

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

VANESSA ISABEL BATISTA DE MORAIS

O PARADOXO DA VARIAÇÃO CARIOTÍPICA
EM PEQUENAS POPULAÇÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS:
O MODELO DE *Rineloricaria lanceolata* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)

PONTA GROSSA
2024

VANESSA ISABEL BATISTA DE MORAIS

O PARADOXO DA VARIAÇÃO CARIOTÍPICA
EM PEQUENAS POPULAÇÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS:
O MODELO DE *RINELORICARIA LANCEOLATA* (SILURIFORMES:
LORICARIIDAE)

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

PONTA GROSSA
2024

M827 Morais, Vanessa Isabel Batista de
O paradoxo da variação cariotípica em pequenas populações de peixes neotropicais: o modelo de *Rineloricaria lanceolata* (Siluriformes: Loricariidae) / Vanessa Isabel Batista de Morais. Ponta Grossa, 2024.
60 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

1. Rineloricaria. 2. Polimorfismo. 3. Rearranjos cromossômicos. 4. Meiose. 5. Satelitoma. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.T.

CDD: 574



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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 05/2024

Ata referente a Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Vanessa Isabel Batista de Moraes**. Ao sétimo dia de outubro de dois mil e vinte e quatro, sob a presidência do Professor Dr. Roberto Ferreira Artoni, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da defesa de Dissertação de Mestrado da aluna, **Vanessa Isabel Batista de Moraes** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, constituída por: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG), Dr. Cristian Araya-Jaime (UNIVERSIDAD DE LA SERENA - CHILE) e Dra Mara Cristina de Almeida (UEPG) atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e à candidata das normas que regem a defesa de Dissertação. A seguir a candidata passou a defesa da sua Dissertação intitulada: **“O PARADOXO DA VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM PEQUENAS POPULAÇÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS: O MODELO DE *Rineloricaria lanceolata* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)”**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**.

Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário).

Alteração de Título: sim ☐ não ☒
Novo título:

Ponta Grossa, 07 de outubro de 2024.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador/Presidente)

Membro Titular 1 - Prof. Dr. Cristian Araya-Jaime (UNIVERSIDAD DE LA SERENA)

Membro Titular 2 – Profa Dra Mara Cristina de Almeida (UEPG)

AGRADECIMENTOS

Com a conclusão deste mestrado, termina-se também um ciclo. Agradeço a todos que tornaram isso possível, me ajudaram a superar as adversidades e a cultivar as vitórias.

À minha família pelo apoio que me permitiu estar aqui. À minha mãe Silvana e às minhas irmãs, Valéria e Suzana, que apesar da distância de mais de 400 quilômetros estão sempre presentes em minha vida e me ajudam a construí-la a cada passo.

Ao meu namorado Rickson, pelo suporte e carinho que me dá força para continuar, e à minha cachorrinha Laika. Vocês dois fazem com que nossa casa em Ponta Grossa se torne um lar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, por me dar a oportunidade de participar do laboratório e ingressar na pós-graduação, abrindo portas essenciais para meu aprendizado.

À Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida, pelas contribuições valiosas ao meu mestrado e por me ensinar e me inspirar desde a graduação.

À Juliane Vida Lemos de Oliveira, que colaborou com o desenvolvimento deste trabalho e me ensinou as primeiras técnicas para estudo destes peixes.

Aos meus amigos, e especialmente ao Hugo, com quem posso sempre contar.

À Franciele e à Luz, pela amizade e ajuda constante que permeou todo o período em que estive no laboratório.

Aos demais amigos e colegas do LabGev por todo o conhecimento compartilhado, boas conversas e ajuda nestes últimos dois anos.

RESUMO

O gênero *Rineloricaria* é o mais rico em espécies da família Loricariidae, com 71 espécies atualmente aceitas. Esses peixes neotropicais se distinguem por uma característica notável: a diversidade cariotípica. Isso é exemplificado pela presença de polimorfismos cromossômicos estruturais e numéricos, que estão predominantemente associados a rearranjos do tipo Robertsoniano. No entanto, os dados citogenéticos só estão disponíveis para um número limitado de espécies desse táxon, e há uma escassez de pesquisas que explorem outros aspectos desse fenômeno. Esses aspectos incluem a manutenção desses polimorfismos ao longo da história de vida das espécies e as possíveis consequências evolutivas desses polimorfismos para a manutenção das populações. Esta dissertação teve como objetivo estudar a população polimórfica da espécie *Rineloricaria lanceolata* do Córrego da Onça, Mato Grosso do Sul, utilizando métodos de bioinformática e citogenética para investigar e propor hipóteses sobre os mecanismos de surgimento e manutenção dos polimorfismos nesses peixes. A caracterização citogenética da amostra revelou diferenças entre os citótipos presentes nos indivíduos da população, incluindo a observação de um citótipo inédito para a espécie. Preparações meióticas foram realizadas a partir desse citótipo pertencente a um indivíduo macho com $2n=47$ cromossomos, o que permitiu a análise do comportamento da segregação cromossômica durante a meiose com o auxílio de sondas ribossomais e de satélites. A sonda de rDNA 5S mostrou-se fundamental para identificar os cromossomos envolvidos no rearranjo Robertsoniano que deu origem ao citótipo $2n=47$ a partir de sua forma ancestral $2n=48$. Esses cromossomos formam um emparelhamento trivalente durante a meiose, resultando na produção de gametas desequilibrados em frequências iguais. O satelitoma (biblioteca de sequências repetitivas do genoma) foi construído a partir do DNA total de um indivíduo e resultou na caracterização de 36 famílias de DNAs satélites (satDNA). Embora os rearranjos Robertsonianos aqui verificados sejam eventos estruturais que diminuem o valor adaptativo, a manutenção dos polimorfismos pode trazer alguma vantagem adaptativa conforme a hipótese de robustez à deriva sugerida. Isto deve se repetir em outras populações polimórficas do gênero não como um evento recorrente, mas com algum mecanismo molecular subjacente ainda não desvendado para a instabilidade cromossômica.

Palavras-chave: *Rineloricaria*; polimorfismo; rearranjos cromossômicos; meiose; satelitoma.

ABSTRACT

The genus *Rineloricaria* is the most species-rich within the Loricariidae family, with 71 currently accepted species. These Neotropical fish are distinguished by a remarkable characteristic: karyotypic diversity. This is exemplified by the presence of structural and numerical chromosomal polymorphisms, which are predominantly associated with Robertsonian-type rearrangements. However, cytogenetic data is only available for a limited number of species within this taxon, and there is a paucity of research exploring other aspects of this phenomenon. These aspects include the maintenance of these polymorphisms throughout the life history of the species and the potential evolutionary consequences of these polymorphisms for the maintenance of populations. This dissertation aimed to study the polymorphic population of the species *Rineloricaria lanceolata* from Córrego da Onça, Mato Grosso do Sul, using bioinformatics and cytogenetic methods to investigate and propose hypotheses about the mechanisms of emergence and maintenance of polymorphisms in these fish. The cytogenetic characterisation of the sample revealed notable differences between the cytotypes present in the individuals of the population, including the observation of a unprecedented cytotype in the species. Meiotic preparations were created from this cytotype, which belonged to a male individual with $2n=47$ chromosomes. This enabled the behaviour of chromosome segregation during meiosis to be analysed with help of ribosomal and satellite probes. The 5S rDNA probe was instrumental in identifying the chromosomes involved in the Robertsonian rearrangement that gave rise to the $2n=47$ cytotype from its ancestral $2n=48$ form. These chromosomes form a trivalent pairing during meiosis, resulting in the production of unbalanced gametes in equal frequencies. The satellitome, or library of repetitive genome sequences, was constructed from the total DNA of an individual, with 36 satDNA families being characterised. Although the Robertsonian rearrangements observed here are structural events that diminish adaptive value, the maintenance of polymorphisms may offer an adaptative advantage according to the drift robustness hypothesis here suggested. This process should be repeated in other polymorphic populations of the genus, not as a recurring event, but with some underlying molecular mechanism for chromosomal instability that has yet to be elucidated.

Keywords: *Rineloricaria*; polymorphism; chromosomal rearrangements; meiosis; satellitome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Região biogeográfica neotropical.....	10
Figura 2 – Relação de filogenia do gênero <i>Rineloricaria</i> proposta por Covain <i>et al.</i> (2016) e tabelas contendo revisão de informações citogenéticas das espécies contidas.....	14
Figura 3 – Classes de DNAs repetitivos.....	16
Figura 4 – Exemplar de <i>Rineloricaria sp.</i> coletado no Rio Cubatão do Norte – SC.....	22
Figura 5.1 – Chromosomal polymorphisms are described in populations of the genus <i>Rineloricaria</i> in different locations in Brazil.....	33
Figura 5.2 – <i>Rineloricaria lanceolata</i> cells with conventional staining (Giemsa), 2n=47.....	34
Figura 5.3 – <i>Rineloricaria lanceolata</i> cells with fluorescence in situ hybridization (FISH) using rDNA 5S probe (red) and DAPI counterstain.....	35
Figura 5.4 – Satellitome abundance and divergence profile data (left) and trivalent segregation highlighted by 5S probe (green) in contrast to bivalent conventional segregation shown with RlaSat17-1328 (red) in double FISH.....	35
Figura 5.5 – New cytotype of <i>Rineloricaria lanceolata</i> originated from centric fusion and its consequences on meiosis.....	37
Figura 5.6 – Cytotype ideograms found by Porto <i>et al.</i> (2014).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das famílias de satélites encontradas em <i>Rineloricaria lanceolata</i>	24
Tabela 2 – Citogenetic data found for study individuals.....	36
Tabela 3 – Observed Frequency of gamete segregation possibilities in meiosis II cells (n=30) and Chi-Square ($\alpha = 5\%$).....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 REGIÃO NEOTROPICAL.....	9
1.2 ORDEM SILURIFORMES.....	10
1.3 GÊNERO <i>RINELORICARIA</i>	11
1.4 DIVERSIDADE GENÉTICA EM <i>RINELORICARIA</i>	12
1.5 POLIMORFISMOS CARIOTÍPICOS.....	13
1.6 DNAs REPETITIVOS.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVO.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 AMOSTRAGEM DE INDIVÍDUOS.....	21
4.2 CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	22
4.3 CITOGENÉTICA MOLECULAR.....	23
4.4 ANÁLISES MOLECULARES.....	23
4.5 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 EXPLORING CHROMOSOMAL POLYMORPHISM AND EVOLUTIONARY IMPLICATIONS IN <i>RINELORICARIA LANCEOLATA</i> (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): INSIGHTS FROM MEIOTIC BEHAVIOR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS.....	26
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 REGIÃO NEOTROPICAL

A região Neotropical abriga uma ictiofauna de água doce genética e morfologicamente diversa com mais de 6.200 espécies descritas, a maioria das quais pertencentes às ordens Siluriformes, Characiformes, Cyprinodontiformes, Cichliformes e Gymnotiformes (Vari; Malabarba, 1998; Albert *et al.*, 2020). A regionalização mais recente aceita é a proposta por Morrone (2014), que coloca a extensão desta região abrangendo desde a Zona de Transição Mexicana até a Zona de Transição Sul Americana (Figura 1).

As mudanças de paisagem ocorridas ao longo do tempo na região Neotropical moldaram a distribuição e diversificação de espécies da ictiofauna. Estas foram causadas por eventos como capturas fluviais até as alterações no nível do mar devido às oscilações climáticas do Pleistoceno (Albert *et al.*, 2020).

A malha hidrográfica extensa e ramificada proporciona condições que favorecem um elevado grau de endemismo dos peixes neotropicais, que é maior nas porções continentais periféricas de maior altitude e menor na região continental central da Bacia Amazônica, que por sua vez concentra a maior densidade de riqueza de espécies. Esse padrão é inverso ao dos sistemas de rios no restante do mundo devido ao soerguimento da Cordilheira dos Andes iniciado há cerca de 80 milhões de anos no Cretáceo, que ocasionou mudanças na rede de rios ao longo do tempo em que as taxas de especiação superaram as de extinção, resultando na biodiversidade atual (Albert *et al.*, 2020; Boschman *et al.*, 2023).

Figura 1. Região biogeográfica neotropical.



Fonte: Morrone, 2014.

1.2 ORDEM SILURIFORMES

A Ordem Siluriformes é o grupo de maior representação da ictiofauna neotropical. Ao todo possui 4537 espécies, sendo que 1260 ocorrem na América do Sul (GBIF, 2024; Akama *et al.*, 2024). Majoritariamente dulcícolas, com exceção de espécies das famílias Ariidae e Plotosidae, estes peixes possuem sinapomorfias como a ausência de escamas, presença de espinhos nas nadadeiras peitoral e dorsal e a formação de um “complexo central” através da fusão das vértebras 2-4 e dos terceiro e quarto arcos neurais (Malabarba; Malabarba, 2020).

Das 38 famílias da ordem, 5 contribuem com aproximadamente 80% das espécies – Callichthyidae, à qual pertencem os tamboatás e coridoras; Heptapteridae,

composta por bagres de tamanho pequeno (<20 cm); Pimelodidae, família dos surubins e mandis; Trichomycteridae, representada pelos candirus; e Loricariidae, família à qual pertencem os cascudos com placas dérmicas. Este último táxon é caracterizado pela presença de séries de placas dérmicas e boca com dentes posicionada ventralmente que permite a raspagem do substrato. Contabilizando 1051 espécies distribuídas em 115 gêneros, Loricariidae é a família mais abundante da ordem, sendo *Rineloricaria* o gênero que mais contribui para sua riqueza de espécies (Malabarba; Malabarba, 2020; Fricke, 2024).

