious (Lujan *et al.*, 2015). Chromosome rearrangements promote important differences in the genomic sets of species, which could lead to meiotic incompatibilities (Navarro, Barton, 2003). Chromosome segregation failure and the ensuing production of unviable gametes due to the accumulation of chromosomal rearrangements might play an important role in speciation (Navarro, Barton, 2003; Faria, Navarro, 2010). In the same way, the genetic differences accumulated in divergent *Ancistrus* species may have helped in the diversification of this evolutionary lineage.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Financial Code 001) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The authors are grateful to ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – protocol number SISBIO 10538-1) for authorizing the capture of specimens.

## REFERENCES

- **Alves AL, Oliveira C, Foresti F.** Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*. 2003; 56(1):57–63. <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589308>
- **Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F.** Karyotypic relationship among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*. 2006; 128(1–3):1–9. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-0715-1>
- **Armbruster JW.** Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc*. 2004; 141(1):1–80. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2004.00109.x>
- **Armbruster JW.** The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*. 2008; 1822:1–76. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1822.1.1>
- **Artoni RF, Bertollo LAC.** Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). *Hereditas*. 2001; 134(3):201–10. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00201.x>
- **Barbosa P, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Vicari MR.** Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. *Neotrop Ichthyol*. 2017; 15(1):e160056. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160056>



- **Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR.** Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: what is 5S rDNA role? *Gene*. 2017; 608:20–27. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.013>
- **Bellafronte E, Margarido VP, Moreira-Filho O.** Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genet Mol Biol*. 2005; 28(4):710–16. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000500010>
- **Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O.** Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF, editors. *Fish cytogenetic techniques (Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans)*. Enfield USA: CRC Press; 2015. p.21–26. <https://doi.org/10.1201/b18534-4>
- **Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Bertollo LA, Traldi JB, Moreira-Filho O.** The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Rev Fish Biol Fish*. 2013; 23:127–34. <https://doi.org/10.1007/s11160-012-9283-5>
- **Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP, Moreira-Filho O.** Origin of the X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica*; 2014; 142(2):119–26. <https://doi.org/10.1007/s10709-014-9759-4>
- **Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP.** Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev Fish Biol Fish*. 2012; 22:241–50. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9215-9>
- **Bueno V, Venere PC, Konerat JT, Zawadzki CH, Vicari MR, Margarido VP.** Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. *Sci World J*. 2014; 2014(3):1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/943825>
- **Bueno V, Konerat JT, Zawadzki CH, Venere PC, Blanco DR, Margarido VP.** Divergent chromosome evolution in Hypostominae Tribes (Siluriformes: Loricariidae): correlation of chromosomal data with morphological and molecular phylogenies. *Zebrafish*. 2018; 15(5):492–503. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1612>
- **Charlesworth B, Snegowski P, Stephan W.** The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 1994; 371(6494):215–20. <https://doi.org/10.1038/371215a0>
- **Errero-Porto F, Vieira MMR, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC.** Chromosomal Polymorphism in *Rineloricaria Lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population. *Zebrafish*. 2014; 11(4):318–24. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0996>
- **Faria R, Navarro A.** Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol*. 2010; 25(11):660–69. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.07.008>
- **Favarato RM, Silva M, Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E, Matoso DA.** Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish*. 2016; 13(2):103–11. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1140>
- **Ferraris Jr CJ.** Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of Siluriform primary types. *Zootaxa*. 2007; 1418:1–628. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.1418.1.1>
- **Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD.** Species by subfamily/ subfamily [Internet]. San Francisco: California Academy of Science; 2020. Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>
- **Glugoski L, Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V.** Co-located *hAT* transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene*. 2018; 650:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.099>

