

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILLA BORGES GAZOLLA

Mapeamento e caracterização de elementos transponíveis e de sequências repetitivas no cariótipo de três espécies do gênero *Hypostomus* (Loricaridae)

Maringá

2018
CAMILLA BORGES GAZOLLA

**MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS
E DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS NO CARIÓTIPO DE TRÊS ESPÉCIES DO
GÊNERO *HYPOSTOMUS* (*LORICARIDAE*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas”.

Orientador: **Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro**
Coorientador: **Dr. Daniel Pacheco Bruschi**

Maringá
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

CAMILLA BORGES GAZOLLA

**MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS
E DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS NO CARIÓTIPO DE TRÊS ESPÉCIES DO
GÊNERO *HYPOSTOMUS* (*LORICARIDAE*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas”.

Aprovado em:/...../20

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Ana Luiza de Brito Portela-Castro
Universidade Estadual de Maringá

Profa Dra Marcia Cristina de Souza Lara-Kamei
Universidade Estadual de Maringá

Prof Dr Orlando Moreira Filho
Universidade Estadual de Maringá

Profa Dra Luciana Andrea Borin (Suplente)
Universidade Estadual de Maringá

Profa Dra Lucia Giuliano Caetano (Suplente)
Universidade Estadual de Londrina

BIOGRAFIA

CAMILLA BORGES GAZOLLA, filha de Humberto Paulo Gazolla e Liamar Borges Gazolla, nascida no dia 28 de agosto de mil novecentos e noventa e dois, na cidade de Araçatuba-SP.

Concluiu o Ensino Fundamental, no ano de 2006, no colégio Thathi COC, na cidade de Araçatuba-SP, e Ensino Médio, no ano de 2009, no mesmo colégio.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas, em fevereiro de 2011, na Universidade Estadual de Maringá na cidade de Maringá-PR, obtendo o título de Licenciada em Ciências Biológicas em março de 2016.

Em abril de 2016, ingressou no curso de mestrado do Programa de Ciências Biológicas (PBC), da Universidade Estadual de Maringá.

A Deus e Nossa Senhora
Aos meus pais, Liamar e Humberto
A minha irmã, Fabíolla
As minhas avós, Maria e Nilza
Aos meus avôs, Irineu e Adalto (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, por fornecer todo suporte para meu desenvolvimento profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, concedido por meio de bolsa de estudo.

Deus, gratidão pela minha vida e por estar ao meu lado até mesmo nos momentos em que eu mais desacreditei;

Nossa Senhora, por me aquecer com seu manto sagrado sempre que tive medo;

Meus pais, por serem meu porto seguro e demonstrar todos os dias o que é um amor sem limites;

Fabiolla, por todo companheirismo, lealdade, confiança e por termos aprendido que ser irmã é sonhar e viver juntas os sonhos uma da outra;

As minhas avós, tios, tias, primos e primas, por tornar real o verdadeiro significado de família, de uma forma que me faz ser realizada por ter vocês;

A minha orientadora, Profa. Ana Luiza, por ter me acolhido, acreditado em mim e ter mostrado o quão família pode ser um laboratório;

Ao meu co-orientador Prof. Daniel, que foi um presente de Deus, uma luz no fim do túnel;

As ninas Ana Camila e Andréa, simplesmente por fazer essa fase complicada se tornar tão mais leve e cheia de amor;

Ao Júlio, por ter sido um amigão e parceiro, seu futuro será muito abençoado;

A todos os meus amigos do laboratório de Citogenética (Isabelli, Dani, Layon, Leandro, Vini, Rafa, Luara, Pablo, Léo, Prof. Claudio e seu filho Gabriel) pela companhia, ajuda e inúmeros sorrisos, eu adoro vocês.

A profa. Luciana, que consegue ter uma energia que torna nosso dia melhor só de estar por perto;

A Mazé, por todos os abraços, conselhos, segredos, enfim, você é uma mãezona;

Ao Prof. Valter, que além de ser uma referência como profissional, é um exemplo de pessoa que levarei sempre comigo;

Ao Merotti, por ter me tornado uma mulher forte (em todos os sentidos), por tirar de mim uma vontade de sempre querer me superar. Eu não conheceria todos os meus limites se não fosse por você;

Ao Rafael por me tranquilizar, me dar segurança e me fazer acreditar que Deus sempre tem o melhor para nós;

Ao Marcelo, por todos os cafés e por ter me ensinado o verdadeiro significado da palavra amigo, com certeza você vai ser a minha maior saudade;

As minhas quatro amigas que não vivo sem, Bruna, Carol, Ju e Mika, eu amo vocês;

Ao Gui, eu não consigo mensurar o quão especial você é, eu te agradeço por cada palavra, cada carinho, por cada momento que passei com você;

Agradeço a todos os meus amigos e amigas, que são a base de minha felicidade (Geovane, Marri, Priscila, Mari Coutinho, Paulo, Tina, Michelle, Ana Paula, Nego, Lidi, Lorena, Jeci, Luciano, Carla, Everton, Nicolas, Ju, Andressa, Luciana, Pétrik e Zé Clementino);

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, em especial a Profa. Cida e seus alunos Renato, Francisco e Anelise, por terem me emprestado o laboratório inúmeras vezes;

Gratidão por todos vocês.

APRESENTAÇÃO

Essa tese é composta de um artigo científico, que foi elaborado através de estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies de *Hypostomus*, que abordam os resultados obtidos para *Hypostomus regani*, *H. albopunctatus*, e *Hypostomus* aff. *paulinus*. As análises possibilitaram a caracterização de regiões heterocromáticas, o mapeamento de elementos retrotransponíveis e de sequências de DNA repetitivo presente no genoma das espécies analisadas.

Capítulo I – Mapeamento e caracterização de elementos transponíveis e de sequências repetitivas no cariótipo de três espécies do gênero *Hypostomus* (*Loricaridae*).

Este trabalho será submetido a revista *Genetics and Molecular Biology* e está formatado nas normas deste periódico

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
FIGURAS E LEGENDAS.....	43

RESUMO GERAL

O gênero *Hypostomus* (Loricaridae) é composto por peixes conhecidos popularmente como cascudos, os quais, devido à grande similaridade morfológica entre si, tornam a taxonomia desse grupo um grande desafio. Análises citogenéticas, clássicas e moleculares, têm contribuído de forma significativa como ferramenta adicional à resolução de questões taxonômicas no grupo. O número diploide e fórmulas cariotípicas diversas, indicam uma evolução divergente, que pode ser explicada pela frequente ocorrência rearranjos cromossômicos. Nesse contexto, o estudo da porção de DNA repetitivo no genoma pode contribuir no entendimento dessas sequências na diversificação cariotípica do grupo, uma vez que nos últimos anos suas funções estruturais ou regulatórias nos genomas têm sido melhor compreendida. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar citogeneticamente três espécies de *Hypostomus*, sendo elas, *H. regani*, *Hypostomus* aff. *paulinus* e *H. albopunctatus*. No presente estudo, as três espécies foram submetidas às análises incluindo marcadores citogenéticos clássicos, como coloração com Giemsa, impregnação por nitrato de Prata (Ag-NORs), bandeamento C, colorações com fluorocromos base-específicos (DAPI e CMA₃), e através de abordagens moleculares (Hibridização *In Situ* Fluorescente - FISH). Realizamos o isolamento e o mapeamento de dois elementos retrotransponíveis (*Rex1* e *Rex3*) e de outras sequências repetitivas presente nos genomas (repetições microssatélites e teloméricas). Nossos dados contribuem com informações acerca da evolução cromossômica, bem como a diversidade cariotípica intra-específica neste grupo, e fornecem evidências da participação dos elementos de retrotransposição (*Rex1* e *Rex3*) e sequências de microssatélites ((CA)₁₅ e (GA)₁₅) atuando na diversificação do genoma dessas espécies, reforçando a hipótese de que essas sequências repetitivas, quando presente no genoma, favorecem a reorganização cariotípica ao longo da evolução do grupo.

PALAVRAS-CHAVE: *Hypostomus*, Elementos Retrotransponíveis, Repetições microssatélites, Heterocromatina.

ABSTRACT

The genus *Hypostomus* (Loricaridae) is represented by fishes popularly known as catfishes, which due to a great morphological similarity between them, there is an enormous challenge regarding the taxonomy of this group. Classical and molecular cytogenetic approach have significantly contributed as an additional tool to cope with taxonomic issues in the group. The diploid number and several karyotype formulas indicate a divergent evolution, which can be explained by the occurrence of chromosome rearrangements. In this context, the study of the repetitive portion of DNA in the genome may contribute to the comprehension of such sequences in the karyotype diversification of the catfish group, since in the last years its structural or regulatory functions in genomes have been better understood. Therefore, this study aimed to cytogenetically characterize three distinct species of the genus *Hypostomus*, they being *H. regani*, *Hypostomus aff. paulinus* and *H. albopunctatus*. The three species were submitted to analyzes including classical cytogenetic markers, such as Giemsa staining, silver-nitrate impregnation (Ag-NORs), C-banding, base-specific fluorochromes staining (DAPI and CMA₃) and molecular approaches (fluorescent in situ hybridization - FISH). We performed the isolation and mapping of two retrotransposable elements (*Rex1* and *Rex3*) and other repetitive sequences present in the genomes (microsatellite and telomeric repetitions). Our results contribute with information in regard to chromosome evolution as well as the intra-specific karyotypic diversity in the catfish group. Also, our findings provide evidence of the participation of retrotransposition elements (*Rex1* and *Rex3*) and microsatellite sequences ((CA)₁₅ and (GA)₁₅) acting in the diversification of the genome of the studied species, reinforcing the hypothesis that these repetitive sequences, when present in the genome, favor the karyotypic reorganization throughout the evolution of the catfish group.

Key words: *Hypostomus*, retroposable elements, microsatellite repetitions, heterochromatin, cytogenetic

INTRODUÇÃO

Hypostomus Lacépède, 1803 encontra-se amplamente distribuído desde a América Central e do Sul, compreendendo 148 espécies válidas (Froese e Pauly, 2017), dentre as quais, 23 ocorrem na bacia do alto rio Paraná (Zawadzki *et al.*, 2008). A similaridade morfológica neste grupo é grande, o que dificulta a identificação de muitas espécies baseada somente em caracteres morfológicos. Nesse sentido, a utilização de uma variedade de fontes de evidências (fenotípicas e genotípicas) tem sido determinante na resolução de questões taxonômicas no grupo. Dentre elas, destacamos o uso de marcadores citogenéticos para a compreensão da taxonomia e aspectos evolutivos dentro do gênero *Hypostomus* (Alves *et al.*, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Kamei *et al.*, 2017).