1.3 GÊNERO *RINELORICARIA*

Rineloricaria (Bleeker, 1862) é um gênero com 72 espécies aceitas (Fricke, 2024) que ocorrem desde a Costa Rica e Panamá até a Argentina. São peixes de pequeno a médio porte, de hábito bentônico e baixa tolerância à salinidade que ocorrem em ambientes lóticos e lênticos, ocupando fundos arenosos ou pedregosos de rios e lagos. São iliófagos, se alimentando de algas, pequenos vertebrados e invertebrados por meio de raspagem utilizando o aparato bucal (Malabarba; Malabarba, 2020). As espécies do gênero possuem longevidade calculada de 6 a 7 anos, com tempo geracional de 3 anos, apresentando cuidado parental por parte do macho (Barhieri, 1994; Fries, 2020).

Reconhecidos em inglês como “armored catfishes”, ou cascudos de armadura, suas principais características morfológicas são a presença de placas dérmicas que recobrem o corpo; boca em forma de ventosa na posição ventral, podendo possuir barbilhões; corpo achatado dorso-ventralmente; ausência de nadadeira adiposa; pedúnculo caudal alongado; a presença de odontódeos; dimorfismo sexual geralmente frequente, com a maior quantidade de odontódeos e presença de espinhos das nadadeiras desenvolvidos em machos (Py-Daniel; Fernandes, 2005; Nelson *et al.*, 2016).

A filogenia do gênero compõe um agrupamento monofilético, abordada nos trabalhos de Costa-Silva *et al.* (2015) e Covain *et al.* (2016). Covain e colaboradores (2016) utilizaram caracteres moleculares para detalhamento das relações filogenéticas da subfamília Loricariinae, revelando incongruências das classificações

morfológicas que foram utilizadas previamente na construção das filogenias e propondo a junção de alguns táxons, dos quais *Fonchiiichthys*, *Hemiloricaria*, *Leliella* e *Ixinandria* foram classificados como sinônimos de *Rineloricaria*.

O estudo de Costa-Silva *et al.* (2015), que teve como enfoque as 65 espécies de *Rineloricaria* descritas na época, evidenciou a complexidade da distinção de espécies neste grupo devido à semelhança morfológica, e em determinados casos, a variabilidade genética intraespecífica. Foram determinadas 73 OTUs (Unidades Taxonômicas Evolutivas), indicando uma possível subestimação da quantidade de espécies e simultaneamente sugerindo a separação de OTUs, aliadas às metodologias de DNA *barcoding* e análises bioinformáticas, como uma alternativa para o estudo taxonômico de grupos diversos e com alta similaridade morfológica para delimitação de espécies, como é o caso de *Rineloricaria*.

1.4 DIVERSIDADE GENÉTICA EM *RINELORICARIA*

A ictiofauna neotropical é abundante em variabilidade genética, especialmente em relação a diversidade cariotípica, com distintos sistemas de cromossomos sexuais, níveis de ploidias, número diploide, cromossomos supranumerários e em particular casos de polimorfismos relacionados aos sítios de heterocromatina e NOR (Pazza; Kavalco, 2007). A família Loricariidae possui uma grande diversidade de cariótipos, incluindo espécies com cromossomos B, sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2♀/ X_1X_2Y♂$ (Marajó *et al.*, 2023), além de polimorfismos cromossômicos numéricos e estruturais (Takagui *et al.*, 2020).

O gênero *Rineloricaria* possui a maior variação de número diploide da subfamília Loricariinae, indo de $2n=33♂/34♀$ em *Rineloricaria teffeana* da bacia Amazônica (Marajó *et al.*, 2023) a até $2n=66-70$ nas populações de *Rineloricaria lima* do rio Areia e Açungui (Rosa *et al.*, 2012), recentemente revisado por Takagui *et al.* (2020). Além disso, o grupo possui exemplos de representantes com cromossomos B em *Rineloricaria pentamaculata* (Porto *et al.*, 2010) e sistema de cromossomo sexual $X_1X_1X_2X_2♀/ X_1X_2Y♂$ em *Rineloricaria teffeana*, recentemente descrito por Marajó *et al.* (2023). Ocorrem ainda variações intraespecíficas na fórmula cariotípica descritas em populações distribuídas ao longo de toda a filogenia do táxon (Figura 2), incluindo

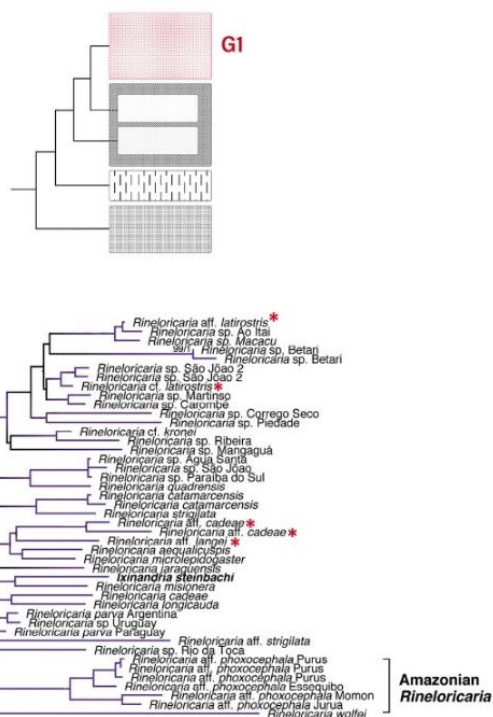
polimorfismos estruturais que apontam para hipóteses de origem a partir de eventos de inversão, fusão e fissão cêntrica em regiões de DNAs repetitivos como NORs e sequências teloméricas (Porto *et al.*, 2011; Primo *et al.*, 2016).

1.5 POLIMORFISMOS CARIOTÍPICOS

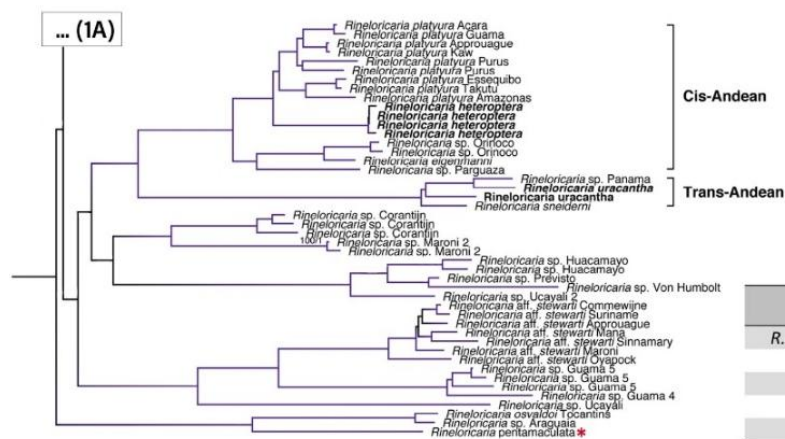
Os polimorfismos, conforme definição clássica de Ford (1940), são “a ocorrência no mesmo habitat de duas ou mais formas distintas de uma espécie, em tal proporção de modo que a forma mais rara não possa ser mantida por mutações recorrentes”. Existem exemplos abundantes de espécies com polimorfismos cromossômicos de número diploide e estruturais distribuídos pelas ordens de peixes teleósteos, associando as origens destes polimorfismos aos rearranjos e seu papel na evolução cromossômica (Galetti *et al.*, 2000; Molina; Galetti, 2002; Oliveira *et al.*, 2009; Nirchio *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022)

Em *Rineloricaria*, a variação numérica e estrutural do cariótipo ocorre em várias das espécies caracterizadas citogeneticamente, de maneira inter ou intrapopulacional: *R. lima*, *R. latirostris*, *R. cadeae*, *R. aff. langei*, *R. pentamaculata*, *R. lanceolata* e *R. teffeana*. A origem dos polimorfismos de cariótipo no gênero é bem descrita na literatura, sendo associada a rearranjos Robertsonianos (Giuliano-Caetano, 1998; Maia *et al.*, 2010; Porto *et al.*, 2011, 2014; Rosa *et al.*, 2012; Primo *et al.*, 2016; Cius *et al.*, 2017; Glugoski *et al.*, 2018; Marajó *et al.*, 2023).

Os rearranjos Robertsonianos (Rb) são eventos de rearranjo cromossômico onde há fusão cêntrica de dois cromossomos sem que haja perda significativa de DNA, sendo considerado uma translocação balanceada. Em *Rineloricaria*, estes rearranjos estão frequentemente associados a DNAs repetitivos e acontecem de maneira recorrente, resultando por vezes na existência de diferentes citótipos dentro de uma mesma população, a citar como exemplo a população de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande – SC (Glugoski *et al.*, 2023).



1B



Species	2n	Karyotype formula	FN	Reference
<i>R. latirostris</i>	46	10m+4sm+32st/a	60	1
	46	10m+4sm+32st/a	60	1
	46	10m+4sm+32st/a	60	1
	48	6m+6sm+36st/a	60	2
	43	17m/sm+26st/a	60	3
	44	16m/sm+28st/a	60	3
	46	14m/sm+32st/a	60	3
	47	13m/sm+34st/a	60	3
	48	12m/sm+36st/a	60	3
	44	16m/sm+28st/a	60	3
	45	15m/sm+30st/a	60	3
	46	14m/sm+32st/a	60	3
	47	13m/sm+34st/a	60	3
	36	24m/sm+12st/a	60	3
	37	23m/sm+14st/a	60	3
	38	22m/sm+16st/a	60	3
	39	21m/sm+18st/a	60	3
	40	20m/sm+20st/a	60	3
<i>R. kronei</i>	64	6m-sm+58st-a	70	4
<i>R. quadrensis</i>	70	6m/sm+64st/a	76	5
<i>R. strigilata</i>	68	6m/sm+62st/a	74	4
<i>R. cadeae</i>	64	2m/sm+62st/a	66	4
	66	2m/sm+64st/a	68	4
	66	2m+64st	68	6
<i>R. parva</i>	60	6m-sm+54st-a	66	7
<i>R. longicauda</i>	70	8m/sm+58st/a	74	5
<i>R. aff. langei</i>	65	3m+62st/a	68	8
	65	4m+61st/a	69	8
	66	3m+63st/a	69	8
	67	3m+64st/a	70	8
	67	4m+63st/a	71	8
	67	1m+66st/a	68	8
	67	2m+65st/a	69	8
<i>R. aequalicuspis</i>	68	68st/a	68	5
<i>R. microlepidogaster</i>	68	68 st/a	68	5

Species	2n	Karyotype formula	FN	Reference
<i>R. pentamaculata</i>	56	4m+10sm+42st/a	70	1
	54	6m+4sm+44st/a	64	1
	56	9m/sm+47st/a	64	9
	56	8m/sm+48st	64	9
	56	8m/sm+48st/a	64	4

1A-1D: subgrupos com respectivas tabelas contendo informação citogenética das espécies contidas. 1C: grupo *Rineloricaria lanceolata*. FN: número fundamental. Asterisco: espécies com polimorfismos de cariótipo descritas. Referências: 1 – Primo *et al.*, 2016. 2 – Glugoski *et al.*, 2018. 3 – Giuliano-Caetano, 1998. 4 – Maia *et al.*, 2010. 6 – Alves *et al.*, 2003. 5 – Venturelli *et al.*, 2023. 7 –

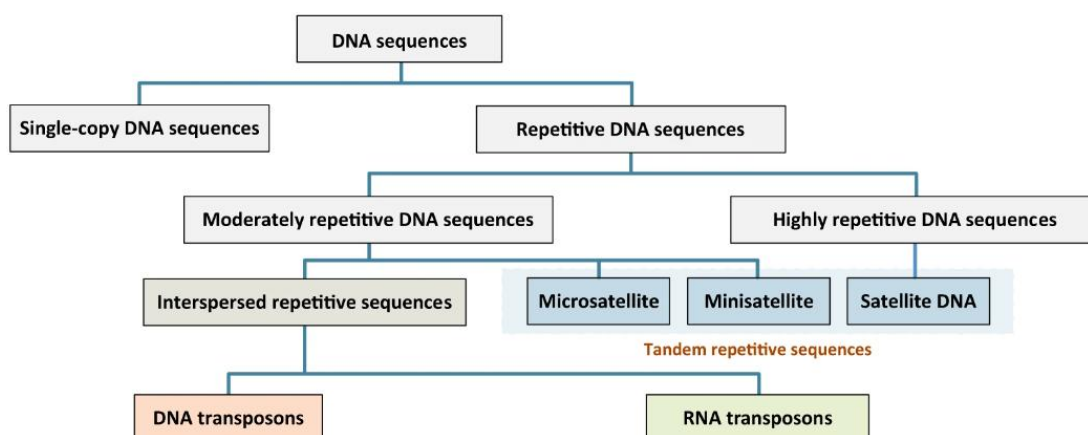
Takagui *et al.*, 2020. 8 – Cius *et al.*, 2017. 9 – Porto *et al.*, 2011. 10 – Porto *et al.*, 2014. 11 – Marajó *et al.*, 2023.