- **Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 1999; 41:95–98. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14998u1.29](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29)
- **Hatanaka T, Galetti Jr. PM.** Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica.* 2004; 122(3): 239–44. <https://doi.org/10.1007/s10709-004-2039-y>
- **Howell WM, Black DA.** Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980; 36(8):1014–15. <https://doi.org/10.1007/bf01953855>
- **Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST.** Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(17):4780. <https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780>
- **Kantek DLZ, Vicari MR, Peres WAM, Cestari MM, Artoni RF, Bertollo LAC, Moreira-Filho O.** Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). *J Fish Biol.* 2009; 75(2):408–21. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02333.x>
- **Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O.** Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas.* 2004; 141(3):237–42. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01850.x>
- **Konerat JT, Bueno V, Margarido VP, Portela-Castro, ALB, Martins-Santos IC.** Diversity of Sex Chromosome Systems in Ancistrini (Loricariidae, Hypostominae): ZZ/ZW in *Ancistrus taunayi* Miranda Ribeiro, 1918. *Cytogenet Genome Res.* 2015; 146(4):306–10. <https://doi.org/10.1159/000441431>
- **Levan A, Fredga K, Sandberg AA.** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964; 52(2):201–20. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- **Long EO, Dawid IB.** Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 1980; 49:727–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003455>
- **Lorscheider CA, Oliveira JIN, Dulz TA, Nogaroto V, Martins-Santos IC, Vicari MR.** Comparative Cytogenetics Among Three Sympatric *Hypostomus* Species (Siluriformes: Loricariidae): An Evolutionary Analysis in a High Endemic Region. *Braz Arch Biol Technol.* 2018; 61:e18180417. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018180417>
- **Lujan NK, Roach KA, Jacobsen D, Winemiller KO, Vargas VM, Ching VR, Maestre JA.** Aquatic community structure across an Andes-to-Amazon fluvial gradient. *J Biogeogr.* 2013; 40(9):1715–28. <https://doi.org/10.1111/jbi.12131>
- **Lujan NK, Armbruster JW, Lovejoy NR, López-Fernández H.** Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenetics Evol.* 2015; 82PtA:269–88. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.020>
- **Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS.** Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae: Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia.* 2004; 57(4):327–31. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589413>
- **Mariotto S, Miyazawa CS.** *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes: Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sex chromosomes of the type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia.* 2006; 59(4):299–304. <https://doi.org/10.1080/00087114.2006.10797929>
- **Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Moreira-Filho O.** Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotrop Ichthyol.* 2009; 7(4):595–600. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000400006>
- **Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O.** Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet.* 2011; 5(4):289–300. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v5i4.1757>

- **Mariotto S, Centofante L, Moreira-Filho O.** Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2013; 11(1):125–31. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252013000100015>
- **Martins C, Galetti Jr PM.** Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 1999; 7(5):363–67. <https://doi.org/10.1023/a:1009216030316>
- **Maxon R, Cohn R, Kedes L, Mohun T.** Expression and organization of histone genes. *Annu Rev Genet.* 1983; 17:239–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.17.120183.001323>
- **Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK.** Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma.* 1990; 99(1):3–10. <https://doi.org/10.1007/bf01737283>
- **Nascimento VD, Coelho KA, Nogaroto V, Almeida RB, Ziemniczak K, Centofante L, Pavanelli CS, Torres RA, Moreira-Filho O, Vicari MR.** Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? *Zool Anz.* 2018; 272:93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.12.006>
- **Navarro A, Barton NH.** Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution.* 2003; 57(3):447–59. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01537.x>
- **de Oliveira RR, Souza IL, Venere PC.** Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotrop Ichthyol.* 2006; 4(1):93–97. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000100010>
- **de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J.** Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop Ichthyol.* 2007; 5(3):301–06. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252007000300010>
- **de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J.** Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> and Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica.* 2008; 134(2):243–49. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9231-9>
- **de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J.** Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *J Fish Biol.* 2009; 75(9):2209–25. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02450.x>
- **Oliveira MLM, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Primo CC, Vicari MR, Artoni RF, Centofante L, Moreira-Filho O, Oliveira C, Foresti F.** Microstructural chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotrop Ichthyol.* 2016; 14(2):e150084. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150084>
- **Pevzner PA, Tesler G.** Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(13):7672–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1330369100>
- **Pinkel D, Straume T, Gray JW.** Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(9):2934–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>
- **Primo CC, Glugoski L, Almeida MC, Zawadzki HC, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V.** Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish.* 2017; 14(2):161–68. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1386>
- **Primo CC, Glugoski L, Vicari MR, Nogaroto V.** Chromosome Mapping and Molecular Characterization of the *Tc1/Mariner* Element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). *Braz Arch Biol Technol.* 2018; 61:e18170623. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170623>