Em alguns casos, a utilização da citogenética também é capaz de revelar diversidade críptica em *Hypostomus*, fato que fica evidente quando observamos na literatura dados cariotípicos que variam entre diferentes populações de uma mesma espécie nominal (Alves *et al.*, 2012). Além disso, são inúmeros os casos de descrição de cariótipos de populações cujo *status* taxonômico ainda não são completamente definidos ou que, possivelmente, tratam-se de espécies novas. Estas situações podem ser observadas em *H. ancistroides* (Endo *et al.*, 2012), *H. nigromaculatus* (Rubert *et al.*, 2008), *Hypostomus* aff. *unae* (Bitencourt *et al.*, 2011), *H. albopunctatus* (Bueno *et al.*, 2013). As diferenças cromossômicas, numéricas e estruturais, interpopulacionais têm sido relacionadas com a ocorrência de rearranjos cromossômicos como fusões/fissões, inversões pericêntricas e translocações (Artoni *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2012, 2013) revelando assim uma evolução cariotípica divergente neste grupo.

Muitas espécies de *Hypostomus* da bacia do rio Paraná têm seus cariótipos conhecidos (Bueno *et al.*, 2012, 2013), entretanto, para a grande maioria são descritos apenas o número diploide, fórmula cariotípica e bandeamentos cromossômicos rotineiros, como determinação do número e localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) e do padrão de heterocromatina através do bandamento C. Além disso, a aplicação do método

de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), utilizando sondas de DNAr 18S e 5S, têm gerado dados adicionais à interpretação dos cariótipos e revelado uma grande variabilidade em número e localização destes sítios nos cariótipos do gênero, como observado nos dados apresentados por Rubert *et al.* (2016), que abrangeram o mapeamento desses marcadores cromossômicos em 19 espécies desse gênero.

Marcadores cromossômicos mais específicos utilizando FISH com sondas de elementos transponíveis, microssatélites e de genes para histonas ainda são restritos em espécies de *Hypostomus* (Pansonato-Alves *et al.*, 2013). O mapeamento de sequências repetitivas, arranjadas *in tandem* ou dispersas no genoma, são importantes para a compreensão de sua participação nos mecanismos evolutivos que resultam na diversificação das espécies. Em alguns casos, podem subsidiar dados que contribuam para a complexa taxonomia deste gênero, reforçando por exemplo, as diferenças cromossômicas entre espécies sob investigação taxonômica (Nascimento *et al.*, 2015; Favarato *et al.*, 2016A).

Elementos transponíveis (ET) têm sido bem documentados no genoma de peixes e estão presentes nos principais ramos evolutivos deste grupo (Da Silva *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2011; Favarato *et al.*, 2016B). Estes elementos podem estar inseridos em grandes blocos genômicos (*clusters*) ou dispersos pelos cromossomos, podendo ser associados às regiões eucromáticas quanto nas porções heterocromáticas (para referência, ver Ferreira *et al.*, 2011).

Dentre os diferentes tipos de elementos transponíveis, destacam-se os do grupo *Rex* (*Rex 1*, *Rex 3*, *Rex 6*), um retroelemento caracterizado pela primeira vez em peixes no genoma de espécies do gênero *Xiphophorus* e que ocorrem em diferentes espécies desse grupo (Volf *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2013, Favarato *et al.*, 2016A). Devido a sua capacidade de se mover dentro do genoma, os elementos transponíveis podem induzir rearranjos cromossômicos, como inversões, deleções e translocações, podendo movimentar e duplicar sequências codificantes do hospedeiro, sendo, portanto, importantes para evolução do genoma e dos cromossomos eucariotos (Chalopin *et al.*, 2015).

Além do mapeamento cromossômico dos elementos transponíveis, outras sequências de DNA repetitivo tem sido igualmente importante como marcadores

cromossômicos para espécies e/ou populações de peixes. Os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) são compostas por sequências de DNA cuja a unidade monomérica é composta de um a seis nucleotídeos, que se encontram repetidos sequencialmente no genoma (organização *in tandem*), abundantemente distribuídos pelos genomas. A quantidade de suas unidades repetitivas em um genoma demonstra um alto nível de polimorfismo, e estudos têm constantemente demonstrado sua contribuição na organização da cromatina, regulação da recombinação do DNA, transcrição, tradução, expressão gênica e dinâmica do ciclo celular (Dimitry *et al.*, 2006). O mapeamento físico desses marcadores em peixes é ainda restrito, sendo utilizados principalmente ao estudo de espécies portadoras de cromossomos sexuais heteromórficos, revelando acúmulo diferencial de alguns tipos de repetições microssatélites nestes cromossomos, como evidenciado em *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2010, 2011) e *Oplegnathus fasciatus* (Xu *et al.*, 2013) e *Leporinus elongatus* (Poltronieri *et al.*, 2013). Em outras espécies de peixes foram demonstrados acúmulos de sequências microssatélites em cromossomos autossomos distribuídos por regiões centroméricas, teloméricas ou intersticiais (Vanzela *et al.*, 2002; Cioffi *et al.*, 2013; Cioffi *et al.*, 2015). Em *Hypostomus*, Traldi *et al.*, (2013) demonstraram um padrão disperso da sequência (GATA)_n em quatro espécies (*H. ancistroides*, *H. iheiringii*, *H. nigromaculatus* e *H. tapijara*), sugerindo que esta distribuição seja uma consequência de rearranjos cromossômicos ou eventos de transposição mediados por elementos transponíveis ocorridos durante a evolução do grupo.

Estudo citogenético prévio realizado por Ferreira (2016) em uma população de *H. regani* coletada no rio Taquari, município de Coxim (Mato Grosso do Sul), pertencente à bacia do rio Paraguai, revelou um cariótipo constituído por $2n=72$ cromossomos, porém, dois cariomorfos foram encontrados entre os indivíduos analisados: cariomorfo A, composto de $12m+14sm+18st+28a$ e o cariomorfo B com $13m+14sm+17st+28a$, caracterizado pela presença de um cromossomo metacêntrico, o maior do complemento, e um subtelocêntrico correspondente a um dos homólogos do par19. Essa condição foi observada em 43,74% da amostra e independe do sexo do indivíduo analisado. De acordo com Ferreira (2016), o cromossomo

metacêntrico (heteromórfico) apresentou o braço curto totalmente heterocromático, composto de sequências ricas em GC, reveladas por coloração com CMA₃. A origem do grande metacêntrico do par heteromórfico foi sugerida como resultante da amplificação de heterocromatina a partir de um dos cromossomos do par 19 (st) do cariomorfo A. Esta hipótese foi testada, por meio da microdissecção cromossômica do metacêntrico grande, o qual produziu uma sonda que hibridizou em toda a extensão do braço superior do metacêntrico e na região pericentromérica de seu homólogo subteloentrícos do cariomorfo A e no homólogo correspondente ao par 19' do cariomorfo B.

Assim, considerando o polimorfismo cromossômico detectado em *H. regani*, o presente estudo tem como objetivo complementar os dados citogenéticos nesta espécie, por meio do mapeamento cromossômico utilizando FISH com sondas de elementos retrotransponíveis do grupo *Rex* e de repetições microssatélites em ambos cariomorfos, com ênfase no par heteromórfico 19'. Em nossa hipótese, acreditamos que a diferenciação do par heteromórfico encontrado em alta frequência na população de *H. regani* possa ter sido originado a partir de acúmulo de DNAs repetitivos, dentre eles, elementos de transposição.

Além dessa espécie, também buscamos contribuir com dados cariotípicos de duas populações cujo *status* taxonômico deva ser melhor investigado: *Hypostomus aff. paulinus* e de *H. albopunctatus*, ambas pertencentes a bacia do Rio Paraná e coletadas no Ribeirão Andirá, Município de Ourizona-PR. Destacamos que variações cromossômicas numéricas e estruturais já foram relatadas para outras populações dessas espécies (Michelle *et al.*, 1977; Artoni e Bertollo, 1996; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2012; Kamei, 2015), tanto para indivíduos coletados nessa mesma bacia, quanto para populações de outras bacias hidrográficas. Esses dados poderão fornecer um panorama mais completo sobre a variação genética encontrada e levantar hipóteses sobre a natureza dessas variações (interpopulacionais ou intraespecíficas).

OBJETIVOS

Este interessante polimorfismo cromossômico motivou a continuidade dos estudos para se compreender a natureza molecular e possível origem do heteromorfismo cromossômico encontrado no cariomorfo B, constituindo assim um dos objetivos deste estudo.

Assim, uma vez que a participação do conteúdo de DNA repetitivo de um genoma pode estar diretamente relacionado com os mecanismos genéticos que atuam na diversificação e evolução do genoma eucarioto, esperamos encontrar evidências que provem sua participação na evolução cariotípica nessas espécies de *Hypostomus*. Ao mesmo tempo, esperamos fornecer dados para melhor compreensão das relações cario-evolutivas, biogeográficas e filogenéticas neste gênero, fornecendo subsídios para estimativa de uma diversidade ainda desconhecida no gênero *Hypostomus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras Biológicas

Foram utilizados um total de 26 suspensões celulares preparadas a partir de exemplares de *H. regani* coletados no rio Taquari, no município de Coxim, Mato Grosso do Sul (MS) e previamente utilizadas por Ferreira (2016). Adicionalmente, seis espécimes de *Hypostomus* aff. *paulinus* e dois espécimes de *H. albopunctatus* foram coletadas no Ribeirão Andirá, no município de Ourizona, sub-bacia do rio Ivaí (PR). Os espécimes foram encaminhados para identificação taxonômica e depositados na Coleção do Museu do NUPÉLIA da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e os dados detalhados da amostra são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Número de espécimes, localidade e respectivo voucher das espécies de *Hypostomus* analisadas.