A estabilidade de polimorfismos nas espécies do gênero é um paradoxo quando se considera a baixa capacidade de dispersão, do tamanho pequeno das populações e o habitat em rios e riachos que limitam o fluxo gênico. A variação cariotípica dentro destas populações oferece risco de inviabilizar cruzamentos entre os indivíduos por meio da geração de gametas desbalanceados na meiose, o que levaria ao declínio destas até o ponto de eventual extinção. Alternativamente, esse poderia ser considerado um início do processo de especiação simpátrica, onde gradualmente as diferenças genéticas impediriam cruzamentos viáveis até o eventual ponto de barreira reprodutiva. Há incerteza sobre a contribuição destes tipos de polimorfismo na evolução das populações de *Rineloricaria*, assim como a natureza plesiomórfica destas características, o que permanece como uma questão de interesse evolutivo e para a conservação ainda em aberto.

1.6 DNAS REPETITIVOS

Os DNAs repetitivos são sequências com múltiplas cópias ao longo do genoma, presentes tanto em procariotos quanto eucariotos – compondo neste último grupo uma parcela significativa do genoma das espécies. Estas sequências podem se organizar em tandem ou de maneira intercalada, e são categorizadas conforme a quantidade de cópias (Figura 3). As sequências moderadamente repetitivas (10 a 10^5 cópias) de tipo intercalado com propriedade de mobilização através do genoma são os elementos transponíveis (TEs) de DNA e RNA, estes subdivididos em mais classes; e as sequências organizadas em tandem são divididas em microssatélites e minissatélites. As sequências em tandem altamente repetitivas que possuem acima de 10^6 cópias são denominadas DNAs satélites (Liao *et al.*, 2023; Jurka *et al.*, 2007).

Figura 3. Classes de DNAs repetitivos.



Fonte: Liao *et al.*, 2023.

Os DNAs em tandem – satélites, minissatélites e microssatélites – são uma classe de DNA repetitivo que tem se mostrado de interesse nos estudos evolutivos. Os satélites formam blocos de heterocromatina constitutiva (embora também haja registros de que ocasionalmente podem ser encontrados em regiões de eucromatina), e são compostos de unidades repetitivas que vão de alguns poucos pares de base até mais de um quilobase. Os minissatélites são repetições de 5 a 100 pb, e possuem proporção no genoma menor que os microssatélites, que possuem repetições de menos de 5 pb (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2023).

Conforme o princípio da “hipótese de biblioteca” mencionado no artigo de Ruiz-Ruano *et al.* (2016), as famílias de DNAs satélites (Satelitoma) são relativamente conservadas em espécies próximas, podendo apresentar leves diferenças na amplificação das bibliotecas entre populações e indivíduos, o que os tornam marcadores de interesse em estudos filogenéticos, além da elaboração de marcadores para a identificação de regiões cromossômicas. O satelitoma de *Rineloricaria lanceolata*, o primeiro para o gênero, foi caracterizado por Oliveira (2022) através de prospecção *in silico*, o que resultou na identificação de 40 famílias de satDNA, sendo os satélites mais abundantes no genoma RlaSat01-732, RlaSat02-1244 e RlaSat03-4715.

Os elementos transponíveis são um tipo de elemento genético móvel que se distribuem ao longo do DNA de modo intercalado. São divididos em Classe I e Classe II, e possuem mecanismos e estrutura distintos conforme sua categoria. Os TEs de

RNA compõem a Classe I, que é subdividida em 5 superfamílias (LTR, LINEs, SINEs, DIRS e PLEs). A estrutura geral dos retrotransposons inclui genes de transcriptases reversas, nucleases e proteínas ligantes à RNA, permitindo a movimentação no genoma através de um intermediário de RNA. Os TEs de DNA pertencem à Classe II, e se inserem no genoma sem um intermediário de RNA. Possuem como principal característica estrutural porções terminais complementares denominadas TIR – terminal inverted repeat sequences (Liao *et al.*, 2023).

A proporção marcante dos DNAs repetitivos no genoma dos eucariotos é acompanhada de funções igualmente relevantes. Previamente considerados de maneira errônea como “DNA lixo”, eles possuem papel na regulação da expressão gênica abrigando regiões promotoras, *enhancers* e RNAs reguladores, e função estrutural, compondo centrômeros e telômeros. Os TEs são ainda indutores de variação, já que podem também interferir na expressão gênica, causar mutações ao serem inseridos em genes, propiciar rearranjos cromossômicos e aumentarem o tamanho dos genomas (Liao *et al.*, 2023).

Os DNAs repetitivos podem colaborar para a ocorrência de rearranjos, assim como também podem ser remanescentes indicativos da ocorrência destes eventos. As sequências teloméricas intersticiais (ITS), por exemplo, são em mamíferos tanto regiões instáveis que favorecem a quebra de dupla fita quanto “cicatrices” (repetições de TTAGGG inseridas durante o reparo de DNA) dos eventos de rearranjo a depender de seu tipo (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Em peixes os ITS, rDNAs, satDNAs e TEs podem estar associados a rearranjos cromossômicos de maneira causal e/ou por consequência, sendo marcadores de interesse no estudo da evolução cariotípica (Rosa *et al.*, 2012; Primo *et al.*, 2016,2018).

Em estudos dentro do gênero *Rineloricaria*, existem indícios do envolvimento de rDNA 5S e ITS em rearranjos Robertsonianos de *Rineloricaria lima*, *Rineloricaria pentamaculata* e *Rineloricaria latirostris* (Rosa *et al.*, 2012; Primo *et al.*, 2016; Glugoski *et al.*, 2023), assim como indícios de que não há associações de rDNA 5S e ITS na população de *R. pentamaculata* do córrego Itiz (Cius *et al.*, 2022). A participação de microsatélites CA e GA na fusão de cromossomos de *Rineloricaria pentamaculata* também foi registrada por Glugoski *et al.* (2023), mostrando sua relevância na ocorrência de rearranjos cromossômicos.

O estudo de Glugoski *et al.* (2018) caracterizou as regiões de 5S de duas populações de *R. latirostris* – Rio das Pedras e Rio Piumhi – mostrando presença de degeneração em alguns sítios de 5S na população do Rio das Pedras decorrente da invasão do TE hAT, além da presença de sítios 5S em conjunto a ITS e regiões de 5S isolados, em contraste com a população do Rio Piumhi contendo apenas sítios de 5S isolados. Os sítios de 5S degenerados e os conjugados com ITS são destacados como potenciais hotspots de recombinação, ao mesmo tempo em que a diferença estrutural dos sítios das duas populações marca os distintos eventos cromossômicos que levam às diferenças de cariótipo dentro da mesma espécie. Esse conjunto de características, portanto, torna evidente o papel de DNAs repetitivos como força motriz da evolução do genoma.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da riqueza genética, existem poucos dados citogenéticos e de sequenciamento disponíveis para os peixes neotropicais; estima-se que apenas 15% das espécies de Loricariidae possuam dados citotaxonômicos (Takagui *et al.*, 2020). *Rineloricaria*, além de ser o gênero com mais espécies da família Loricariidae, possui espécies como *Rineloricaria lanceolata* com a peculiaridade da presença de polimorfismos cromossômicos que ocorrem de modo intrapopulacional, o que parece à primeira vista um paradoxo considerando o modo de vida do grupo. Dado o mistério que permanece a respeito de como a população do Córrego da Onça – MS se mantém em detrimento desta característica e quais são as consequências para os processos meióticos, pode-se considerar esta espécie relevante para estudos em Biologia Evolutiva.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente os indivíduos da espécie *Rineloricaria lanceolata* da população do Córrego da Onça – MS e investigar o polimorfismo cariotípico da espécie, inferindo sobre suas causas e estabilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o cariótipo da população de *Rineloricaria lanceolata* e do Córrego da Onça – MS;
- Investigar o comportamento de segregação na meiose de um citótipo com rearranjo cromossômico;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM DE INDIVÍDUOS

Foi realizada a coleta de 6 indivíduos da espécie *Rineloricaria lanceolata* (Figura 4) do Córrego da Onça – MS, no município de Coxim (18° 30' 23,9" S; 54° 40' 39,3" W), sendo que foram realizados 4 esforços de coleta, ocorrendo a última no mês de agosto de 2021. Este período foi marcado por seca atípica no Pantanal, tendo sido feitos esforços de amostragem em diferentes oportunidades, sendo que somente em uma campanha de campo foram capturados os exemplares constantes deste trabalho. A coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e foram realizadas sob a Licença SISBIO – 15115-1 (Anexo A). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Pesquisa da UEPG (CEUA – 0769342) (Anexo B). O uso de material genético foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN número A6F96AE). Os espécimes coletados foram depositados na coleção ictiológica do Museu do Capão da Imbuia de Curitiba – PR.

Figura 4. Exemplar de *Rineloricaria lanceolata* coletado no Córrego da Onça – MS.



Fonte: a autora.

4.2 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

As preparações foram feitas a partir dos tecidos de nadadeira, rim e gônadas obtidos dos espécimes para a obtenção de células somáticas e gaméticas. Para a preparação das nadadeiras, foi realizado o protocolo de Kalous *et al.* (2010) (Anexo C), que utiliza tecido em regeneração e se apresenta como a metodologia mais eficiente na obtenção de metáfases para este grupo. A preparação direta de rim e a preparação de gônadas foram realizadas de acordo com os protocolos de Moreira Filho & Bertollo (1990) (Anexo D) e Kligerman & Bloom, 1977, adaptado por Bertollo (1978) (Anexo E).

As lâminas foram feitas por meio de aspiração, fixadas e coradas com Giemsa a 10% diluído em tampão fosfato por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas em

água corrente e secas por *air-drying*. A observação foi feita em microscópio Olympus Bx41 e as metáfases encontradas foram fotografadas com câmera acoplada para a caracterização dos cariótipos e, no caso de preparações de gônada, caracterização da meiose com registro fotográfico de todas as fases, e contabilização e esquematização dos arranjos de gametas formados.

4.3 CITOGENÉTICA MOLECULAR

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada conforme o protocolo de Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas de rDNA 18S e 5s, além do Sat17 na identificação de cromossomos e regiões envolvidas em rearranjos cromossômicos. As sondas foram marcadas por PCR a partir de dois métodos: marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche) e detectadas com anti-digoxigenina rodamina (Roche); ou marcadas com biotina-14-dATP (Invitrogen) e detectadas por streptavidina Alexa flúor 488 conjugada (Invitrogen). A contracoloração das lâminas foi feita em DAPI (0,2 mg/mL) com *antifading* (Vector Laboratories, Burlingame, USA). A double FISH com sondas de 5S e Sat17 foram respectivamente marcadas com Atto550-dUTP (verde) e Atto488-dUTP (vermelho) respectivamente por nick translation (Jena Biosciences, Jena, Germany).

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

O tecido muscular foi destinado à extração de DNA com CTAB (Anexo F), que teve propósito tanto nas metodologias de citogenética molecular quanto de bioinformática a partir dos dados de sequenciamento. Com o DNA extraído, foram realizadas PCRs para amplificação de satélites de interesse para elaboração de sondas de FISH, sendo depois estes marcados em PCRs de marcação. O DNA total de um indivíduo da população de *R. lanceolata* foi enviado para sequenciamento massivo de nova geração (NGS) na plataforma BGISEQ-500 (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China) (paired-end 2x100pb).

4.5 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

A partir dos dados de sequenciamento de *Rineloricaria lanceolata* foram feitas as análises *in silico* para a montagem do satelitoma através do PARAM Shavak High-Performance Computing (Universidade Estadual de Ponta Grossa – NAPI/BioInfo). As sequências brutas foram pré-processadas com o Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), checadas pelos relatórios de qualidade do FASTQC e enviadas para a plataforma Galaxy (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>), tendo sido utilizadas as pipelines do RepeatExplorer2 e TAREAN (Novák *et al.*, 2020) para as etapas de clusterização, identificação e anotação de DNAs repetitivos, com ênfase nos satélites e elementos transponíveis. A mineração dos satDNAs foi realizada de acordo com o protocolo SatMiner (Anexo G) (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). A filtragem dos satDNAs encontrados foi feita a partir do software DeconSeq (Schmieder *et al.*, 2011), com sucessivas iterações das sequências remanescentes no RepeatExplorer2 até que não fossem encontrados mais satDNAs.

Com todos os satélites encontrados agrupados, foi realizada a anotação utilizando o software Geneious 2023.2 (Kearse *et al.*, 2012) em conjunto com Dimerator (DiaCarta) para remoção de famílias multigênicas. Em seguida, foi verificada a homologia entre os satélites a fim de classificá-los em famílias ou superfamílias conforme proposto por Ruiz-Ruano *et al.* (2016). O RepeatMasker (Smit *et al.*, 2017) foi utilizado com a função “cross_match” e modelo de Kimura 2-parâmetros para cálculo da abundância e divergência dos satélites no genoma. Foram encontradas 36 famílias de satDNA com comprimentos de monômero que variam de 17 a 2699 pb. A proporção de A+T nas famílias de satélites foi de 0,3667 a 0,7714 (Tabela 1).

Tabela 1. Características das famílias de DNA satélites encontradas em *Rineloricaria lanceolata*.