- **Prizon AC, Borin-Carvalho LA, Bruschi DP, Ribeiro MO, Barbosa LM, Ferreira GEB, Cius A, Zawadzki CH, Portela-Castro ALB.** Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. *Comp Cytogenet.* 2016; 10(4):625–36. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v10i4.8532>
- **Prizon AC, Bruschi DP, Borin-Carvalho LA, Cius A, Barbosa LM, Ruiz HB, Zawadzki CH, Fenocchio AS, Portela-Castro ALB.** Hidden diversity in the populations of the armored catfish *Ancistrus Kner*, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River basin revealed by molecular and cytogenetic data. *Front Genet.* 2017; 8:185. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00185>
- **Rebordinos L, Cross I, Merlo A.** High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. *Cytogenet Genome Res.* 2013; 141(2-3):103–13. <https://doi.org/10.1159/000354871>
- **Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JH.** Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei: Siluriformes), with revisions of *Delterus* and *Hemipsilichthys*. *Zool J Linn Soc.* 2006; 147(2):277–99. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00229.x>
- **Reis DAR, Brandão KO, Toledo LFA, Pazzo R, Kavalco KF.** Localização física dos genes ribossomais 5S e 18S em *Ancistrus* sp. (Loricariidae: Ancistrini) de Angra dos Reis/RJ, Bacia dos Rios Costeiros. *Evol Conserv Biodivers.* 2012; 3:39–44.
- **Ribeiro MO, Noleto RB, Lorscheider CA, Porto FE, Prizon AC, Zawadzki CH, Oliveira LC, Portela-Castro ALB.** Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçú River basin, southern Brazil. *Genet Mol Res.* 2015; 14(2):4051–57. <https://doi.org/10.4238/2015.April.27.20>
- **Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, Vicari MR.** Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fish.* 2012; 22:739–49. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9250-6>
- **Sambrook J, Russell DW.** Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- **Schemberger MO, Nascimento VD, Coan R, Ramos E, Nogaroto V, Ziemniczak K, Valente GT, Moreira-Filho O, Martins C, Vicari MR.** DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. *Chromosoma.* 2019; 128(4):547–60. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00721-9>
- **Sumner AT.** A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 1972; 75(1):304–06. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- **Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, Artoni RF, Moreira-Filho O.** First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comp Cytogen.* 2012; 6(2):115–25. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v6i2.2595>
- **Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, Artoni RF, Moreira-Filho O.** Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res.* 2013; 12(1):463–71. <https://doi.org/10.4238/2013.February.8.11>
- **Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF.** Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genet Mol Biol.* 2006; 29:621–25. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000400008>
- **Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari, MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF.** Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol.* 2010; 76(5):1094–116. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x>
- **Ziemniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR.** Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool.* 2012; 79(4):492–501. <https://doi.org/10.1080/11250003.2012.676677>

### AUTHOR'S CONTRIBUTION

**Larissa Glugoski:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing-original draft.

**Geize Deon:** Formal analysis, Investigation, Methodology.

**Stephane Schott:** Methodology.

**Marcelo R. Vicari:** Methodology, Project administration, Supervision, Writing-review & editing.

**Viviane Nogaroto:** Methodology, Project administration, Supervision, Writing-review & editing.

**Orlando Moreira-Filho:** Funding acquisition, Investigation, Project administration, Supervision, Writing-review & editing.

## Neotropical Ichthyology



This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

© 2020 The Authors.  
Diversity and Distributions Published by SBI



Official Journal of the  
Sociedade Brasileira de Ictiologia

### ETHICAL STATEMENT

The research was approved by the Ethics Committee of Animal Usage (Process CEUA 028/2016) of the Universidade Estadual de Ponta Grossa.

### COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

- **Glugoski L, Deon G, Schott S, Vicari MR, Nogaroto V, Moreira-Filho O.** Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae). *Neotrop Ichthyol.* 2020; 18(2):e200013. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0013>