Espécie	Número de espécimes	Localidade/Estado	Voucher
<i>Hypostomus regani</i>	08♂ + 04 ♀ + 14 juvenis	Rio Taquari, Coxim/MS	NUP135-141 e 150-168
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	6 juvenis	Ribeirão Andirá, Ourizona/PR	NUP675-679 e 684
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	2 juvenis	Ribeirão Andirá, Ourizona/PR	NUP674 e 680-683

Preparações cromossômicas e análise citogenética

As preparações dos cromossomos mitóticos foram realizadas a partir da porção anterior do rim dos espécimes de acordo com a técnica "air drying" descrita por Bertollo *et al.*, (1978). As preparações cromossômicas foram submetidas à coloração convencional com Giemsa 5% para a determinação dos cariótipos. A determinação do número e localizações das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram realizadas por meio da técnica de impregnação pela Prata (Ag-NORs) segundo Howell e Black (1980).

A descrição cariotípica da população de *H. regani* proveniente de Coxim/MS foi previamente realizada por Ferreira (2016). Esses autores reportaram um interessante heteromorfismo cromossômico intrapopulacional, observado independente do sexo dos indivíduos, gerando dois cariomorfos que divergem em seus números fundamentais: cariomorfo A e cariomorfo B. Para o presente trabalho, selecionamos 17 espécimes portadores do cariomorfo A e nove espécimes portadores do cariomorfo B.

Caracterização do conteúdo de heterocromatina

Para detecção do padrão de distribuição da heterocromatina no genoma das espécies estudadas utilizamos a técnica de bandamento C segundo Summer (1972) seguida de coloração com iodeto de propídio de acordo com o método proposto por Liu *et al.*, (2012). Para a distinção das classes de heterocromatina ricas em A:T ou G:C, utilizamos coloração com os fluorocromos base-específicos DAPI e CMA₃, respectivamente, utilizando o método proposto por Schweizer, 1980.

Isolamento, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA genômico foi extraído de suspensão celular (*H. regani*) e de fígado (*Hypostomus aff. paulinus* e *Hypostomus albopunctatus*) utilizando o método TNES, conforme aplicado por Bruschi *et al.*, (2012). As buscas genômicas por elementos repetitivos foi realizada através do método de PCR utilizando primers heterólogos do non-LTR retroelemento *Rex1* [*Rex1F* (5' - TTCTCCAGTGCCTTCAACACC- 3') e *Rex1R* (5'- TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC-3')] (Volf *et al.*, 2000)] e *Rex3* [*Rex3F* (5'- CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG-3') e *Rex3R* (5'- TGGCAGACNGGGGTGGTGGT- 3')] (Volf *et al.*, 2006)]. A reação de amplificação incluiu 25ng/uL de DNA genômico, 7pmoles dos primers foward e reverse, 10mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA Polimerase, 50 mM de MgCl₂ e 1x de tampão de PCR (200 mM Tris, pH 8,4, 500 mM KCl). Inicialmente, as condições de amplificação foram otimizadas por meio de um gradiente de temperaturas de anelamento, variando de 54°C-62°C. As melhores condições de amplificação foram selecionadas (58° C para *Rex1* e 56° C para *Rex3*) e novos rounds de amplificação foram realizados.

Uma vez isolados, os produtos das amplificações a partir do DNA genômico de *H. regani* foram purificados utilizando o *EasyPure Quick Gel Extraction Kit* seguindo recomendações do fabricante e então inseridas no vetor p-JET1.2/Blunt 2974bp utilizando o kit *CloneJET PCR Cloning kit* (Thermo Scientific). Os vetores recombinantes foram utilizados para a transformação de células competentes de *Escherichia coli TOP10* utilizando o método de choque-térmico, de acordo com recomendações do fabricante. Os clones selecionados foram utilizados para a extração de plasmidial, segundo o método de *mini-prep* descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

O DNA plasmidial obtido foi utilizado para o sequenciamento bidirecional do inserto e para o preparo de sondas para os experimentos de hibridação in situ fluorescente (FISH). Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados através da precipitação com etanol 80%, seguido de centrifugação a 15000g por 5 min. Em seguida, os produtos precipitados foram lavados com etanol 70% e novamente submetidos à centrifugação. Após secos, os

precipitados obtidos foram ressuspensos em *loading dye* (*Blue-Dextran-EDTA/Formamida* (1:5), desnaturados por 3 minutos a 94°C e aplicados em um sequenciador automático. A sequência obtida foi editada com o auxílio do software Bioedit (<http://www.jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Mapeamento de sequências repetitivas por meio de Hibridação in situ Fluorescente (FISH)

Elementos retrotransponíveis Rex1 e Rex3

As sequências de DNA foram obtidas dos plasmídeos recombinantes e marcadas por PCR utilizando 11-digoxigenin-dUTP. As sondas foram precipitadas na presença de DNA de timo de bezerro (110 ng/μL) e ressuspensas em meio de hibridação (50% formamida, 20xSSC, 10% dextran sulfato). Os experimentos de hibridação foram baseados no protocolo de alta estricção (77%) descrito por Traut *et al.*, (2001), onde foi adotada a técnica de hibridização de Lapierre *et al.*, (1998) com as seguintes modificações: as lâminas foram fixadas com metanol e ácido acético na proporção 3:1 e reidratadas em 2xSSC e triton 0,1% por 15 minutos em temperatura ambiente, posteriormente, foram lavadas em 2xSSC (1 minuto) e a estabilização da estrutura da cromatina foi feita em formaldeído 1%, 2xSSC por 1 minuto e enxaguadas duas vezes em 2xSSC e em seguida desidratadas em série alcoólica (álcool 70%, 80% e 96%). A desnaturação das lâminas foi realizada em formamida deionizada 70%, 2xSSC por 3 minutos em banho maria a 72°C e seguida de nova desidratação. Para a hibridação, cada lâmina recebeu uma concentração final de 50ng/μL de sonda. Após 72h de hibridação as lâminas foram lavadas em banhos sequenciais de triton 1%, seguido de lavagem em 0.1xSSC, 1% Tritonx100 a 62° em banho maria com agitação, e por 5 minutos em 2xSSC, 1% Tritonx100 a temperatura ambiente. A detecção foi realizada com o anticorpo antidigoxigenina conjugado com rodamina e contracoloradas com DAPI.

-Sondas de repetições microssatélites e teloméricas

Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos $CA_{(15)}$ e $GA_{(15)}$ marcados diretamente com o fluorocromo Cy5 (Sigma Aldrich) na extremidade 5' durante a

síntese. Os experimentos de hibridação foram realizados, baseado no protocolo Kubat *et al.*, (2008). Já as repetições teloméricas (TTAGGG)_n foram produzidas pela amplificação dos primers teloméricos F (5' TTAGGG 3') e telomérico R (5' CCCTAA 3') e o produto dessa amplificação foi diretamente marcado pela incorporação de 11-digoxigenin-dUTP, seguindo o protocolo disponível em Guerra (2012). As hibridações foram realizados com base no protocolo de Traut *et al.*, (2001) conforme descrito acima.

Resultados

Hypostomus regani

Os dois cariomorfos são reconhecidos a partir de um heteromorfismo de tamanho e morfologia entre os homólogos do par 19 desse cariótipo, par cromossômico de morfologia subtelocêntrica na condição homomórfica (cariomorfo A) (Figura 1A), enquanto que nos espécimes portadores do cariomorfo B esse par cromossômico é constituído por um dos homólogos de morfologia subtelocêntrica e seu homólogo exibindo morfologia metacêntrica (19') (Figura 1B), o par 10 mostrou-se Ag-NOR positivo. Tal heteromorfismo não teve relação com o sexo do indivíduo analisado e é claramente detectado pela coloração convencional com Giemsa. O bandamento C seguido de coloração com iodeto de propídeo revelou um proeminente bloco heterocromático que ocupa totalmente o braço curto do cromossomo metacêntrico 19' o qual mostrou-se DAPI-negativo e positivo para CMA₃ (Figura 1D), condição não observada nas metáfases de espécimes portadores do cariomorfo A (Figura 1C), apresentando este, um par com forte marcação heterocromática na região subterminal, também DAPI-negativo e CMA₃-positivo.

O mapeamento de repetições microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ nos cariótipos revelaram sinais de hibridação em *clusters*, principalmente, nas regiões subterminais, além de sinais intersticiais nos pares 9, 16 e 27 detectados pela sonda (CA)₁₅ (Figura 2A e 2B) e nos pares 5, 9, 11, 12, 13, 14, 18, 19', 20, 26 e 30 detectados pela sonda (GA)₁₅ (Figura 2C e 2D), com a intensidade dos sinais variável. O par cromossômico heteromórfico apresentou sinais de hibridação com as sondas de microssatélites, no entanto, esses sinais diferiram entre seus homólogos e apesar de ambos apresentarem marcações da sonda (CA)₁₅ na

região subterminal dos braços longos, o braço heterocromático do 19' (metacêntrico) apresentou uma marcação adicional em sua região intersticial (Figura 2F). Já a sonda (GA)₁₅ revelou sinais de hibridação na região subterminal e na região pericentromérica dos braços longos de ambos homólogos, além de detectar um sinal na região subterminal dos braços curtos do cromossomo metacêntrico (Figura 2G). Como esperado, sinais de hibridação com a sonda de repetições teloméricas foram detectados exclusivamente nas porções subterminais dos cromossomos em ambos cariomorfos de *H. regani* (Figura 2H).

Fragmentos do elemento *Rex1* e *Rex3* foram obtidos do DNA de *H. regani* e apresentaram aproximadamente 500pb.

O mapeamento físico das sondas dos retroelementos *Rex1* e *Rex3* revelaram sinais de fluorescência com intensidade variável na maioria dos cromossomos de ambos cariomorfos analisados. Sinais em *clusters* foram observados utilizando a sonda de *Rex1* na região subterminal dos pares metacêntricos 1 e 3, nos submetacêntricos pares 7 e 10, nos subteloecêntricos 19, 21 e 22 e nos acrocêntricos 27, 29 e 30; foram observados fortes sinais na região centromérica nos pares 19, 21, 23 e 27. Adicionalmente, a sonda *Rex1* detectou marcações intersticiais nos homólogos dos pares 1, 7 e 8, porém com pouca intensidade (Figura 3A e 3B). Já os experimentos utilizando a sonda *Rex3* os sinais observados também aparecem em cluster, com destaque para a região centromérica dos pares 21, 23, 26, 30 e 32 e no cromossomo heteromórfico (19') na região subterminal do braço curto (Figura 3C e 3D). Nos pares 21, 23 e 30 as marcações centroméricas aparece tanto em *Rex1* quanto em *Rex3*, assim como a marcação em cluster na região subterminal no braço curto do cromossomo heteromórfico (19').