Satélite	Tamanho de Monômero	Abundância	Divergência	A+T
RlaSat01-55	55	0,002538109	9,08	0,6
RlaSat02-30	30	0,001778729	11,69	0,3667
RlaSat03-56	56	0,001735667	5,39	0,625
RlaSat04-45	45	0,001498782	6,12	0,5778
RlaSat05-482	482	0,000910710	2,51	0,3817
RlaSat06-34	34	0,000877623	10,78	0,5294

RlaSat07-34	34	0,000653857	6,05	0,6471
RlaSat08-73	73	0,000571909	5,41	0,6575
RlaSat09-2699	2699	0,000532014	4,68	0,5950
RlaSat10-55	55	0,000432426	5,6	0,5636
RlaSat11-40	40	0,000385061	10,8	0,5
RlaSat12-66	66	0,000348504	5,74	0,6818
RlaSat13-432	432	0,000292688	10,03	0,5926
RlaSat14-779	779	0,000266922	6,6	0,6252
RlaSat15-45	45	0,000239250	4,31	0,6667
RlaSat16-35	35	0,000196332	7,43	0,6857
RlaSat17-1328	1328	0,000185489	3,34	0,6160
RlaSat18-29	29	0,000180374	12,05	0,6207
RlaSat19-50	50	0,000163912	4,71	0,7
RlaSat20-41	41	0,000163594	4,72	0,5610
RlaSat21-57	57	0,000142009	7,9	0,5614
RlaSat22-95	95	0,000141728	8,43	0,6316
RlaSat23-42	42	0,000137725	8,71	0,5476
RlaSat24-52	52	0,000137164	7,07	0,5385
RlaSat25-35	35	0,000132111	18,51	0,5714
RlaSat26-24	24	0,000132093	7,85	0,5833
RlaSat27-48	48	0,000125995	8,84	0,6458
RlaSat28-33	33	0,000119062	7,37	0,5455
RlaSat29-45	45	0,000117091	4,97	0,6444
RlaSat30-185	185	0,000113211	10,3	0,5405
RlaSat31-56	56	0,000110154	4,05	0,6607
RlaSat32-62	62	0,000106979	5,03	0,7419
RlaSat33-73	73	8,34E-01	4,63	0,4110
RlaSat34-33	33	8,21E-01	5,6	0,6364
RlaSat35-17	17	8,12E-01	10,5	0,6471
RlaSat36-35	35	7,56E-01	11,1	0,7714

O desenho dos primers de satélites de interesse foi feito com auxílio do Geneious 2024.0 Free Trial e ferramenta Multiple Primer Analyser (ThermoFischer) com a finalidade de elaboração de sondas para FISH. A seleção foi realizada através de anotação manual nas tabelas de cluster geradas pelo RepeatExplorer e relatórios do TAREAN, buscando satélites com maior proporção no genoma e elementos transponíveis com potencial envolvimento em rearranjos como a superfamília Tc1/Mariner. Entre os primers de satélites e elementos transponíveis utilizados, apenas o primer do satélite Sat17 gerou resultados relevantes, sendo um marcador presente em um par de cromossomos com segregação mendeliana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO: EXPLORING CHROMOSOMAL POLYMORPHISM AND EVOLUTIONARY IMPLICATIONS IN *RINELORICARIA LANCEOLATA* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): INSIGHTS FROM MEIOTIC BEHAVIOR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

(Aceito para publicação na Revista Biology)

Vanessa Isabel Batista de Moraes, Juliane Vida Lemos de Oliveira, Alessio Alesci, Mara Cristina de Almeida, Roberto Ferreira Artoni

Simple summary: The genus *Rineloricaria* of Neotropical armored catfishes has several species with chromosomal polymorphism, which is where individuals of the same population have different numbers of chromosomes and chromosome structures. This characteristic affects how these fish reproduce and adapt, but we don't fully understand its role in the evolution of this fish group. This study looks at *Rineloricaria lanceolata*, a species known for its chromosome polymorphism. It aims to understand how these different karyotypes arise and how individuals with different karyotypes can still produce offspring even when there is an imbalance in gamete generation. We used one individual as a model to find out how the karyotype was created. It turned out that two chromosomes from different pairs fused together to form a third larger chromosome. This resulted in an odd number of chromosomes, which led to different combinations of gametes being formed in meiosis because of how the chromosomes paired.

Abstract: Chromosomal polymorphism is a significant aspect of population genetics, influencing the adaptation and evolution of species. In *Rineloricaria lanceolata*, a Neotropical fish species, chromosomal polymorphism has been observed, yet the underlying mechanisms and evolutionary implications remain poorly understood. This article aims to investigate the chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata*, focusing on elucidating the meiotic behavior of karyotypic variants and tracing the phylogenetic origins of this polymorphism within the genus. By employing molecular markers and cytogenetic techniques, we aim to uncover the

mechanisms driving chromosomal rearrangements and their potential role in speciation and adaptation. Understanding the genetic basis of chromosomal polymorphism in *R. lanceolata* not only contributes to our knowledge of species evolution but also holds implications for the conservation of genetic diversity within this vulnerable group of Neotropical fishes.

Keywords: Chromosomal rearrangements; Robertsonian translocation; meiosis; rDNA; repetitive DNA.

Introduction

Chromosomal polymorphism is a population attribute adhering to Ford's definition (1940), 'The occurrence together in the same habitat of two or more discontinuous forms, or phases, of a species in such proportions that the rarest of them cannot be maintained merely by recurrent mutation'. This can involve both the number and structure of chromosomes. Such variations may occur naturally and have implications for the adaptation and reproduction of organisms.

Polymorphism-generated variation can enhance genetic diversity, which serves as the raw material for evolution. In response to environmental changes, certain karyotypic variants may confer adaptive advantages, enabling individuals carrying them to achieve greater reproductive success and pass on their genes more frequently to the next generation. Conversely, karyotypic polymorphism can lead to segregation issues in gamete formation, resulting in offspring with genetic anomalies, akin to well-known chromosomal syndromes in humans (for a review dataset in OMIM, 2023).

Teleosts are widely distributed globally and extremely diverse, with over 30,000 known species (Nelson *et al.*, 2016). Reports of chromosomal polymorphisms in this vertebrate group are abundant (Galetti *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009; Gornung, 2013; Ocalewicz, 2013; Sandkam *et al.*, 2021). The threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) is a notable example, exhibiting chromosomal polymorphism with variations in chromosome number and sex determination systems among different populations. These variations have significant implications for the adaptation and evolution of this species in various aquatic environments (Liu *et al.*, 2022). Salmonids, representing a family of ecologically and economically important fishes, are well-known for their broad karyotypic variation due to chromosomal polymorphisms (Gaffaroglu *et*

al., 2020). Recent genomic studies have aimed to link chromosomal variations to adaptation, particularly in Atlantic salmon (*Salmo salar*). A variant chromosomal translocation is strongly correlated with temperature in a population of *S. salar* in Canada (Watson *et al.*, 2022). This suggests that Robertsonian polymorphisms plays a role in the local adaptation of Atlantic Salmon to specific environments.

An interesting group of Neotropical fishes, the *Rineloricaria* Bleeker, 1862, comprises 71 valid species (Fricke; Eschmeyer, 2024), with polymorphic and non-polymorphic populations regarding karyotypic formulae in various species (Takagui *et al.*, 2020). These small armored catfishes form population demes in small streams, and some are rheophilic species associated with fast-flowing streams (Urbano-Bonilla *et al.*, 2023), widely distributed in South American rivers (Rodriguez; Reis, 2008; Vera-Alcaraz *et al.*, 2012). Despite being considered a diverse group with complex taxonomy, molecular studies have suggested they form a monophyletic group (*Figure 2 of dissertation*) (Costa-Silva *et al.*, 2015; Covain *et al.*, 2016). Several species/populations have been characterized with karyotypic variation attributed to Robertsonian structural rearrangements (Giuliano-Caetano, 1998; Porto *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2014). Furthermore, this karyotypic variation is not fully elucidated, with no investigation conducted at the level of meiotic chromosomes or understood within the phylogeny of *Rineloricaria* (Covain *et al.*, 2016).

The origin and mechanisms involved in karyotypic variation in *Rineloricaria* remain an open question. The use of molecular markers at the chromosomal level, especially through *in situ* localization of repetitive sequences, has indicated the occurrence of centric fusions (Rosa *et al.*, 2012; Primo *et al.*, 2016; Glugoski *et al.*, 2022). Rosa *et al.* (2012) identified the occurrence of Interstitial Telomeric Sites (ITS) associated with the location of 5S rDNA on chromosomes of *R. lima*. Based on these findings, the authors suggest that ribosomal DNA could play a role as a breakpoint facilitator for chromosomal fusion. Similar evidence was found in *R. pentamaculata* (Primo *et al.*, 2016), additionally verifying the enrichment of these chromosomal regions with microsatellites (CA)_n and (GA)_n (Glugoski *et al.*, 2022). It has recently been demonstrated that in *R. latirostris*, besides the presence of rDNA sequences at possible chromosomal breakpoints, A/G-rich microsatellites and sequences of the hAT retrotransposon are also present in these chromosomal sites (Glugoski *et al.*, 2018).

Studying these populations with chromosomal polymorphism contributes to a better understanding of the genetics and evolution of species, as well as the conservation of genetic diversity in vulnerable groups. Thus, our objective is to deepen knowledge about the chromosomal polymorphism described for *R. lanceolata*, especially regarding the meiotic behavior of a karyotypic variant and the phylogenetic origins of this feature in the genus.

Materials and Methods

Ethics statement

Fish collections were authorized by Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBIO - SISBIO-Licence number 15115-1), and the experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the use of the Animals for Research at UEPG (CEUA Process number 0769342/2021). The use of the genetic data in this study was authorized by the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN number A6F96AE).

Sampling

Six individuals (three females and three males) of *Rineloricaria lanceolata* from the Onça stream, a tributary of the Taquari river (Coxim, MS, Brazil: 18°30'23,9" S; 54°40'39,3" W) were analyzed (Fig 1, in detail). All individuals were identified by morphological and barcode DNA criteria, and voucher specimens were deposited in the fish collections of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, PR, Brazil (MHNCI), under the number MHNCI 12861.

Chromosome preparations and DNA extraction

Mitotic chromosomes were obtained from the incomplete regeneration of the animals' dorsal fin, following the protocol by Kalous *et al.* (2010). The meiosis of a male individual was performed without prior application of intraperitoneal colchicine according to Bertollo *et al.* (1978). Images were captured with an AXIOCAM MRm camera in grayscale, a Zeiss AXIO IMAGER A2 microscope (Carl Zeiss, Germany), and then processed with ZEN PRO 2011, and the karyotypes were assembled using the Adobe Photoshop demo version. For each animal, at least 30 metaphase spreads were examined to validate the 2n and karyotype.

To characterize meiotic segregation, 30 cells were counted in meiosis II from a male individual with 2n=47 chromosomes. The Chi-square test ($\alpha=0.05$) was performed to establish whether the haplotypes had the same frequency of formation in meiosis (H0) or some deviation favoring a certain type of segregation (H1). Chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) or acrocentric (a) according to arm ratios (Levan *et al.*, 2009).

Genomic DNA was extracted from the liver of all species according to Sambrook & Russel (2001). DNA quality was analyzed on a 1% agarose gel electrophoresis and with a NanoVueTM UV/Vis spectrophotometer. Before the procedures, the animals were sacrificed with clove oil (Eugenol) overdoses following international best practice recommendations for the use of animals in research.

Whole-genome sequencing (WGS) and satellite DNA identification

Total DNA samples underwent next-generation sequencing (NGS) on the BGISEQ-500 platform (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China) (paired-end 2x100pb configuration). Genomic coverage was approximately 0,7x considering the size of 1,56 Gb from reference genome of *Rineloricaria parva*. The sequence referring to RlaSat17-1328 was deposited on GenBank database under access number PP336777.

In silico analyses were conducted in PARAM Shavak High-Performance Computing (State University of Ponta Grossa HPC project - NAPI/BioInfo <https://www.araucaria.pr.gov.br/napi-bioinformatica/>). Pre-processing of raw data was initially done with Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) for cropping and quality filtering of reads of Q>20, which were then checked through FastQC reports. The files containing sampling of library sequences were generated using command “rexp_prepare.py” and submitted to Galaxy platform (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>) for clustering and repetitive DNA characterization on RepeatExplorer2, TAREAN pipelines (NOVÁK *et al.*, 2020). Mining was done accordingly to SatMiner protocol (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016); filtering of the initial satellites encountered was done using software DeconSeq (Schmieder; Edwards, 2011) and the remaining sequences passed through a new RepeatExplorer clustering. The iteration of filtering and clustering occurred until no more satellites were found.

Further annotation of satDNAs was done using Geneious 2023.2 (<https://www.geneious.com>) and Dimerator (DiaCarta) softwares in order to search and remove homologue sites of multigene families. All satDNAs remaining were then characterized into variants, families and superfamilies and named based off Ruiz-Ruano *et al.* (2016): sequences with at least 95% similarity were considered the same satellite; sequences from 80-95% similarity and similar size were considered families or variants; and groups with 50% or more similarity were classified as superfamilies. Afterwards, RepeatMasker (Smit *et al.*, 2010) was used with CrossMatch option and Kimura 2-parameter model in order to estimate abundance and divergence of each satellite in the genome.