Sinais de hibridação revelaram a presença de marcação de *Rex1* pontual na região subterminal e pericentromérica dos braços longos de ambos os homólogos do par 19' além de uma marcação na região intersticial dos braços curtos detectada somente no cromossomo heteromórfico (19') (Figura 3B). Essas marcações foram coincidentes com os sinais obtidos pela hibridação com a sonda de repetições (CA)₁₅.

Já nos experimentos de hibridação com a sonda *Rex3* foi detectada uma forte marcação próximo a região subterminal do braço curto, também exclusivamente observada no cromossomo 19' (Figura 3D).

Cariótipo de *Hypostomus albopunctatus* e *Hypostomus aff paulinus*

Os espécimes da população de *H. albopunctatus* analisados apresentaram um cariótipo constituído de $2n=74$ e fórmula cariotípica $8m+14sm+16st+36a$ (Figura 4A). O padrão de bandamento C revelou regiões heterocromáticas com forte marcação na região centromérica nos cromossomos dos pares 1, 5, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 30 e 32, além de marcações nas regiões subterminais, com destaque para os pares 7, 12, 23 e 25 (Figura 4B). Coloração com fluorocromos DAPI/CMA₃ revelaram riqueza de bases G:C no bloco heterocromático observados na região subterminal dos braços longos dos homólogos dos pares 30 (Figura 4C). O aparente heteromorfismo observado no par 30 foi observado em um indivíduo da população analisada e está relacionado com um heteromorfismo de tamanho da NOR nesse cromossomo, uma vez que essa região foi detectada pela técnica de impregnação pela prata (Figura 4B).

Os experimentos de FISH utilizando sonda de repetições teloméricas revelou marcações apenas nas regiões dos telômeros, sem a presença de ITs (Figura 4D).

O mapeamento cromossômico de sondas de repetições microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ no cariótipo de *H. albopunctatus* revelaram clusters dessas repetições na maioria dos cromossomos do cariótipo, concentrados principalmente nas regiões subterminais e centroméricas. Em (CA)₁₅, os pares 25 e 30, apresentaram marcação na região centromérica com forte intensidade (Figura 5A) e o par 25 também apresentou forte marcação nesta região com (GA)₁₅. Os pares 7 e 10, revelaram marcações com a sonda (GA)₁₅ na região pericentromérica nos braços longos de ambos os homólogos dos pares em questão (Figura 5B). Com relação ao FISH com sondas dos retroelementos de *Rex1* e *Rex3*, foram evidenciados sinais de hibridação com ambas as sondas. Nos experimentos utilizando a sonda de *Rex1* os sinais com as marcações mais fortes tiveram concentração principalmente na região subterminal nos braços longos dos cromossomos, com destaque para os cromossomos

submetacêntricos do par 5 que apresentaram marcação coincidente com ambas sondas de microssatélite (Figura 5C). Já nos experimentos de FISH com a sonda do elemento *Rex3*, também observamos sinais de hibridação na região subterminal dos braços longos do par 5 e na maioria dos cromossomos, principalmente nos acrocêntricos na região centromérica e subterminal do braço longo. Adicionalmente, uma forte marcação subterminal nos braços longos par acrocêntrico 25 foi coincidente com a região heterocromática evidenciada pelo bandamento C (Figura 5D).

O cariótipo de *H. aff paulinus* apresentou $2n= 76$ cromossomos, com fórmula cariotípica constituída de $10m+14sm+24st+28a$ (Figura 6A). O padrão de bandamento C revelou o par 13 praticamente heterocromático, além de fortes marcações heterocromáticas nas regiões subterminais dos braços longos dos pares 25 e 28, e nas regiões centroméricas dos pares 1, 8, 14 e 19 (Figura 6B). Na coloração com DAPI, os pares 13 e 25 revelaram blocos DAPI-positivo na região subterminal dos braços longos desses homólogos. Já os homólogos do par 28 apresentaram na marcação DAPI-negativo e CMA₃-positivo na região subterminal dos braços longos desse cromossomo (Figura 6C). O método de impregnação pela prata detectou sítios de NOR na região subterminal do braço longo do par 28. FISH com repetições teloméricas detectados, como esperado, nas regiões subterminais de todos os pares cromossômicos sem a presença de marcações adicionais ao longo dos cromossomos. (Figura 6D).

Com relação as sondas de microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ sinais de hibridação foram observados principalmente nas regiões subterminais e alguns sinais intersticiais variando a intensidade. Em (CA)₁₅ a marcação nas regiões intersticiais se destaca nos braços longos dos pares 6, 8 e 9, além de fortes sinais na região centromérica dos pares 22, 31 e 32 e na região subterminal do braços longos dos homólogos dos pares 1, 17 e 34 (Figura 7A). Em (GA)₁₅ foi evidenciado uma marcação pericentromérica nos braços longos dos pares 7 e 8, fortes sinais nas regiões subterminais dos braços longos dos pares 9, 18, 20, 21, 24, 29, 31 e 33, além de marcações na região centromérica dos pares 14, 16, 35 e 36 (Figura 7B). Sinais de hibridação com a sonda do retroelemento *Rex1* foram detectados no cariótipo de *Hypostomus aff paulinus*, como observado na região subterminal dos homólogos do par 7, coincidente com a marcação detectada

com a sonda (CA)₁₅, além de sinais de hibridação detectados na região centromérica dos cromossomos acrocêntricos do par 22, também coincidente com as marcações detectadas pela sonda (CA)₁₅ (Figura 7C).

O FISH com sondas do retrolemento *Rex3* revelou fortes marcações centroméricas nos homólogos do par 32 (acrocêntrico) e coincide com a marcação de (CA)₁₅ observada nesse par. Sinais de hibridação na região, subterminal dos braços longos do par 31 e discreta marcação centromérica também foi detectada pela sonda de *Rex3*, sendo nesse caso coincidente com a marcação previamente detectada pela sonda (GA)₁₅. Marcações pericentroméricas detectadas no par 8 com a sonda de *Rex3* também coincidem com (GA)₁₅ enquanto que no par 7, a marcação subterminal coincide com a marcação de (CA)₁₅ (Figura 7D).

DISCUSSÃO

Hypostomus regani apresenta uma estabilidade quanto ao seu número diploide ($2n=72$ cromossomos) em todas as populações previamente analisadas (Artoni e Bertollo, 1996; Rubert *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2012, 2013), entretanto, as fórmulas cariotípicas difere entre as populações, com NF variando de 92 a 102. De acordo com Lorscheider *et al.*, (2015). *H. regani* é uma espécie que migra curtas distâncias, o que torna restrito o fluxo gênico entre as diferentes populações, e devido a este comportamento é possível existir espécies crípticas atualmente sob essa denominação, no entanto essa questão deve ser futuramente avaliado por meio de ferramentas mais resolutivas. No entanto, este comportamento de baixa vagilidade poderia favorecer a origem e manutenção de polimorfismos cromossômicos, como os detectados em *H. regani* do rio Taquari (MS).

A utilização de marcadores cromossômicos clássicos (bandamento C, NOR, fluorocromo CMA₃, DNAr 18S e 5S) e de experimentos de FISH a partir da microdissecção do metacêntrico variante (Ferreira, 2016), associados aos dados mapeamento de elementos retrotransponíveis (*Rex1* e *Rex 3*) e de repetições microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ apresentados aqui, permitiram melhor

compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação dos cariomorfos A e B encontrados em *H. regani*.

A distribuição em clusters dos elementos *Rex1* e *Rex3* nos cariomorfos de *H. regani* difere do padrão observado em outras espécies do gênero, como em *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus* e *H. strigaticeps* (Pansonato-Alves *et al.*, 2013) nas quais esses elementos são mapeados dispersos no genoma das espécies. Assim como observado em *H. regani*, Pansonato-Alves *et al.*, (2013) também detectou marcações desses elementos principalmente em regiões heterocromáticas dos cariótipos de *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus*, além de uma co-localização com os sítios de DNAr 5S nessa última espécie. Os elementos *Rex1* no genoma de *H. regani* confirmaram a homologia entre os cromossomos heteromórficos do par 19', evidência obtida pela marcação pontual detectada na região subterminal e na pericentromérica dos braços longos de ambos os dos homólogos.

Nossos achados revelaram ainda a presença de elementos de retrotransposição *Rex1* e *Rex3* como principais constituintes da heterocromatina dos braços curtos do cromossomo 19' de *H. regani*, em que ocorre maior concentração de marcações do elemento *Rex3*, ocupando desde sua região intersticial até a subterminal desses braços cromossômicos. Isso pode ser a explicação para o heteromorfismo de tamanho entre esses homólogos. Nossa hipótese é de que a inserção desses elementos tenha levado a um aumento no número de cópias das sequências retrotransponíveis via amplificação. Uma hipótese alternativa para a origem desse heteromorfismo pode ser devido à ocorrência de rearranjos cromossômicos, e/ou via recombinação ectópica ou crossing-over desigual, causadas por essas sequências repetitivas presente no genoma (Bouneau *et al.*, 2003; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2013). Apoiando essa hipótese, destacamos que esses elementos estão distribuídos em poucos cromossomos ao longo o genoma, e que poderia ter servido como fonte de sequências repetitivas para a diversificação desse cromossomo heteromórfico (Hikosaka e Kawahara, 2004; Voltolin *et al.*, 2013).

Nos espécimes de *H. albopunctatus* (coletados no Ribeirão Andirá- Ourizona-PR) o $2n=74$ cromossomos e fórmula cariotípica composta de $8m+14sm+16st+36a$ coincide com dados prévios reportados por Bueno *et al.*,

(2013) (Rio Piquiri-PR). Contudo, existe uma variação interpopulacional na constituição cariotípica em relação as descrições de outras populações: 10m+20sm+44st/a para a população do Rio Mogiguaçu- pertencente a bacia do Rio Mogiguaçu- Pirassununga (SP), (Artoni e Bertollo, 1996) e 10m+20sm+16st+28a para a população do rio Corumbataí, pertencente a bacia do Rio Piracicaba do estado de São Paulo (Alves *et al.*, 2012). A NOR analisada no presente estudo coincide com o padrão de NOR de Bueno *et al.*, (2013) como sendo simples e coincidente com a marcação de CMA₃ positivo e difere na descrita por Artoni e Bertollo (1996) que reporta NOR múltipla para as populações analisadas. Estes dados refletem parte da complexidade taxonômica do gênero *Hypostomus* e sugerem a necessidade de uma reavaliação do status taxonômico das populações de ambas as bacias hidrográficas atualmente atribuídas á essa denominação, uma vez que tal variação cromossômica pode sugerir entidades taxonômica distintas nessas populações biogeograficamente isoladas.

Os espécimes coletados no Ribeirão Andirá – Ourizona-PR, foram previamente identificados como *Hypostomus* aff. *paulinus* baseado apenas em morfologia externa e distribuição geográfica. Nossas análises citogenéticas revelaram 2n=76, semelhante a espécie de *H. paulinus* oriundos do Ribeirão Três Bocas- Londrina-PR (Rubert *et al.*, 2011), do Rio Corumbataí- SP (Alves *et al.*, 2012) e das populações do Rio Keller, Rio Mourão e Ribeirão Atlântico – PR (Kamei, 2015), todas pertencentes a bacia do rio Paraná. Um sistema de NOR múltipla foi identificado em nossa população coincidente com as oriundas do Rio Keller e Rio Mourão reportadas por Kamei (2015) o que possivelmente corrobore a ideia de tratarem-se de uma mesma entidade taxonômica. Entretanto, um cariótipo com 2n=74 cromossomos foi reportado para a população de *Hypostomus* aff. *paulinus* proveniente do Rio Piquiri-PR (Bueno *et al.*,2011) e outra sem identificação do local de coleta descrita por Michelle *et al.*, (1977). Já Lorscheider *et al.* (2015) reporta uma população de *H. paulinus*, provenientes do Rio Mogiguaçu - Pirassununga (SP) pertencente a bacia hidrográfica do Rio Mogiguaçu, como portador de 2n=72 cromossomos. Os distintos números diplóides e fórmulas cariotípicas registrados para *H. paulinus* demonstram uma grande complexidade taxonômica nesta espécie sendo necessária uma ampla

revisão da mesma, uma vez que possivelmente mais de uma entidade taxonômica possa existir sob essa mesma nomenclatura.

A maior concentração de *Rex1* e *Rex3* no genoma das populações de *H. albopunctatus* e *Hypostomus* aff. *paulinus*, assim como em *H. regani*, coincide com regiões heterocromáticas detectadas nos cromossomos, como já reportados em outras espécies do gênero, como observado em *H. ancistroides*, *H. strigaticeps* e *H. nigromaculatus* (Pansonato-Alves *et al.*, 2013) e em outros grupos de Teleostei (Da Silva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Ozouf-Costaz *et al.*, 2004; Mazzuchelli e Martins, 2009; Teixeira *et al.*, 2009; Yano, *et al.*, 2014; Favarato *et al.*, 2016B; Santos *et al.*, 2016). A associação entre as marcações de elementos de transposição coincidentes com as porções heterocromáticas detectadas principalmente nas regiões subterminais e pericentromérica dos cromossomos das três espécies de *Hypostomus* analisadas parece não ser fato aleatório (Valente *et al.*, 2016). Diferentes estudos (Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2013) tem apontado semelhante padrão de distribuição desses elementos ao longo dos genomas, e atribuem essa característica à função estrutural relacionada a manutenção e segregação do material nuclear. Devido ao fato dessas porções cromossômicas possuírem baixa frequência de recombinação pelo seu reduzido conteúdo gênico, a dinâmica evolutiva dessas sequências favorece o acúmulo de repetições após os eventos de transposição, não sendo eliminados pela recombinação, assim, satDNAs surgem e contribuem diretamente na ampliação de regiões heterocromáticas no genoma, fato denominado de heterocromatinização, principalmente pelo fato de ocorrer inserções de elementos transponíveis/retrotransponíveis nesses sítios repetitivos (Mestrovic *et al.*, 2015).

Com frequência, observamos uma inter-relação entre os sinais de hibridação das sondas de repetições microssatélites e dos elementos de retrotransposição, especialmente quando comparamos as marcações de *Rex3* e a repetição (CA)₁₅ observadas nos cariótipos estudados, como destacado em *H. albopunctatus* e *Hypostomus* aff. *paulinus*. Evidências apontam para uma possível origem de algumas classes de DNA repetitivo a partir de ETs (Ahmed e Liang 2012), sendo observadas sequências repetitivas originadas de um único

ETs (Gong *et al.*, 2012; Mestrovic *et al.*, 2015), de diferentes ETs combinados (Agudo *et al.*, 1999; Mestrovic *et al.*, 2015) ou ainda de combinações de ETs com outras sequências genômicas (Shang *et al.*, 2010; Mestrovic *et al.*, 2015). A co-localização entre esses elementos pode sugerir uma origem comum entre esses elementos repetitivos. Sustentamos nossa hipótese baseados nos dados descritos por Ahmed e Liang (2012), que identificaram que cerca de 25% dos DNAs satélites (satDNA) presentes no genoma humano são derivados de ETS e que, onde sua co-localização cromossômica frequentemente é reportada. Outra hipótese a ser testada no futuro pode ser atribuída à presença de repetições interna (CA)₁₅ na sequência nucleotídica desses elementos de transposição, fato não explorado no presente estudo, uma vez que trabalhamos apenas com um fragmento desse elemento e não com sua sequência nucleotídica completa.

Outra característica interessante observada nos cariótipos em análise está relacionada com a maior concentração de repetições microssatélite encontradas na região centromérica de cromossomos acrocêntricos das três espécies analisadas, principalmente ao que se refere as marcações (CA)₁₅. Também coincidentes com blocos de heterocromatina, detectados pelo bandamento C, a presença dessas marcações pode fornecer interessantes informações sobre a dispersão desses elementos no genoma. O posicionamento dos cromossomos dentro do núcleo interfásico durante a meiose poderia facilitar eventos de dispersão de sequências repetitivas via recombinação não-homóloga, especialmente tratando-se de porções centroméricas e subteloméricas de cromossomos acrocêntricos, tal como sugerido por Schweizer and Loidl (1987) para explicar a dispersão de heterocromatina. Para essa teoria, a conformação dos cromossomos durante a prófase meiótica, onde os cromossomos estão ligados através de seus telômeros ao envoltório nuclear (conformação de “buquê”) poderia favorecer a proximidade dos centrômeros, principalmente dos acrocêntricos, e assim a similaridade entre as sequências repetitivas presentes nessas regiões (ETs e microssatélites) favoreceria a recombinação não-homóloga nessas regiões (Adega *et al.*, 2008).

Por outro lado, o acúmulo de sequências de DNA repetitivo tem sido reportado em sítios propensos à rearranjos cromossômicos, dando instabilidade

por atuarem como substrato para recombinação não-homóloga ou fissões cromossômicas (Cazaux et al., 2011). Autores tem sugerido que essas regiões podem se comportar como sítios propensos para quebras cromossômicas (*fragile breakage model*; Peng et al. 2006). Nós encontramos uma relação entre o aumento do número de cromossomos acrocêntricos seguido da maior frequência de marcações de repetições microssatélites (CA)₁₅ nas regiões centroméricas de todos os acrocêntricos de *H. albopunctatus*. Ao mesmo tempo em que a ordens dos eventos não possam ser confirmados com precisão (ganhos de sequências repetitivas após fissões *versus* fissões devido à presença dessas sequências), esse acúmulo de sequências repetitivas nas porções subterminais desses cromossomos acrocêntricos claramente reforçam o papel dos DNAs repetitivos na evolução cromossômica do grupo. A otimização desses traços cromossômicos em uma filogenia robusta do gênero pode ser bastante resolutiva para uma futura avaliação dessa natureza.

CONCLUSÃO

Nossas análises citogenéticas contribuem com mais informações acerca da evolução cromossômica de *Hypostomus*, bem como a diversidade cariotípica intra-específica neste grupo. A diferença cromossômica, tanto numérica quanto estrutural nos espécimes atribuídos a *Hypostomus* aff. *paulinus*, levantam a questão da necessidade de uma avaliação mais detalhada sobre seu real status taxonômico e reforçam a necessidade de uma avaliação mais ampla nesse que pode se tratar de um complexo de espécies. Nossos dados fornecem evidências da participação dos elementos de retrotransposição (*REX1* e *REX3*) como fonte de sequências para a diferenciação do cromossomo 19' encontrado em *H. regani*, principalmente pelo enriquecimento de *Rex3* na região heterocromática, que contribuem para a origem deste heteromorfismo. A co-localização entre os retrotransposons e microssatélites como constituintes da heterocromatina no cariótipo das espécies analisadas, reforçam a hipótese de que essas sequências repetitivas, quando presente no genoma, favorecem a diversificação cariotípica ao longo da evolução do grupo, tornando o gênero *Hypostomus* um interessante modelo para futuros estudos sobre a dinâmica evolutiva desses elementos repetitivos na modulação do genoma das espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adega F, Chaves R and Guedes-Pinto H (2008) *Suiformes orthologous orthogous* satellite DNAs as a hallmark of *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari* (Tayassuidae) evolutionary rearrangements. *Micron*, 39:1281-1287.

Agudo M, Losada A and Abad JP (1999) Centromeres from telomeres? The centromeric region of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a tandem array of telomeric HeT-A- and TART-related sequences. *Nucleic Acids Res* 27:3318–3324.

Ahmed I, Liang Y, Schools S, Dawson VL, Dawson TM and Savitt JM (2012) Development and characterization of a new Parkinson's disease model resulting from impaired autophagy. *J Neurosci*. Nov 46:16503-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0209-12.2012.

Alves AL, Borba RS, Oliveira C, Nirchio M, Angel Granado A and Foresti F. (2012) Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *CompCytogen* 4: 443–452 Doi: 10.3897/CompCytogen.v6i4.4028 www.pensoft.net/journals/compcytogen.

Artoni RF and Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, and Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 81–90.

Artoni RF and Bertollo LAC (2001) Trends in the karyotype evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). *Hereditas* 3:201-1.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*. 1:103–120.

Bitencourt JA, Affonso PRA, Giuliano-Caetano L and Dias AL (2011) Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Gunther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. *Neotrop Ichth* 9:317–324

Borba RS, Zawadzki CH, Oliveira C, Perdices A, Parise-Maltempi PP and Alves AL (2013) Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, 1:111-116.