Manual analysis of clustering table generated by RepeatExplorer protocol and TAREAN reports were done in order to select satDNA sequences, of which RlaSat17-1328 was identified as a marker of interest for comparison with the 5S marker due to its labeling pattern in a single bivalent. Subsequently, primers were designed aimed at the development of probes for chromosomal mapping by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) using Geneious 2023.2 and evaluated using Multiple Primer Analyzer tool (Thermo Fisher Scientific).

Chromosome banding and FISH

The FISH procedure was conducted according to Pinkel *et al.* (1986), under high stringency conditions, employing a 5S rDNA probe cloned from *Leporinus* (1999) labeled with digoxigenin-11-dUTP and detection using anti-digoxigenin rhodamine (Roche, Mannheim, Germany). Double FISH slides were prepared following the protocol with minimal adjustments, using probes for 5S rDNA and Sat17 respectively labeled with Atto550-dUTP (green) and Atto488-dUTP (red) through Nick Translation (Jena Biosciences, Jena, Germany).

For double FISH, slides were incubated for one hour at 60°C, followed by treatment with 0.005% pepsin at 37°C for 5 minutes. Chromosomes were then denatured in 70% formamide/2x SSC at 72°C for 3 minutes. Simultaneously, probes were heated at 85°C for 10 minutes and then cooled to 4°C for 2 minutes. Hybridization mixes were composed of 50ng of labeled DNAs, 50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate, and Denhardt's solution (pH=7.0), making a total volume of 20µl. Hybridization took place overnight in a dark chamber at 37°C. On the second day of the protocol, slides were washed for 5 minutes in 1x SSC at 65°C and in 4x SSC/Tween at room temperature, followed by a 1-minute wash in 1x PBS. After dehydration in an alcohol series, slides were mounted with DAPI and Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

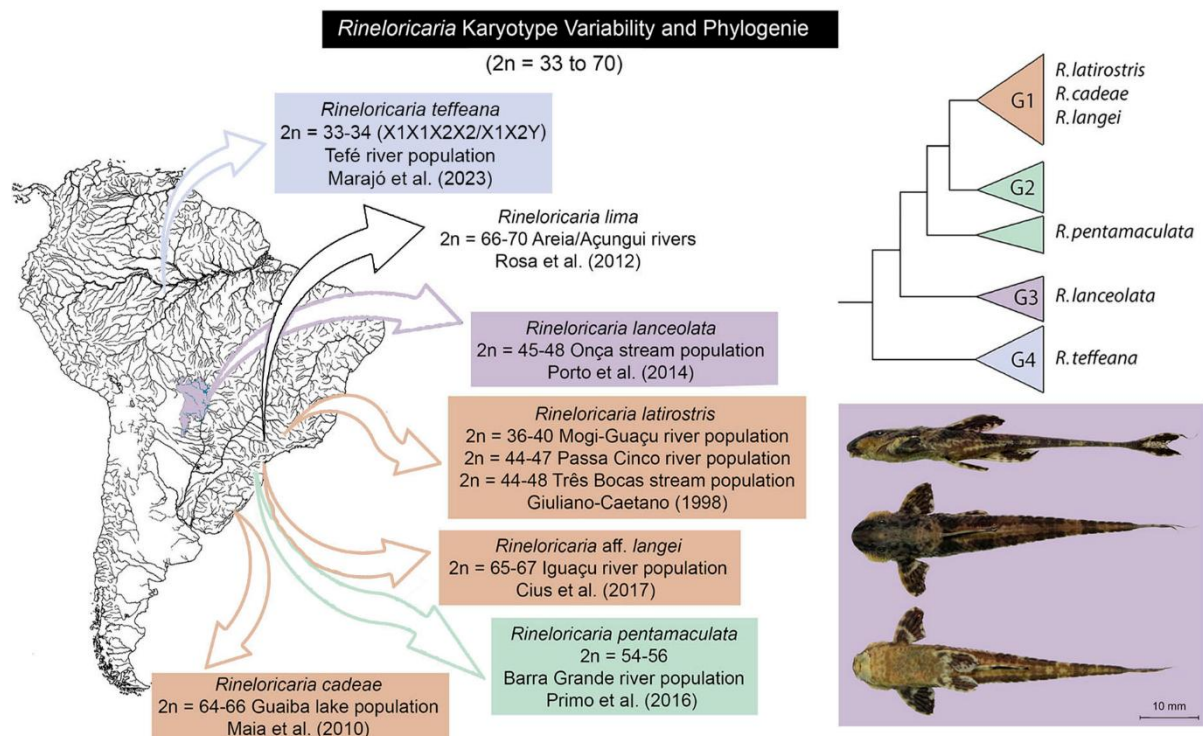
Results

The karyotype of six individuals of *R. lanceolata*, one of the polymorphic species of the genus (Figure 1), was mounted for identification of cytotype variation. The diploid number ranged from $2n=45$, 46 and 47, with FN varying between 48 and 52 (Table 2). All individuals had different cytotypes. Three individuals presented a diploid number of $2n=47$ chromosomes, and among these, three different cytotypes were determined: Cytotype A ($2m + 2sm + 2st + 41a$, NF=51); Cytotype B ($4m + 1sm + 2st + 40a$, NF=52); and Cytotype C ($2m + 2sm + 2st + 41a$, NF=51). In Cytotype B, the presence of a large submetacentric chromosome relative to the chromosomes of

the complement that had not yet been described for the different cytotypes of the species was observed, possibly representing a new chromosomal variation. Two individuals had a diploid number of $2n=46$ with distinct cytotypes: Cytotype D ($1m + 4sm + 2st + 39a$, $NF=51$) and Cytotype E ($2m + 2sm + 2st + 40a$, $NF=50$). Only one individual presented a diploid number of $2n=45$ chromosomes with Cytotype F ($2m + 1sm + 2st + 40a$, $NF=48$).

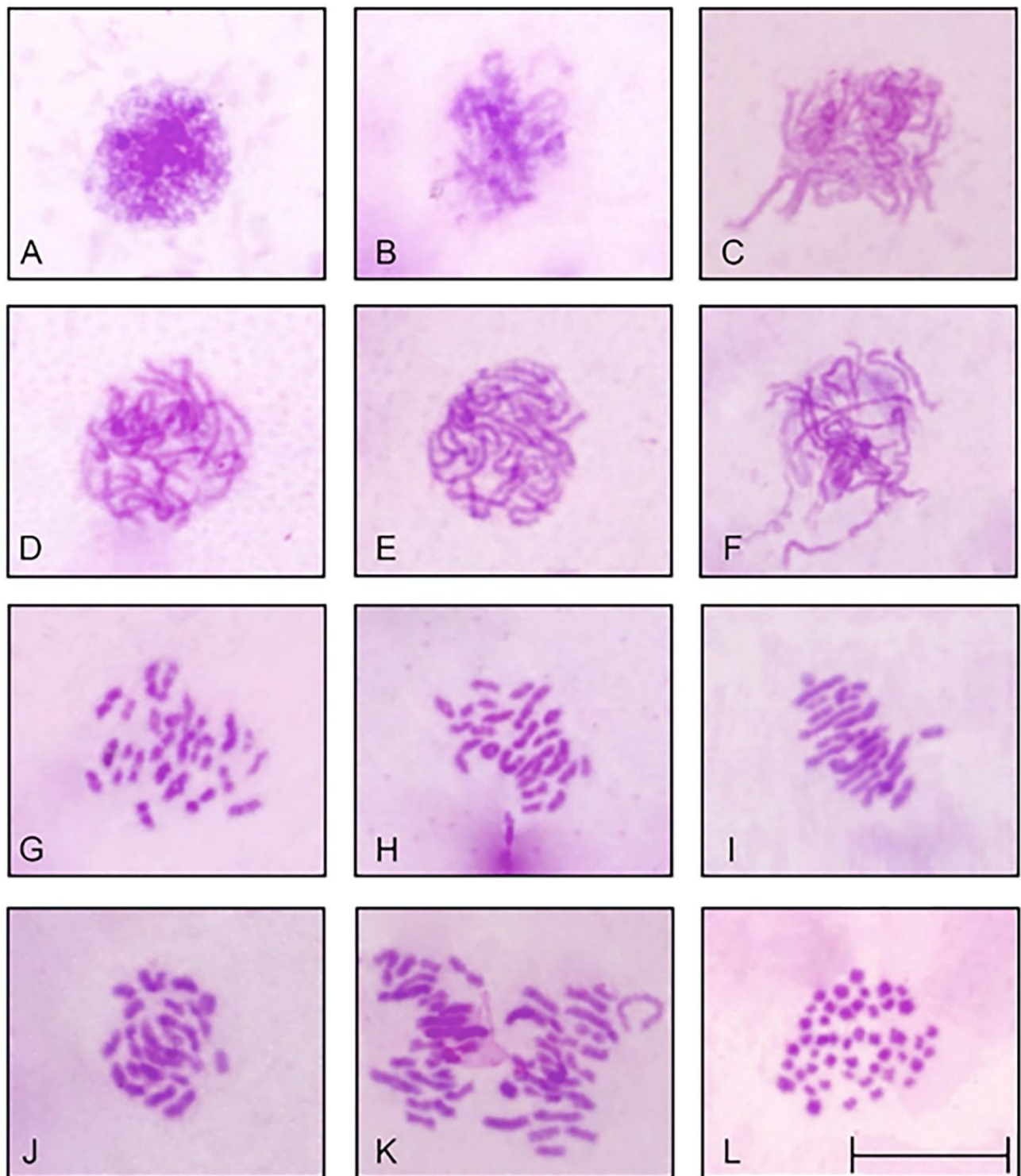
Slides were prepared with Giemsa staining (Figure 2) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Figure 3) for analysis of chromosome preparations from fin and gonad of the cytotype B individual ($2n=47$). From the material it was possible to locate the pairing of a trivalent in metaphase, following the karyotypic association ($22II+1III$). FISH methodology also revealed that two of the chromosomes in the trivalent configuration were marked with the rDNA 5S probe and have distinct morphologies, one being submetacentric and one acrocentric, evidencing chromosomal rearrangement. The unconventional segregation of the trivalent when compared to a bivalent marked with the RlaSat17-1328 satellite probe was shown in Figure 4.

Figure 1. Chromosomal polymorphisms are described in populations of the genus *Rineloricaria* in different locations in Brazil.



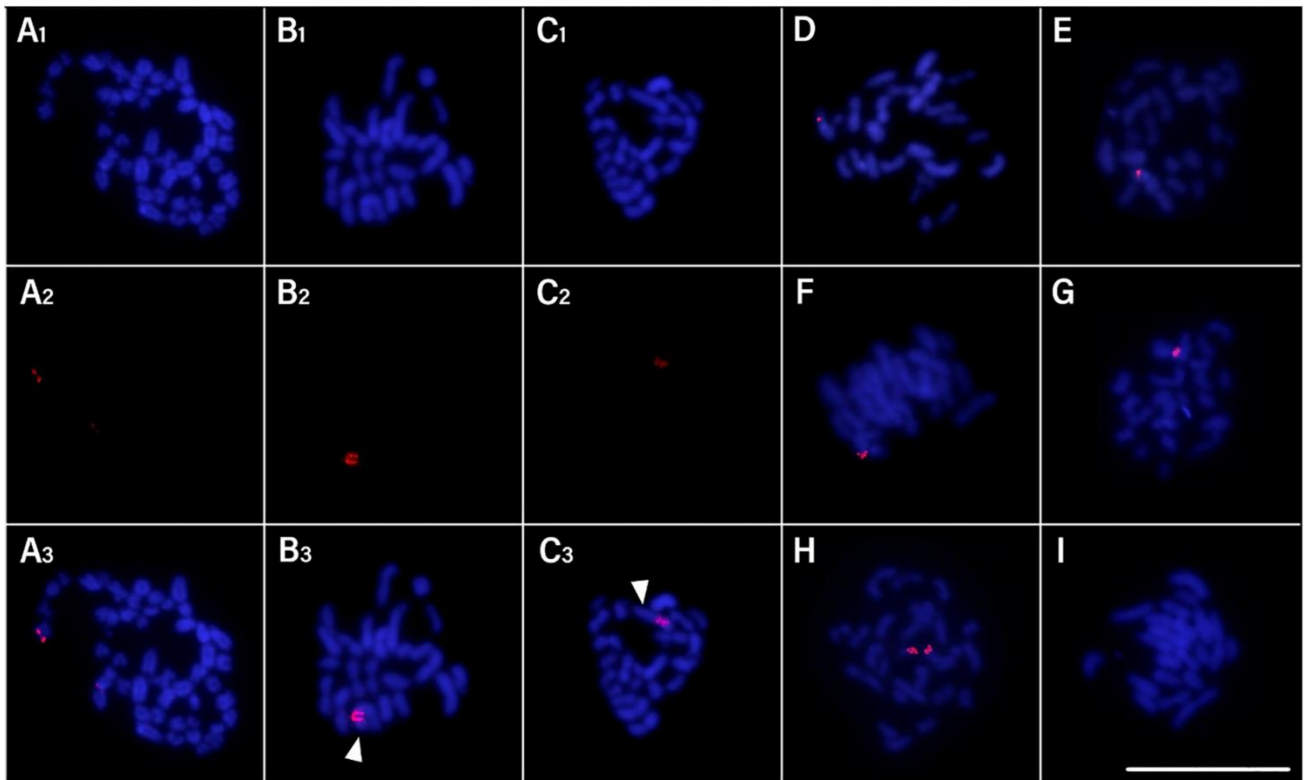
Source: the author.