Bouneau L, Fisher C, Ozouf-Costaz C, Froschauer A, Jaillon O, Coutanceau JP, *et al* (2003) An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res.* 13:1686-95

Bruschi DP, Busin CS, Siqueira S and Recco-Pimentel, SM (2012) Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). *Hereditas (Lund) JCR* 149: 34-40.

Bueno V, Zawadzki CH and Margarido VP (2012) Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacepede, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev Fish Biol Fish* 22:241–250. doi: 10.1007/s11160-011-9215-9

Bueno V, Zawadzki CH, Venere PC and Margarido VP (2013) Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacepede, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Rev Fish Biol Fish*. doi:10.1007/s11160-012-9280-8

Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJP and Britton-Davidian J (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evolutionary Biology* 11:124.

Chalopin D, Volf JN, Galiana D, Anderson JL and Scharl M (2015) Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosome Res* 23:545–560 DOI 10.1007/s10577-015-9490-8.

Cioffi MB, Kejnovsky E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D and Bertollo LA (2012) The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet* 5: 28

Cioffi MB, Martins C and Bertollo LA (2010) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol* 10:271

Cioffi MB, Bertollo LAC, Villa MA, Oliveira EA, Tanomtong A, Yano CF, Supiwong W and Chaveerach A (2015) Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and its Implications for the Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes). *PLOS ONE*. 6:0130199.

Cioffi MB, Liehr T, Trifonov V, Molina WF and Bertollo LAC (2013) Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: A molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenetic and Genome Research*. 141: 186-194

da Silva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J and Roest Crollius H (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:1636-41.

Dimitry A, Chistiakov AB, Bart Hellemans B, Filip AM and Volckaert (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1–29.

EndoKS , Martinez ERM , Zawadzki CH, Paiva LRS and Júlio Júnior HF (2012) Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. Acta Scientiarum. Biological Sciences 34:181-189 Doi: 10.4025/actascibiolsci.v34i2.9318.

Favarato RM, Ribeiro LB, Feldberg E and Matoso DA (2016A) Chromosomal mapping of transposable elements of the *Rex* family in the bristlenose catfish, *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae), from the Amazonian region. Journal of Heredity Advance.

Favarato RM, Silva M, de Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E and Matoso DA (2016B) Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). Zebrafish 13:103–111.

Ferreira G (2016) Estudos citogenéticos em duas espécies de *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae) da bacia do rio paraguai: considerações citotaxonomicas e evolutivas. Tese de Doutorado.

Ferreira DC, Oliveira C and Forest F (2011) Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). Cytogenet Genome Res 132:64–70. doi:10.1159/000319620

Fischer C, Bouneau L, Coutenceau JP, Weissenbach J, Voff JN and Ozouf-Costaz C (2004) Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. Gene. 336:175-83.

Froese R and Pauly D. Editors (2017) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (10/2017).

Gong Z, Wu Y, Koblizkova A et al (2012) Repeatless and repeatbased centromeres in potato: Implications for centromere evolution. *Plant Cell* 24:3559–3574

Guerra M (2012) *Citogenética Molecular: Protocolos Comentados*. SBG 1

Hikosaka A and Kawahara A (2004) Lineage-specific tandem repeats riding on a transposable element of MITE in *Xenopus* evolution: a new mechanism for creating simple sequence repeats. *J Mol Evol.* 6:738-46.

Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014–1015. Doi: 10.1007/BF01953855

Kamei M (2015) Análise citogenética em espécies do gênero *Hypostomus* lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) de afluentes da bacia do alto Rio Paraná – PR, Brasil: uma contribuição a diversidade cariotípica do gênero. Tese de Doutorado.

Kamei M,¹ Baumgartner L, Paiva S, Zawadzki C, Martins-Santos I, Brito Portela-Castro A (2017) Chromosomal Diversity of Three Species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: A Species Complex in *Hypostomus ancistroides* Reinforced by a ZZ/ZW Sex Chromosome System. *Zebrafish.* 14:4. DOI: 10.1089/zeb.2017.1429.

Kubat Z, Hobza R, Vyskot B and Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* DOI: 10.1139/G08-024 . Source: PubMed.

Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, Shibatta OA, Pavanelli CS and Casatti L (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotrop.* 7:181–197. doi: 10.1590/S1676-06032007000300020

Lapierre LA, Casey JW and Holzschu DL (1998) Walleye Retroviruses Associated with Skin Tumors and hyperplasias encode cyclin D homologs. *J Virol.* 72(11):8765-71.

Lorscheider CA, Zawadzki CH, Vicari MR, Martins-Santos IC and Artoni RF (2015) Karyotypic diversity of the armoured catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) in the context of its occurrence and distribution. *J Fish Biol* 1:1–12

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O and Margarido VP (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem* 87: 33–438.

Martinez ERM, Zawadzki Foresti F and Oliveira C (2011) Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genet Mol Biol* 4:562–568. doi: 10.1590/51415-47572011005000038

Mazzuchelli J and Martins C (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*.

Mendes-Neto EO, Vicari MR, Artoni RF and Moreira-Filho O (2011) Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Lhering 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brasil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. *Comp Cytogenet* 2:133–142. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i2.964.

Meštrović N; Mravinac B; Pavlek M; Vojvoda-Zeljko T; Šatović E and Plohl M (2015) Structural and functional liaisons between transposable elements and

satellite DNAs. *Chromosome Res* 23:583–596. DOI 10.1007/s10577-015-9483-7.

Michele JL, Takahashi CS and Ferrari I (1977) Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 42:539–54.

Nascimento J, Baldo D, Lourenço L (2015) First insights on the retroelement *Rex1* in the cytogenetics of frogs. *Molecular Cytogenetics*. 8:86 DOI 10.1186/s13039-015-0189-5.

Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau JP and Volff JN (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the 115 non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science*. 16:51-57.

Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C and Foresti F (2013) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fish*; 23:477–489.

Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LA, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB (2014) Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 142: 40–45.

Rubert M, da Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC and Giuliano-Caetano L (2011) Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comparative Cytogenetics* 5: 397–410. Doi: 10.3897/CompCytogen.v5i5.1589

Rubert M, Zawadzki CH and Giuliano-Caetano L (2008) Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes, Loricariidae). *Neotrop Ichthyol* 6:93–100. doi:10.1590/51679-62252008000100011

Rubert M, Rosa R, Zawadzki CH, Mariotto S, Moreira-Filho O and Giuliano-Caetano L (2016) Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* Species (Siluriformes, Loricariidae): Diversity analysis of the sites. *Zebrafish* 4:360-8. DOI: 10.1089/zeb.2016.1279.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos FA, Marques DF, Terencio ML, Feldberg E and Rodrigues LRR (2016) Cytogenetic variation of repetitive DNA elements in *Hoplias malabaricus* (Characiformes - Erythrinidae) from white, black and clear water rivers of the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology* 1:40-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0099>.

Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Artoni RF, Vicari MR, Martins C and Feldberg E (2013) Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fisheries*. 4: 1-16.

Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27:190-193.

Schweizer D, Loidl J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosome Today* 1987; 9:61–74

Shang WH, Hori T, Toyoda, Kato J, Popendorf K, Sakakibara Y, Fujiyama A and Fukagawa T (2010) Chickens possess centromeres with both extended tandem repeats and short non-tandem-repetitive sequences. *Genome Res* 20:1219– 12287

Sumner, A. T (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 1:304-306.

Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC and Martins M (2009) Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenet Genome Res* 2009, 125:224–234

Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Barros AV, Artoni RF and Moreira-Filho O (2013) Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research*. 1:463-471.

Traut W, Eickhoff U and Schorch J-C (2001) Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci*; 23:155–161.

Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA and Martins C (2011) Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenet Genome Res* 133:34–42. Doi: 10.1159/000322888

Valente G, Kocher T, Eickbush T, Simões RP and Martins C (2016) Integrated cytogenetics and genomics analysis of transposable elements in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Molecular genetics and genomics* 3: 1219-1225.

Vanzela ALL, Swarcz AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, Ives J. and Giuliano-Caetano L (2002) Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia* 67: 9–13.

Volff JN (2006) Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays*, 28:913–922.

Volff JN, Korting C, Scharl M (2000) Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Mol Bio Evol*, 17:1673–1684.

Volff JN, Korting C, Sweeney K and Scharl M (1999) The non-LTR *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*. 16:1427-1438.

Voltolin TA, Mendonça BB, Ferreira DC, Senhorini JA, Foresti F and Porto-Foresti F. (2013) Chromosomal location of retrotransposable *Rex 1* in the genomes in five *Prochilodus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) species. *Mobile Genetic Elements*.

Xu, DD, Lou B, Bertollo LA and Cioffi MB (2013) Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome. *Mol. Cytogenet.* 6, 12.

Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T and Cioffi MB (2014) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *PLoS One* 9: e90946.

LEGENDAS DAS FIGURAS

FIGURA 1: Cromossomos metafásicos de *H. regani* de espécimes portadores do cariomorfo A (**A**, **C** e **E**) e do cariomorfo B (**B**, **D** e **F**) submetidos a coloração com giemsa (**A**, **B**), ao bandamentos C (**C**, **D**) e a coloração com os fluorocromos DAPI/CMA3 (**E**, **F**). As setas indicam o par heteromórfico 19'.

FIGURA 2: Cariótipos de *H. regani* de espécimes portadores do cariomorfo A (**A** e **C**) e do cariomorfo B (**B** e **D**) submetidos ao método de FISH com sondas de repetições microssatélites (CA)₁₅ (**A** e **B**) e (GA)₁₅ (**C**, **D**). Em (**E**) cariomorfo B hibridizado com sonda telomérica. Em (**F**, **G**) destaque para o par cromossômico heteromórfico 19' e representação esquemática da co-localização dos sinais de hibridação com as sondas (CA)₁₅ (**F**) e (GA)₁₅ (**G**) na região subterminal dos braços longos; (**H**) Marcação telomérica apenas na região subterminal de ambos os cromossomos homólogos do par heteromórfico.

FIGURA 3: Cariótipos de *H. regani* de espécimes portadores do cariomorfo A (**A** e **C**) e do cariomorfo B (**B** e **D**) submetidos ao método de FISH com as sondas dos elementos retrotransponíveis *Rex1* (**A** e **B**) e *Rex3* (**C** e **D**). Em destaque, o par heteromórfico 19' e suas marcações (box na direita em **B** e **D**).

FIGURA 4: Cariótipos de *H. albopunctatus* (exemplar 674) submetido a coloração com giemsa (**A**), ao bandamentos com banda C seguido de coloração com iodeto de propídio (**B**). Note em (**B**) o par cromossômico portador da NOR, detectada pelo método de impregnação pela Prata. Cromossomos submetidos à dupla coração com fluorocromos DAPI/CMA₃ (**C**) e ao método de FISH utilizando sonda telomérica (**D**).

FIGURA 5: Cariótipos de *H. albopunctatus* (exemplar 679) de FISH com sonda de microssatélite (CA)₁₅ (**A**) e (GA)₁₅ (**B**); Metáfases de FISH com sonda do elemento retrotransponível *Rex1* (**C**) e *Rex3* (**D**).

FIGURA 6: Cariótipo de *Hypostomus* aff. *paulinus* submetidos a técnica de coloração por giemsa (**A**) e ao bandamento com banda C (**B**) com destaque para

o box contendo os pares da NOR 9, 20 e 28; Metáfase de dupla coloração com fluorocromos DAPI/CMA₃ (C) com destaque para os pares 13 e 25, que são DAPI positivo e para o par 28, sendo este CMA₃ positivo; e FISH com sonda telomérica (D).

FIGURA 7: Metáfases de *Hypostomus aff. paulinus* com FISH com sonda de microssatélite (CA)₁₅ (A) e (GA)₁₅ (B); FISH com sonda de elemento retrotransponível *Rex1* (C) com destaque para os pares 7 e 22; e *Rex3* (D) com destaque para os pares 7, 8, 31 e 32.