Figure 2. *Rineloricaria lanceolata* meiotic cells with conventional staining (Giemsa), $2n=47$.



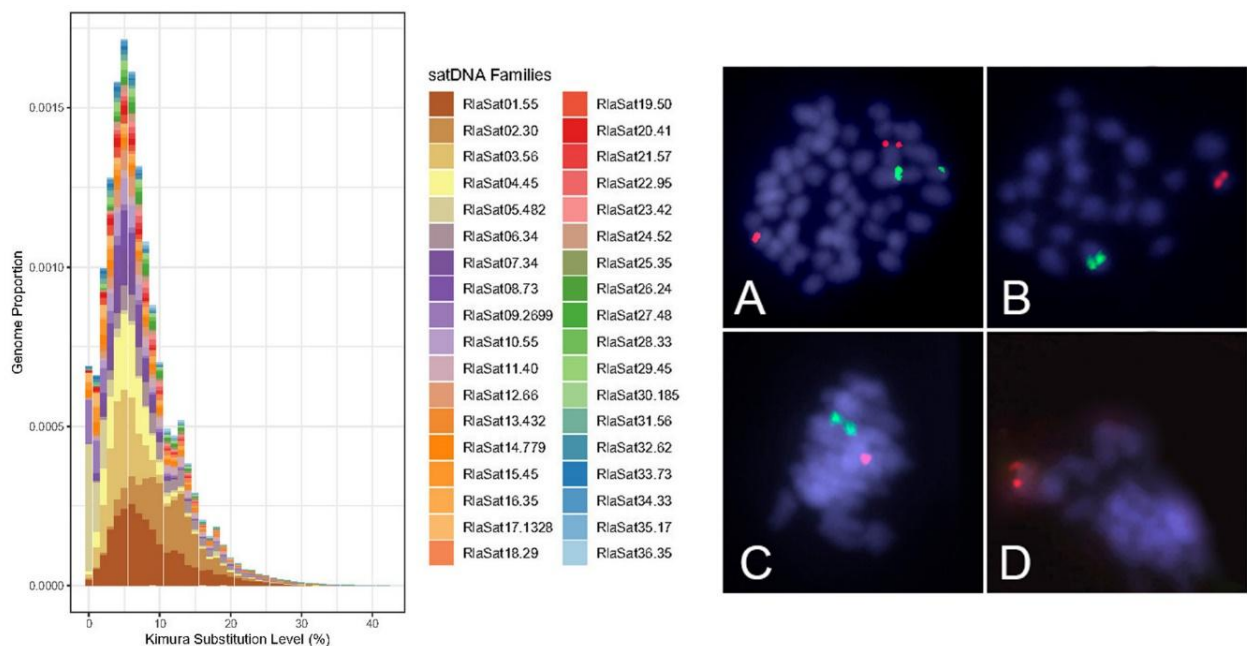
The dynamics of the gonadal cells of an adult male in meiotic division highlight the regularity of gamete formation, even though this individual has an odd diploid number. The karyotypic variants made possible by this process are shown in the idiogram in figure 5. A. Interphasis. B. Zygotene. C, D, E and F. Pachytene. G. Diplotene. H. Diacinesis. I and J. Metaphasis I K. Metaphasis I (two cells). L. Mitotic metaphasis. Scale: 10 μ m. Source: the author.

Figure 3. *Rineloricaria lanceolata* cells of the individual with $2n=47$ chromosomes with fluorescence in situ hybridization (FISH) using rDNA 5S probe (red) and DAPI counterstain.



A. Mitotic metaphase. B and C. Meiotic metaphase. D, E, F, G, H, I. All gamete segregation possibilities with emphasis on rearrangement-involved chromosomes during meiosis II are shown. Arrows: trivalent chromosomes paired in different positions during meiosis I. Scale: $10\mu\text{m}$. Source: the author.

Figure 4. Satellitome abundance and divergence profile data (left) and trivalent segregation highlighted by 5S probe (green) in contrast to bivalent conventional segregation shown with RlaSat17-1328 (red) in double FISH.



A. Mitotic metaphase. B. Meiotic metaphase ($n=23$) with presence of submetacentric marked with 5S. C. Meiotic metaphase with both chromosomes marked with 5S. D. Meiotic metaphase with 5S marks absent. Note the satellite marked chromosome regularly present from B-D meiosis. Source: the author.

Table 2. Cytogenetic data found for study individuals.

Cytotype	2n	Karyotype formula	FN
A	47	2m + 2sm+ 2st + 41a	51
B	47	4m + 1sm + 2st + 40a	52
C	47	2m + 2sm + 2st + 41a	51
D	46	1m + 4sm + 2st + 39a	51
E	46	2m + 2sm + 2st + 40a	50
F	45	2m + 1sm + 2st + 40a	48

FN: fundamental number. Source: the author.

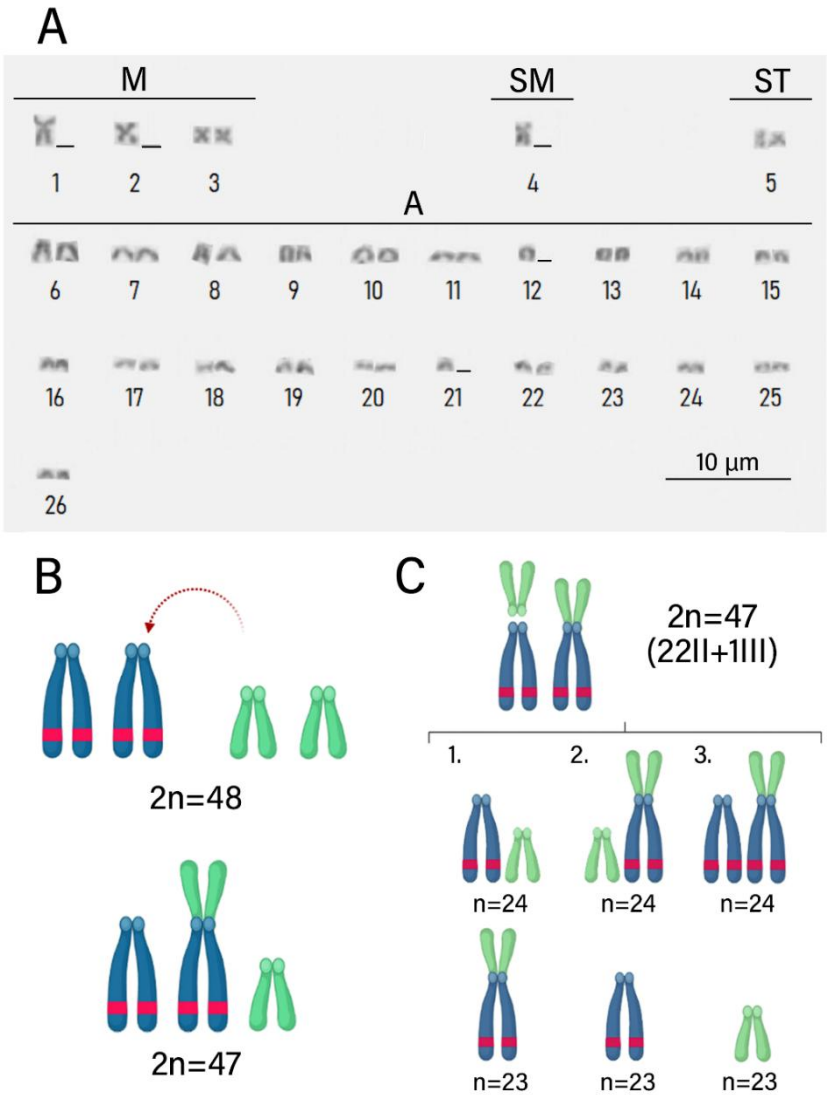
Analysis of mitotic and meiotic metaphases from FISH slides was done to locate the involved chromosomes involved in rearrangement events and segregation behavior of those chromosomes during meiosis (Figure 5). According to scheme in Figure 5 and the meiotic metaphases in Figure 3, the chromosomal segregation was comprised of six different haplotypes, with half of the possibilities having n=23 and the other half having n=24 chromosomes, and quantity of chromosomes with 5S markings ranging from 0 to 2. Table 3 presents the results of metaphase counting and Chi-square test, which did not show a significant value ($X^2 = 2.8 < X^2_c = 11.07$), supporting the null hypothesis that the haplotypes have the same frequency.

Table 3. Observed Frequency of gamete segregation possibilities in meiosis II cells (n=30) and Chi-Square ($\alpha = 5\%$).

Segregation Type	Observed Frequency
1A	5
1B	3
2A	5
2B	4
3A	8
3B	5
Total	30
$X^2_{calc} = 2,8 < X^2_c = 11,07$	

X^2_{calc} : calculated Chi-square. X^2_c : tabled Chi-square. Source: the author.

Figure 5. New cytotype of *Rineloricaria lanceolata* originated from centric fusion and its consequences on meiosis.



A. Karyotype of B cytotype of a male individual, $2n=47$. B. Origin of submetacentric chromosome through centric fusion. C. Possibilities of gamete segregation during meiosis II of the chromosomes involved in studied rearrangement. Source: the author.

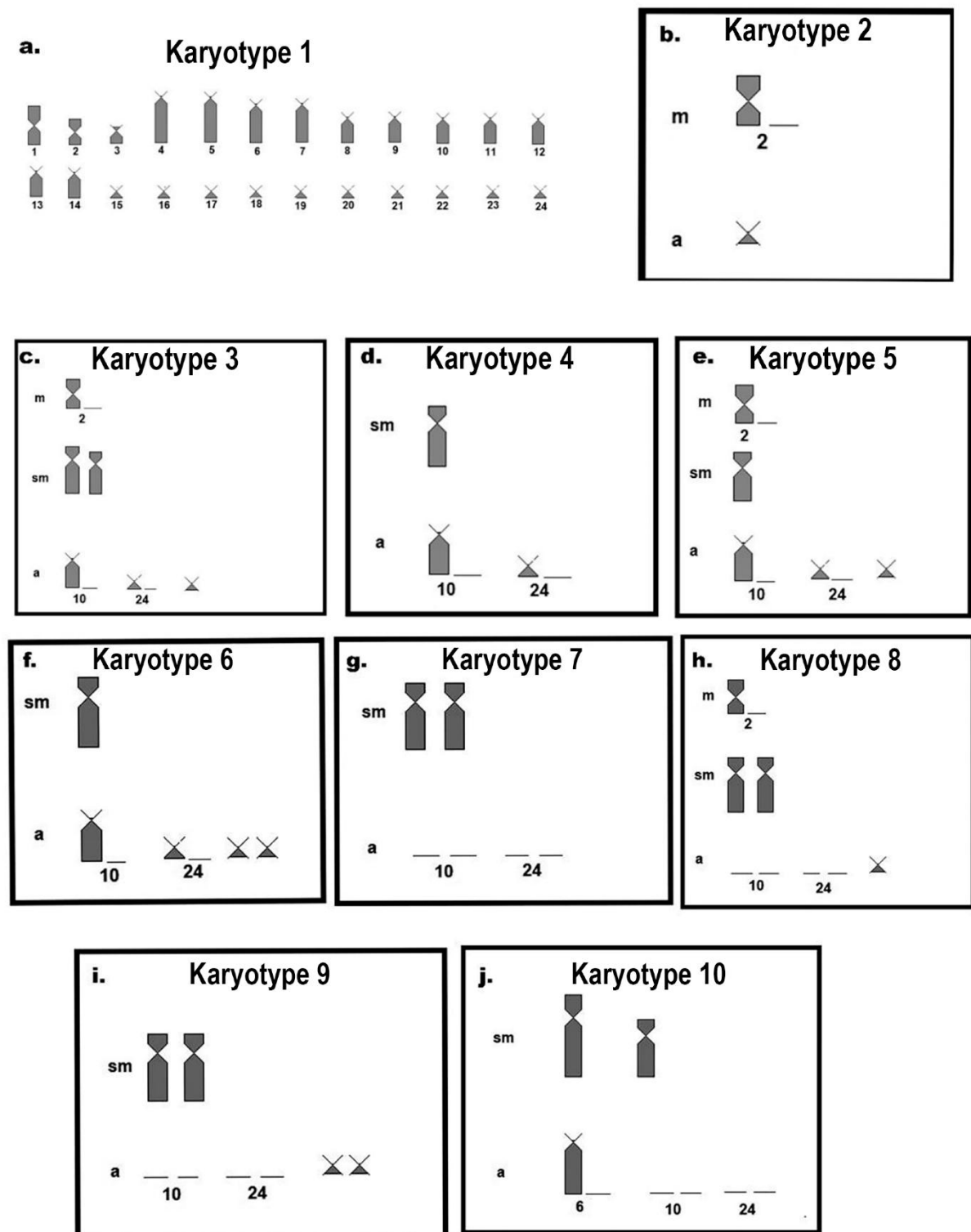
Discussion

Our study confirmed the presence of biarmed chromosomes in the predominantly acrocentric karyotype of *R. lanceolata*, reflecting a polymorphism where karyotypic variations are found in natural populations. The present description of a new variant (cytotype B, with a new large submetacentric without a homolog) suggests the involvement of other chromosomes in Robertsonian rearrangements in this species.

The diploid numbers $2n=45$, 46, and 47 found fixed in different individuals corroborate the findings of Porto *et al.* (2014). Differences were found in the karyotypic formulas given to the number of chromosome arms (NF, fundamental number), which reinforces the insight that chromosomal rearrangements are more complex in this species/population.

The suppression of meiotic recombination attributed to chromosomal translocations is required as an important factor in karyotypic diversification and, reflected in speciation, given the infertility rate of hybrids in gamete formation (Brown; O'Neill, 2010). On the other hand, at the intraspecific level, our results indicate that the occurrence of a large number of karyotypic variants in the population of *R. lanceolata* from Rio Coxim, Mato Grosso do Sul, Brazil (at least 10 cytotypes described, Figure 6), dismisses the occurrence of gamete drive. In the meiosis of the individual with cytotype B, we were able to observe the occurrence of a trivalent in pachytene and follow it into metaphase I, as well as locate it in mitotic metaphases by fluorescent *in situ* hybridization with 5S rDNA probe. FISH marking allowed us to propose that submetacentric chromosome n. 4 is derived from a Robertsonian rearrangement between two acrocentrics, one of which shares the same marking with 5S rDNA. Although not directly involved in the recombination site involved in the rearrangement, the 5S rDNA serves in this case as an important marker since it is shared only among chromosomes that have undergone this event.

Figure 6. Cytotype ideograms found by Porto *et al.* (2014).



A. Cytotype 1 with $2n=48$, karyotypic formula: $4m + 2st + 42a$, $NF=54;13$ B. Variation found in cytotype 2, with absence of one of homologues of metacentric pair 2 and the presence of a small acrocentric chromosome; C. In cytotype 3, absence of one of homologues of metacentric pair 2, presence of a pair of medium submetacentric chromosomes, absence of one homologue of acrocentric pairs 10 and 24, and the presence of a small acrocentric chromosome; D. Cytotype 4, with presence of a medium submetacentric chromosome and absence of one of the homologs of acrocentric pairs 10 and 24; E. Cytotype 5, with absence of one of the homologues of metacentric pair 2, a medium submetacentric

chromosome, absence of one of the homologues of acrocentric pairs 10 and 24, and a small chromosome. F. Variation found in cytotype 6, with a medium submetacentric chromosome, and absence of one of the homologues of acrocentric pairs 10 and 24, and a pair of small acrocentric chromosomes; G. Cytotype 7, a pair of medium submetacentric chromosomes, and absence of homologous pairs of acrocentric chromosomes 10 and 24; H. Cytotype 8, absence of one of the homologues of metacentric pair 2, a pair of medium submetacentric chromosomes, absence of homologous pair of acrocentric chromosomes 10 and 24, and a small acrocentric chromosome; I. Cytotype 9, a pair of medium submetacentric chromosomes, absence of homologous pairs of acrocentric chromosomes 10 and 24, and the presence of a pair of small acrocentric chromosomes; J. Cytotype 10, a large and a medium submetacentric chromosome, absence of one of the homologues of acrocentric pair 10, and absence of homologous pairs 10 and 24. Source: adapted from Porto *et al.*, 2014.

The combination of possible gametes formed by cytotype B (Figures 5B and C) and a hypothetical cross with a more conserved karyotype with predominantly acrocentric chromosomes would form karyotypic variants already described for this species in nature. These results suggest that populations of *Rineloricaria* experience karyotypic variation as balanced polymorphisms, as a strategy for maintaining genetic variability in populations with restricted gene flow. Similar karyotypic variation is often reported for other species of the genus *Rineloricaria*, such as in *R. candeeae* (Alves *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2010), *R. kronei* (Alves *et al.*, 2003; Venturelli *et al.*, 2021), *R. latirostris* (Giuliano-Caetano, 1998; Primo *et al.*, 2018; Glugoski *et al.*, 2018), *R. lima* [19], *R. pentamaculata* (Porto *et al.*, 2011; Primo *et al.*, 2016) and *R. lanceolata* (Porto *et al.*, 2014)(Figure 1).

The intrapopulational maintenance of karyotypic polymorphisms remains an intriguing question, given the inherent disadvantages of producing inviable gametes, especially aneuploids, in populations with a small number of individuals. The study by Buj *et al.* (2022) with fish of the genus *Telestes* located in Croatia shares a similarity in that, similarly to *Rineloricaria*, they are found in water bodies whose hydrography has led to the formation of isolated populations with a low number of individuals. The study of genetic diversity in these species and populations showed that most populations had a high degree of diversity comparable to that found in large populations. One hypothesis to explain this event is described in the model proposed by Labar & Adami (2017), which indicates the predominance of balancing selection in small populations and introduces the concept of "resistance to genetic drift". While populations with a reduced number of individuals tend to maintain different traits, including mutations that may be slightly negative and decrease adaptive value, this decrease in the effect of genetic drift preserves genetic variability. The developed

model also shows that, after reaching a point where there is a balance of drift effect and the fixation of a considered positive trait, there is also a tendency to fix deleterious mutations, consequently decreasing the adaptive value of the population and returning to a state of resistance to genetic drift. This phenomenon could explain the occurrence of karyotypic polymorphisms in various species of *Rineloricaria*, given the characteristics of their populations.

The occurrence of karyotypic polymorphism attributed to Robertsonian events occurring in different species and populations of *Rineloricaria*, when confronted with the available phylogeny for these fishes, evokes the recurrence of homoplasies. All internal clades established by Covain *et al.* (2016), represented by the letters G1, G2, G3, and G4 (*Figure 2 of thesis*), present species with polymorphism and also with stable karyotypes. However, our understanding is that this is a bias caused by the hard interpretation from different areas of science. Even though it is a variable character at the population level and, as such, cannot be considered a good phylogenetic marker *per se* (Platnick *et al.*, 1991), the occurrence of karyotypic polymorphism in this genus requires a more parsimonious interpretation. We hypothesize that the underlying mechanisms of karyotypic instability (Robertsonian translocations) are ancestral in *Rineloricaria* and that, in certain situations, they are activated or deactivated.

Some authors have sought to attribute the breakpoints and centric fusions in different species of these fishes, but there is no consensus on the effective participation of moderately repetitive DNA such as ribosomal 5S (Rosa *et al.*, 2012; Primo *et al.*, 2018; Glugoski *et al.*, 2018) and 18S (Primo *et al.*, 2016), heterochromatin rich in satellite DNA or telomeric sequences (Porto *et al.*, 2014; Glugoski *et al.*, 2022), or even the participation of pseudogenes and transposons (Primo *et al.*, 2018; Glugoski *et al.*, 2018). Given this open question, we think that the diversifying mechanism (hot spots of chromosomal recombination by translocation), active or not, is what should be understood as the phylogenetic trait in the case of *Rineloricaria*.

Even for the most emblematic example of karyotypic evolution mediated by centric fusions, the case of the Muntjac (Cervidae), it is still not fully elucidated in its origins and molecular mechanisms. Recently, a significant advancement was made by Yin *et al.* (2021), in understanding the impact of centric fusions on the 3D chromatin architecture and the underlying molecular mechanisms of these rearrangements in muntjac deer. These authors suggest, based on high-density genomes associated with

Hi-C mappings, that the centric fusion rearrangements experienced in different Muntjac species are conserved (TADs, topologically associated domains) and have been facilitated by the presence of a complex repeat structure that led to illegitimate recombinations between non-homologous chromosomes and, consequently, recurrent chromosomal fusions

In *Rineloricaria*, is imperious to investigate the chromosomes or segments involved in rearrangements through chromosome painting, as well as to unravel the molecular and, perhaps, epigenetic mechanisms involved. The importance of chromosomal territories (TADs) in the nucleus due to the eventual proximity of the chromosomes involved in such translocations is not ruled out here. The fact is that this is a fascinating scenario for understanding both the maintenance of these polymorphic populations in nature and the adaptive value of different cytotypes.

Conclusions

In summary, our study on karyotypic variations in *Rineloricaria lanceolata* reveals the complexity of karyotypic evolution in this species. Robertsonian rearrangements play a fundamental role in generating karyotypic diversity and maintaining balanced polymorphisms within these populations. The preservation of genetic variability, despite potential disadvantages in producing inviable gametes, suggests the operation of balancing selection in small populations. Further investigation into the molecular mechanisms involved is essential for fully understanding karyotypic evolution in *Rineloricaria* and calls for caution in its phylogenetic interpretation.

References

References cited in this article are listed at the end of the dissertation.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Mostra-se necessário o emprego de metodologias de bioinformática para estudo do papel de DNAs repetitivos na ocorrência de rearranjos cromossômicos e entendimento dos mecanismos que permitem a manutenção dos polimorfismos em diversas populações de espécies do gênero *Rineloricaria*. A identificação taxonômica a nível molecular utilizando o mitogenoma é relevante, considerando que na região existem outras espécies em simpatria.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação dos polimorfismos cromossômicos da população de *Rineloricaria lanceolata* do Córrego da Onça – MS compunha o foco principal deste trabalho. Com a caracterização citogenética de seis indivíduos da população, foi encontrado um citótipo inédito que foi utilizado como modelo para estudo de meiose. Foi observada a formação de trivalente, que associada à marcação 5S em cromossomos de morfologia distinta – um acrocêntrico e um submetacêntrico – indicou a ocorrência de uma fusão cêntrica que levou à origem do citótipo $2n=47$ deste indivíduo a partir de um citótipo $2n=48$. Constatou-se ainda a formação de gametas desbalanceados devido à formação do trivalente, resultando em seis diferentes possibilidades de segregação que ocorrem na mesma frequência. Apesar do potencial para a inviabilidade de gametas que as diferentes combinações oferecem, sobretudo quando considerada a diversidade de citótipos da população, sugerimos que um evento de “resistência à deriva” poderia permitir a manutenção de polimorfismos na população.

REFERÊNCIAS

- AKAMA, A.; LEHMANN, P.; BRITTO, M. R.; LONDOÑO-BURBANO, A.; BIRINDELLI J. L. O.; CARVALHO, T. P.; MARCENIUK, A. P.; PEREIRA, E. H. L.; REIS, R. E.; SHIBATTA O. A.; SLOBODIAN, V.; TENCATT, L. F. C.; FERRER, J. 2024. Siluriformes in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/388>>. Acesso em: 08 jan. 2024.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, n. 1, p. 27–53, jul. 2020. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032.
- ALVES A.L.; OLIVEIRA C.; FORESTI F. Karyotype variability in eight species of the Subfamilies Loricariidae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriforme, Loricariidae). **Caryologia**, Botucatu, v. 56, p. 57-63, 2003.
- BARHIERI, G. Dinâmica da reprodução do cascudo, *Rineloricaria latirostris* Boulenger (Siluriformes, Loricariidae) do rio Passa Cinco, Ipeúna, São Paulo. **Revta. Bras. Zool.** Curitiba, v. 11, n. 4, 1994. DOI: 10.1590/S0101-81751994000400003.
- BERTOLLO, L. A. C; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cyto-taxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet.**, n. 1, p. 103-120, 1978.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- BOSCHMAN, L. M.; CARRARO, L.; CASSEMIRO, F. A. S.; *et al.* Freshwater fish diversity in the western Amazon basin shaped by Andean uplift since the Late Cretaceous. **Nature Ecology & Evolution**, v. 7, n. 12, p. 2037–2044, 2023. DOI: 10.1038/s41559-023-02220-8.
- BROWN, J. D.; O'NEILL, R. J. Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, n. 11, p. 291-316, 2010. DOI: 10.1146/annurev-genom-082509-141554.
- BUJ, I.; MARČIĆ, Z.; FLAUDER, E.; ŠANDA, R.; VUKIĆ, J. Population Genetic Structure of Endemic Fish Species Facilitating Their Survival in Changing Environments — A Case Study on the Genus *Telestes* in Croatia. **Diversity**, v. 14, n. 7, p. 529, 2022. DOI: 10.3390/d14070529.
- CASTRO, R. M. C. E. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos (CASTRO, 1999) revisitado após mais de duas décadas. **Oecologia Australis**, v. 25, n. 2, p. 231–245, 2021. DOI: 10.4257/oeco.2021.2502.02.
- CIUS, A.; CARVALHO, L. A. B.; BRUSCHI, D. P.; LORSCHIEDER, C. A.; ZAWADZKI, C. H.; RECK, M. A.; PRIZON, A. C.; GAZOLLA, C. B.; LEMOS, L. Z.; RANNUCI, L.; LUPEPSA, L.; BARBIERI, P.; OLIVIA, J. H.; CASTRO, A. L. B. P. Evidência de novas

espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) na bacia do rio Iguaçu, Paraná utilizando dados citogenéticos e de DNA barcoding. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 165. DOI: 10.5433/1679-0367.2017v38n1suplp165.

COSTA-SILVA, G. J.; RODRIGUEZ, M. S.; ROXO, F. F.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0135075, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0135075.

COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S.; OLIVEIRA, C.; MOL, J.H.; MONTOYA-BURGOS, J.I.; DRAY, S. Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 94, pt B, p. 492-517, 2016. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.10.018.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES**. 2024. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em 3 de janeiro de 2024.

FRIES, L. C. C. **Ecologia do movimento de um pequeno peixe de riacho: padrões de movimento em pequena escala e efeito de cruzamentos riacho-estradas**. Porto Alegre, 2020. Tese (Doutorado em Ciências com ênfase em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GAFFAROGLU, M.; MAJTÁNOVÁ, Z.; SYMONOVÁ, R.; PELIKÁNOVÁ, S.; UNAL, S.; LAJBNER, Z.; RÁB, P. Present and Future Salmonid Cytogenetics. **Genes**, v. 11, n. 12, p. 1462, 2020. DOI: 10.3390/genes11121462.

GALETTI, P. M. JR.; AGUILAR, C. T.; MOLINA, W. F. An overview of marine fish cytogenetics. **Hydrobiologia**, n. 420, p. 55-62, 2000. DOI: 10.1023/A:1003977418900.

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

GLUGOSKI, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; 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**, v. 650, p. 49-54, 2018. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.099.

GLUGOSKI, L.; DEON, G. A.; NOGAROTO, V.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Robertsonian Fusion Site in *Rineloricaria pentamaculata* (Siluriformes: Loricariidae): Involvement of 5S Ribosomal DNA and Satellite Sequences. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 162, n. 11-12, p. 657-664, 2022.

GORNUNG, E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 141, n. 2, p. 90-102, 2013. DOI: 10.1159/000354832.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. Repetitive Sequences in Complex Genomes: Structure and Evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, n. 1, p. 241–259, 2007.

KALOUS, L.; KNYTL, M.; KRAJÁKOVÁ, L. Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: **Proceedings of the Workshop on Animal Biodiversity**, p. 57-60, 2010.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.

LABAR, T.; ADAMI, C. Evolution of drift robustness in small populations. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1012, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-01003-7.

LIAO, X.; ZHU, W.; ZHOU, J.; *et al.* Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 954, 2023. DOI: 10.1038/s42003-023-05322-y.

LIU, Z.; ROESTI, M.; MARQUES, D.; *et al.* Chromosomal Fusions Facilitate Adaptation to Divergent Environments in Threespine Stickleback. **Molecular Biology and Evolution**, v. 39, n. 2, p. msab358, 2022. DOI: 10.1093/molbev/msab358.

MAIA, T.P de A.; GIULIANO-CAETANO, L.; RODRIGUEZ, M. S.; *et al.* Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyological research**, v. 57, n. 2, p. 209-213, 2010. DOI: 10.1007/s10228-009-0145-7.

MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. Phylogeny and classification of Neotropical fish. **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. p.1–19, 2020. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-815872-2.00001-4.

MARAJÓ, L.; VIANA, P. F.; FERREIRA, A. M. V.; PY-DANIEL, L. H. R.; CIOFFI, M. D. B.; SEMBER, A.; FELDBERG, E. Chromosomal rearrangements and the first indication of an ♀X1X1X2X2/♂X1X2Y sex chromosome system in *Rineloricaria* fishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Fish Biology**, v. 102, n. 2, p. 443– 454, 2023. DOI: 10.1111/jfb.15275.

MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, n. 5, p. 363–367, 1999. DOI: 10.1023/A:1009216030316.

MOLINA, W. F.; GALETTI-JR, P. M. Robertsonian rearrangements in the reef fish Chromis (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5s rRNA genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 373–377, 2002. DOI: 10.1590/S1415-47572002000400004.

MORRONE, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, n. 1, p. 1-110, 2014. DOI: 10.11646/zootaxa.3782.1.1.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World**. 1^o ed. Wiley, 2016. DOI: 10.1002/9781119174844.

NIRCHIO, M.; ROSSI, A. R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 761–770, 2014. DOI: 10.1590/1982-0224-20130008.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, n. 11, p. 3745–3776, 2020. DOI: 10.1038/s41596-020-0400-y.

OCALEWICZ, K. Telomeres in fishes. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 141, n. 2, p. 114-25, 2013. DOI: 10.1159/000354278.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009. DOI: 10.1007/s10695-008-9250-1.

OLIVEIRA, J. V. L. **Descrição de uma nova variante cariotípica e caracterização do mitogenoma e satelitoma de *Rineloricaria lanceolata* (Siluriformes, Loricariidae)**. Ponta Grossa, 2022. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Nucleus**, v. 50, n.3, p. 519-543, 2007.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986.

PLATNICK, N. I.; GRISWOLD, C. E.; CODDINGTON, J. A. On missing entries in cladistic analysis. **Cladistics**, v. 7, n. 4, p. 337-343, 1991. DOI: 10.1111/j.1096-0031.1991.tb00042.x.

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

PORTO, F. E.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. **Ichthyological Research**, v. 58, n. 1, p. 225–231, 2011. DOI: 10.1007/s10228-011-0215-5.

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

PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; ALMEIDA, M. C.; *et al.* Mechanisms of Chromosomal Diversification in Species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 161–168, 2016.

PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Chromosome Mapping and Molecular Characterization of the Tc1/Mariner Element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, n. 1, 2018. DOI: 10.1590/1678-4324-2018170623.

PY-DANIEL, L. H. R.; FERNANDES, C. C. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 97–110, 2005.

RODRIGUEZ, M. S. & R. E. REIS. Taxonomic review of *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from the Laguna dos Patos drainage, Southern Brazil, with the descriptions of two new species and the proposition of two species groups. **Copeia**, v. 2008, n.2, p. 333-349, 2008.

ROSA, K.; ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A.V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; CESTARI, M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 739-749, 2012. DOI: 10.1007/s11160-011-9250-6.

RUIZ-HERRERA, A.; NERGADZE, S. G.; SANTAGOSTINO, M.; GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 3, p. 219–228, 2008.

RUIZ-RUANO, F. J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 283, 2016.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANDKAM, B. A.; ALMEIDA, P.; DAROLTI, I; *et al.* Extreme Y chromosome polymorphism corresponds to five male reproductive morphs of a freshwater fish. **Nature Ecology and Evolution**, v. 5, p. 939–948, 2021.

SCHMIEDER, R. & EDWARDS, R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17288, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017288.

SMIT, A. F. A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. RepeatMasker Open-3.0. 1996-2010. Disponível em: <<http://www.repeatmasker.org>>.

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

URBANO-BONILLA, A.; LONDOÑO-BURBANO, A.; CARVALHO, T. P. A new species of rheophilic armored catfish of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the Vaupés River, Amazonas basin, Colombia. **J. Fish. Biol.**, v. 103, n. 5, p. 1073-1084, 2023. DOI: 10.1111/jfb.15500.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: An Overview. In: MALABARBA, L. R. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998.

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

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

WATSON, K. B.; LEHNERT, S. J.; BENTZEN, P.; *et al.* Environmentally associated chromosomal structural variation influences fine-scale population structure of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Molecular Ecology**, v. 31, n. 4, p. 1057–1075, 2022.

YIN, Y.; FAN, H.; ZHOU, B.; *et al.* Molecular mechanisms and topological consequences of drastic chromosomal rearrangements of muntjac deer. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6858, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-27091-0.

ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE COLETA (Licença SISBIO – 15115-1)



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Táxons autorizados

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

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

Nível	Taxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

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

Código de autenticação: 85979796



Página 2/2

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
(CEUA – 0769342)

01/12/2021 11:55

SEI/UEPG - 0769342 - Carta



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

CARTA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA: 0769342/2021

Protocolo UEPG: 21.000060874-2

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

Interessado: Roberto Ferreira Artoni

e-mail: rfartoni@gmail.com

Data de Entrada: 29/10/2021

Resultado: Aprovado

Considerações

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

01/12/2021 11:55

SEI/UEPG - 0769342 - Carta

Ponta Grossa, 30 de novembro de 2021

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



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



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

21.000060874-2

0769342v5

ANEXO C – PREPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS A PARTIR DE NADADEIRA

(KALOUS *et al.*, 2010)

Solução 1 (Stock): 7,48g NaCl + 0,18g KCl + 0,2g CaCl₂ + 0,016g NaHCO₃ em 1 lt de H₂O

Solução 2: 14,3 ml de solução 1 + 85,7ml of H₂O + 0,025g de colchicina

1. Corte a nadadeira (corte reto). Manter o peixe em aquário por alguns dias, até que você visualizar a regeneração incompleta da nadadeira, pois é necessário que as células estejam em divisão. Isso depende da espécie estudada, 4 dias, 7 dias, 15 dias e no caso do presente estudo 18 dias.
2. Depois de uma regeneração incompleta, cortar a nadadeira novamente para obter os cromossomos.
3. Coloque a nadadeira em placa de Petri e adicione 5 ml ou mais da solução 2 (a nadadeira deve ser completamente coberta); e mantenha por 2 h na estufa em 30° C.
4. Após 2 h, adicionar 5 ml de fixador (Metanol 3: 1 de ácido acético) e deixe na geladeira por 25 min a 4° C.
5. Remover a solução com pipeta Pasteur de vidro e adicionar 5 ml de fixador e deixar na geladeira por 25 min a 4° C. Repetir o passo 5 por 3 vezes.
6. A última fixação (5 ml de fixador) pode ser armazenada na geladeira a 4° C por 25 minutos ou durante a noite, se necessário, e depois iniciar o próximo passo.
7. Preparar 50% de ácido acético/água e colocar a nadadeira na placa de Petri. Colocar 40 µl de ácido acético sobre a nadadeira e dissolver o tecido com uma pinça. Depois remover o líquido com uma pipeta e colocar em tubos tipo Eppendorf. Mantenha os tubos em gelo a 0 ° C, e realizar o gotejamento no mesmo dia.
8. Pegar 50 µl para fazer gotejamento. Colocar o volume sobre uma lâmina aquecida em placa a 37° C, aspirar o material a assim proceder várias vezes sobre diferentes pontos da lâmina.

**ANEXO D – TÉCNICA ALTERNATIVA PARA PREPARAÇÕES
CROMOSSÔMICAS EM PEIXES (KCI) (MOREIRA FILHO & BERTOLLO, 1990)**

- 1.** Sacrificar o animal e retirar o rim anterior.
- 2.** Colocar o material, previamente lavado em solução hipotônica, em uma cuba de vidro contendo 7-10 ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M.
- 3.** Dissociar o material com pinças de dissecação para separar as células, completando o processo com o auxílio de uma seringa hipodérmica.
- 4.** Incubar o material em estufa a 37° C. Após passar 10 minutos, pingar 1-2 gotas de solução aquosa de colchicina 0,0125%. Deixar na estufa por mais 15-20 minutos e pingar 5-10 gotas de fixador recém-preparado (álcool metílico 3 : ácido acético 1), ressuspensando o material. Centrifugar durante 10 minutos a 900 rpm.
- 5.** Retirar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur e proceder a fixação segundo a técnica de “air-drying”.

ANEXO E – PREPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS MEIÓTICOS (KLIGERMAN & BLOOM, 1977, adaptada por BERTOLLO, 1978)

- 1.** Injetar, intraperitonealmente, solução de colchicina 0,05% na proporção de 1ml/100g do animal.
- 2.** Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de uma hora. Após este tempo, sacrificar o animal e retirar os testículos.
- 3.** Seccionar o órgão em fragmentos pequenos e colocá-los em solução hipotônica de KCl a 0,075 M por 20 minutos.
- 4.** Transferir o material para o fixador (metanol: ácido acético, 3:1) recém-preparado.
- 5.** Repetir o processo de fixação mais uma vez. A seguir, o material pode ser guardado no refrigerador a 4° C ou processado conforme os itens seguintes:
- 6.** Retirar o material do fixador e transferir alguns fragmentos do órgão para uma placa escavada, adicionando duas a três gotas de ácido acético a 50%.
- 7.** Fragmentar o material com cuidado a fim de obter uma suspensão celular.
- 8.** Com uma pipeta Pasteur, colocar uma gota de suspensão sobre uma lâmina aquecida a 30-35° C, reaspirando-a imediatamente.
- 9.** Repetir o item 8 em mais 2 ou 3 campos da lâmina.
- 10.** Corar com Giemsa 5%.

ANEXO F – EXTRAÇÃO DE DNA MÉTODO CTAB

Tampão de extração com CTAB separado. Para 15 mL de solução tampão:

5mL de NaCl 5M ([] final 1M)

5mL EDTA 0,5M ([] final 0,1M) → Pesar 2g de NaOH pH → 8

5mL TRIS-HCl 1M pH 8.0 ([] final 0,1M)

Processo de extração: (0,2g de tecido +-)

360µL de tampão sem CTAB;

240 µL de CTAB 5%;

13µL de proteinase K (10mg/mL);

10µL de RNase (10mg/mL); → 37°C 3h.

15µL de DTT (1M) ou 5 µL de β-Mercaptoetanol.

1. Colocar a 50°C por 10 horas ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
2. Adicionar 600µL de clorofórmio;
3. Agitar durante 5 min (vórtex suave). Centrifugar a 8000 rpm por 5 min;
4. Retirar sobrenadante (contém o DNA) e transferir para um novo tubo;
5. Adicionar 600 µL de Etanol (Absoluto) e deixar a -20°C por 2 horas ou *overnight*;
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min. (alinhar os tubos na centrifuga);
7. Descarta-se o sobrenadante;
8. Lavar o pellet com (não misturar) 500µL de etanol 70%. Centrifugar por 2 min e retirar o sobrenadante (14000 rpm);
9. Deixar secando na estufa a 40°C no MÁXIMO e ressuspender em 20µL de TE;
10. Banho maria 30°C+- (Se precisar, para diluir DNA);
11. Armazenar no freezer.

ANEXO G – PIPELINE DE ANÁLISE DE SATDNA (RUIZ RUANO *et al.*, 2016)