Figura 1

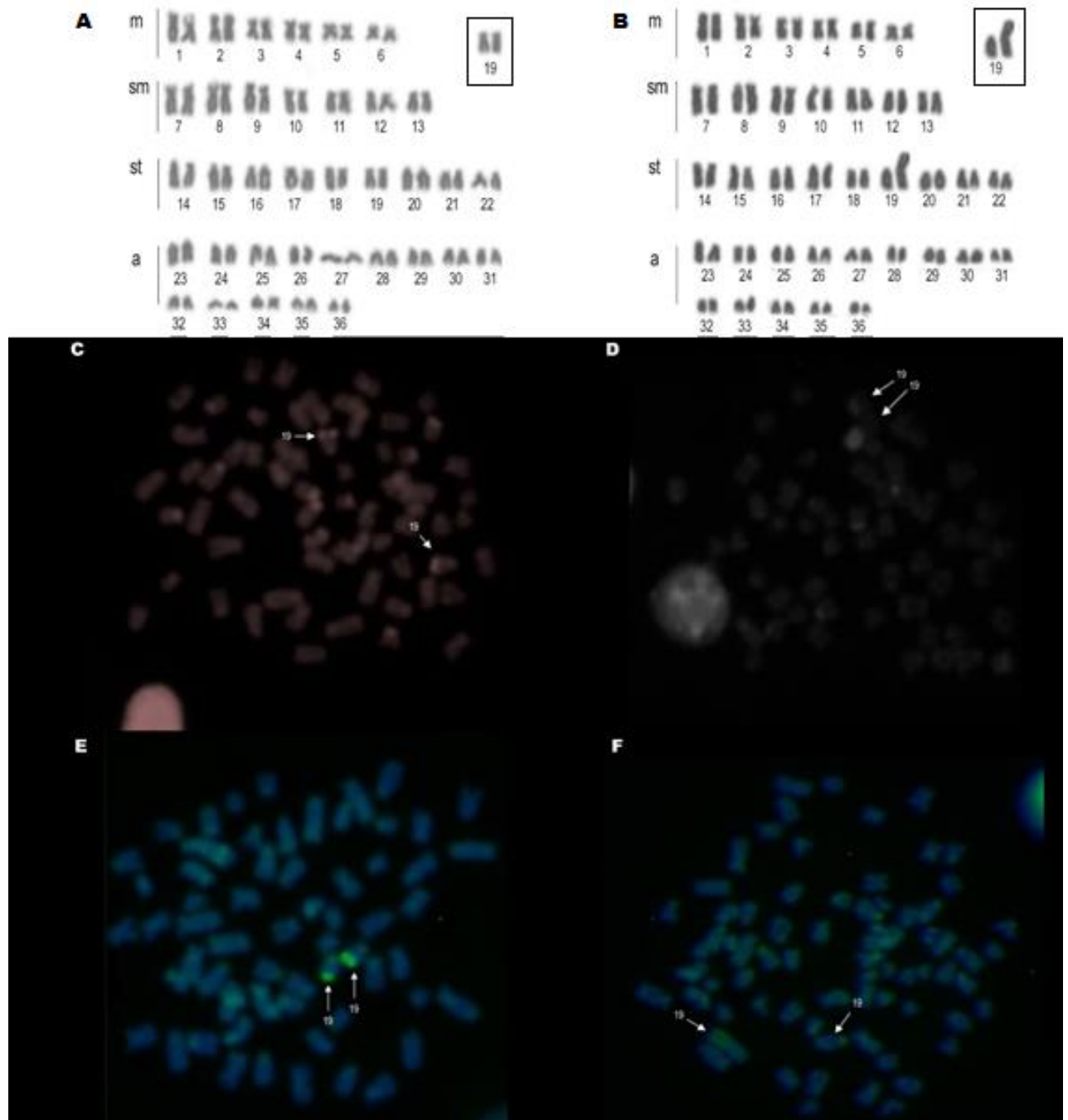


Figura 2

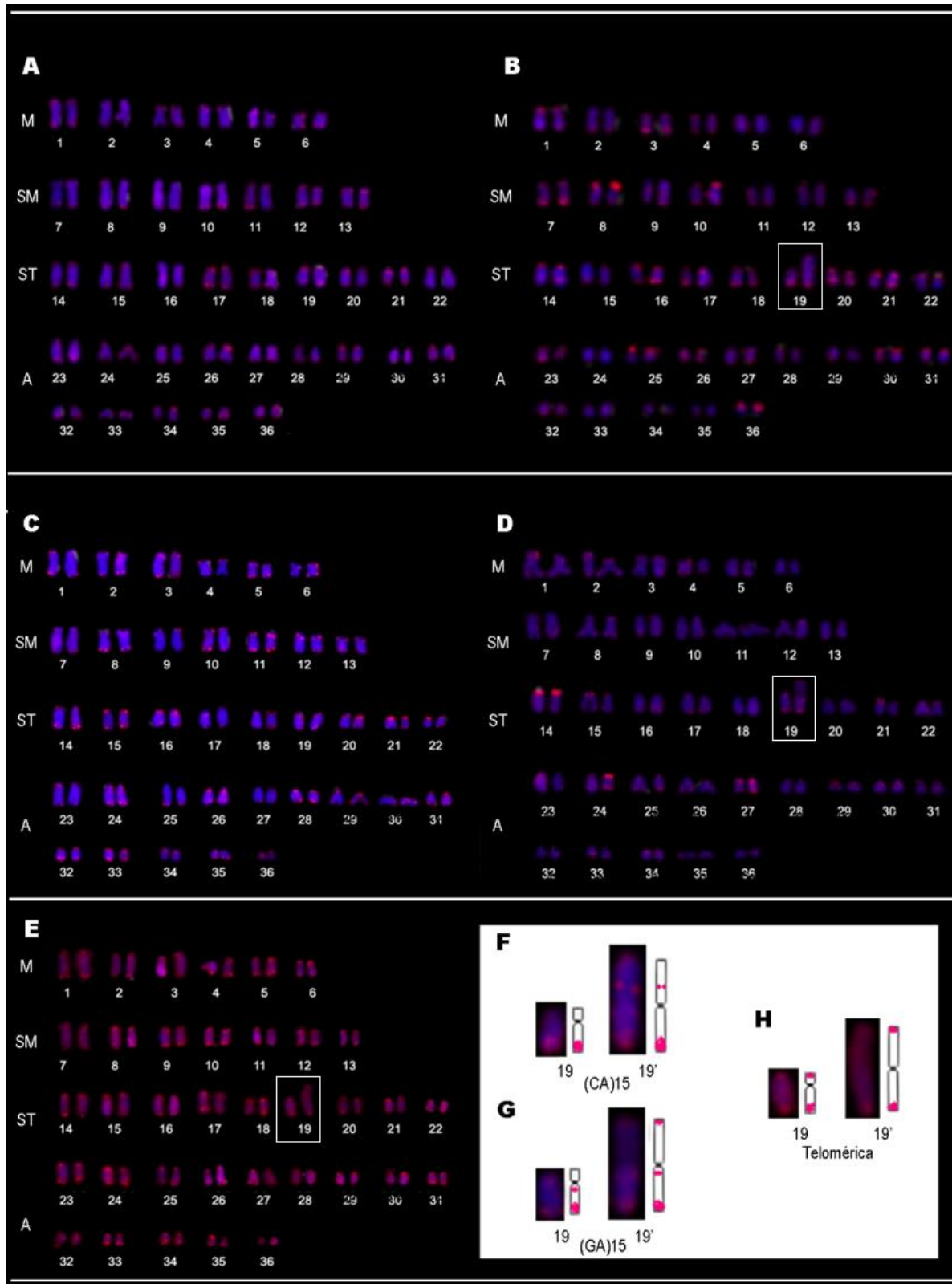


Figura 3

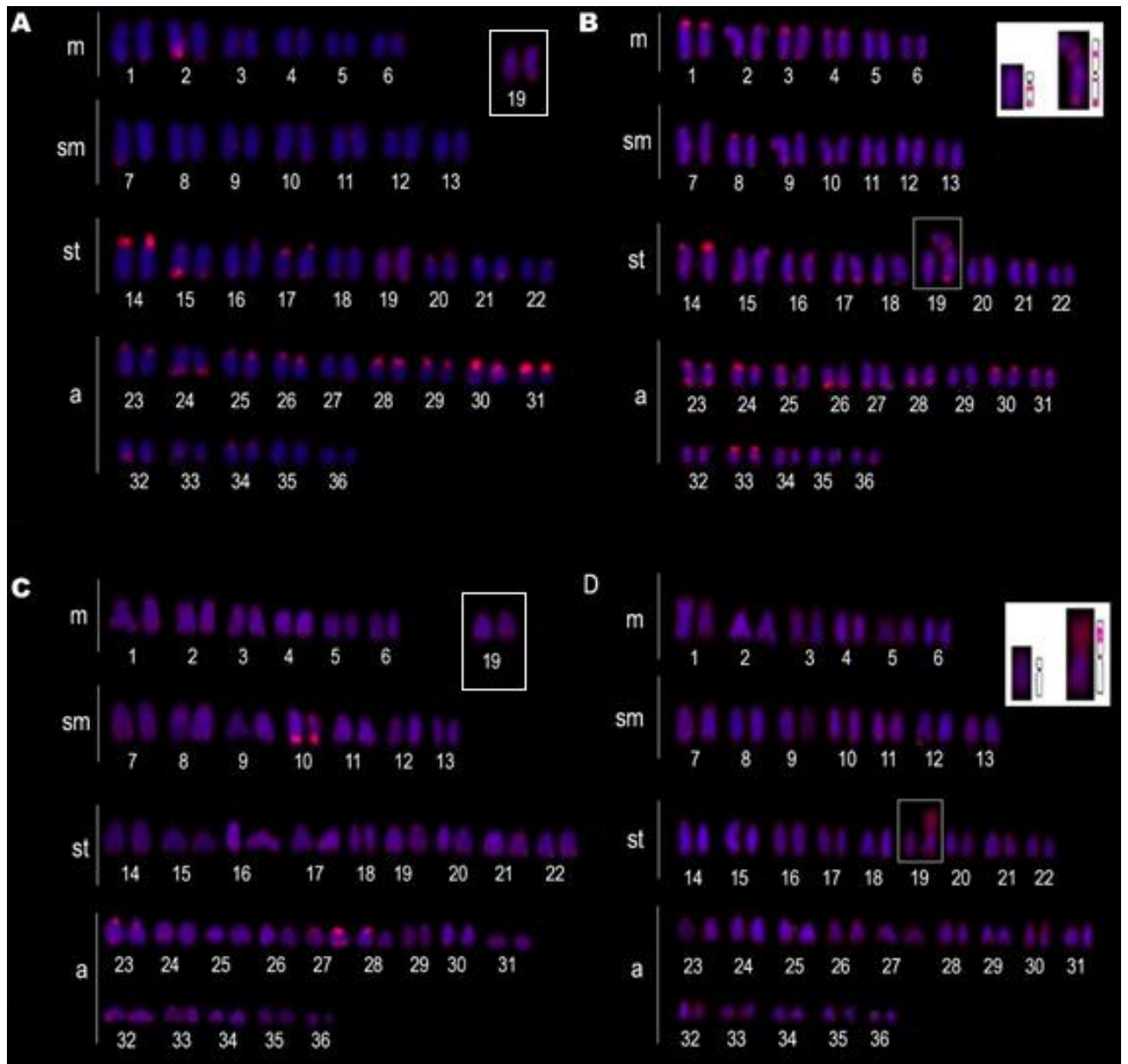


Figura 4

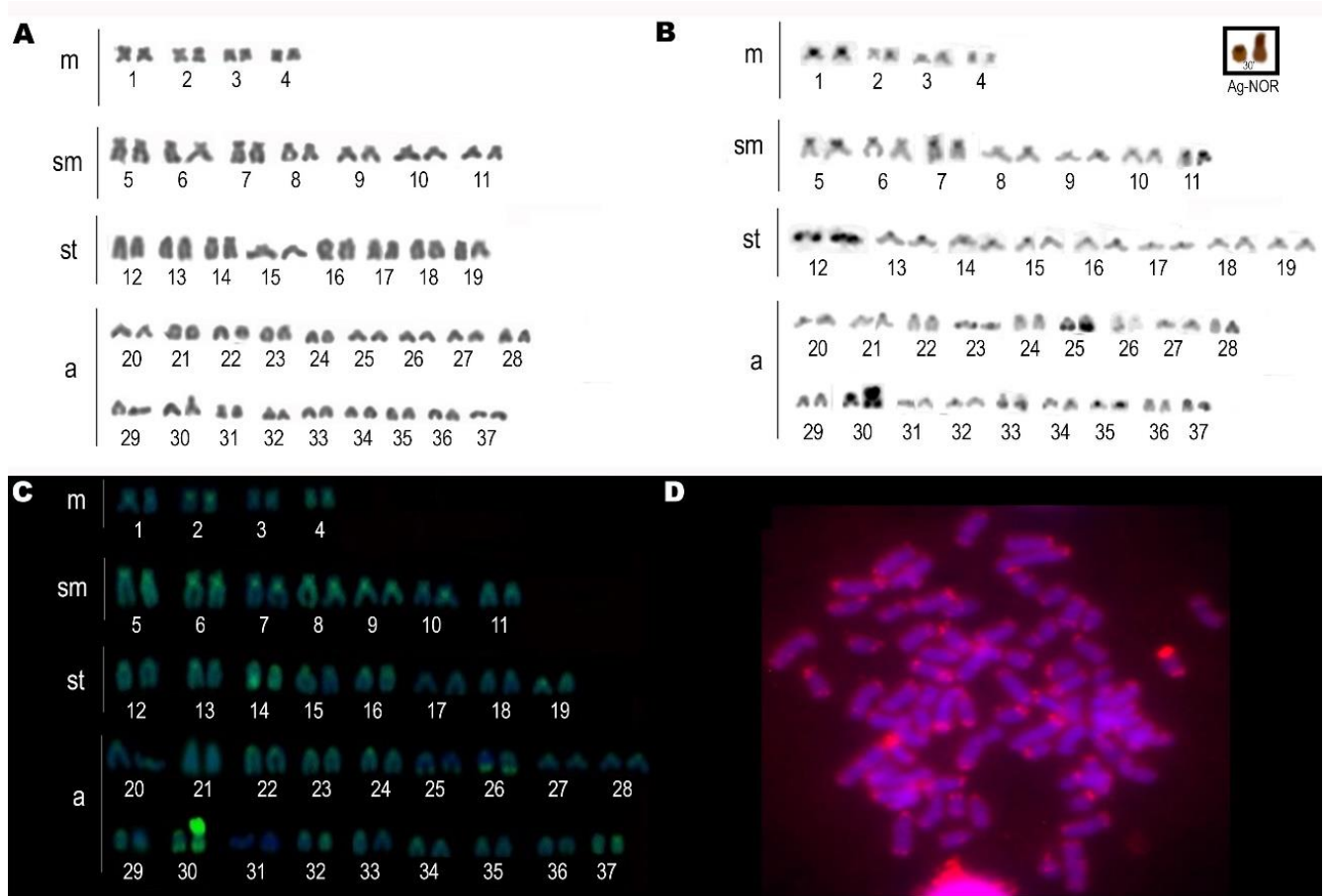


Figura 5

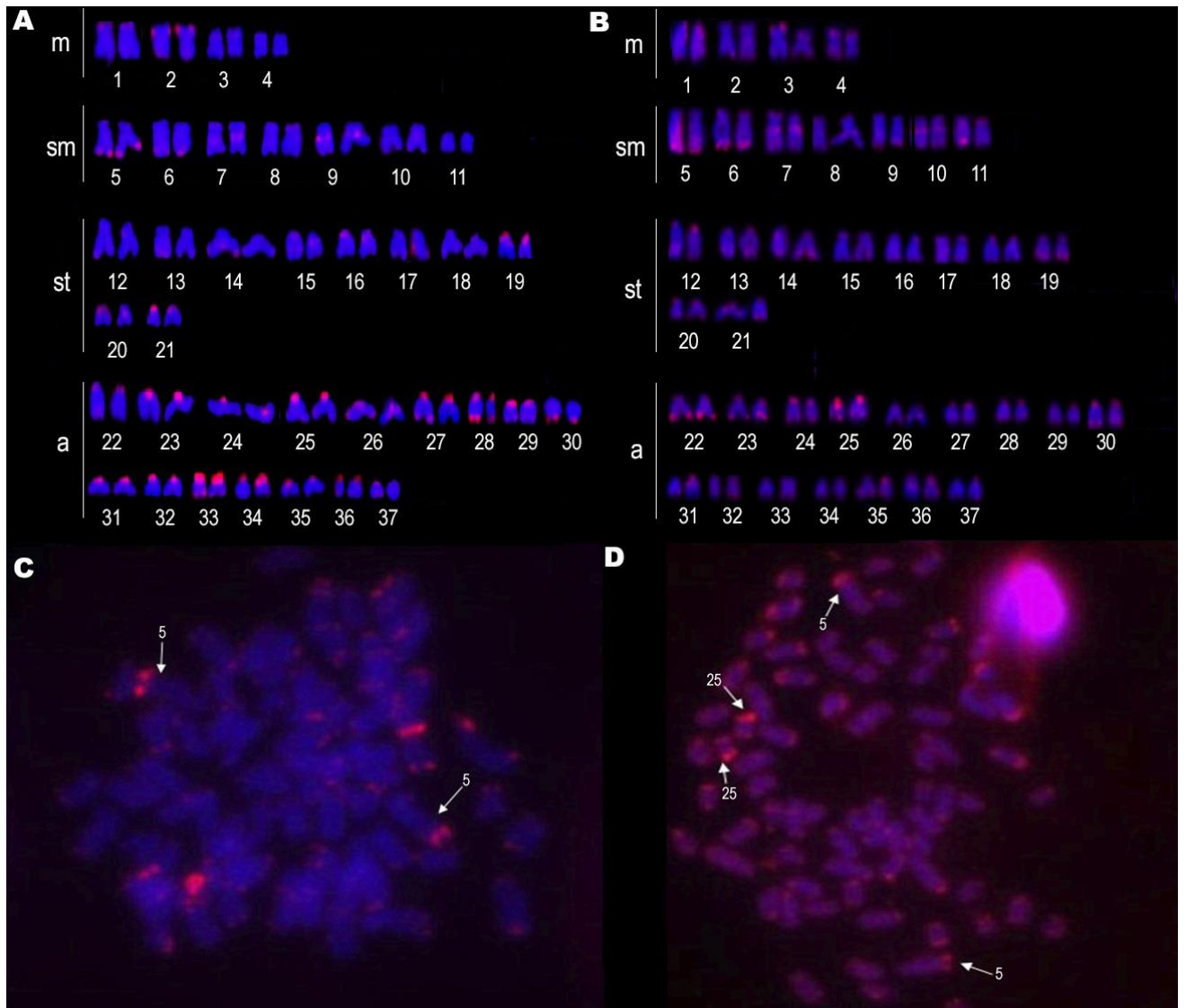


Figura 6

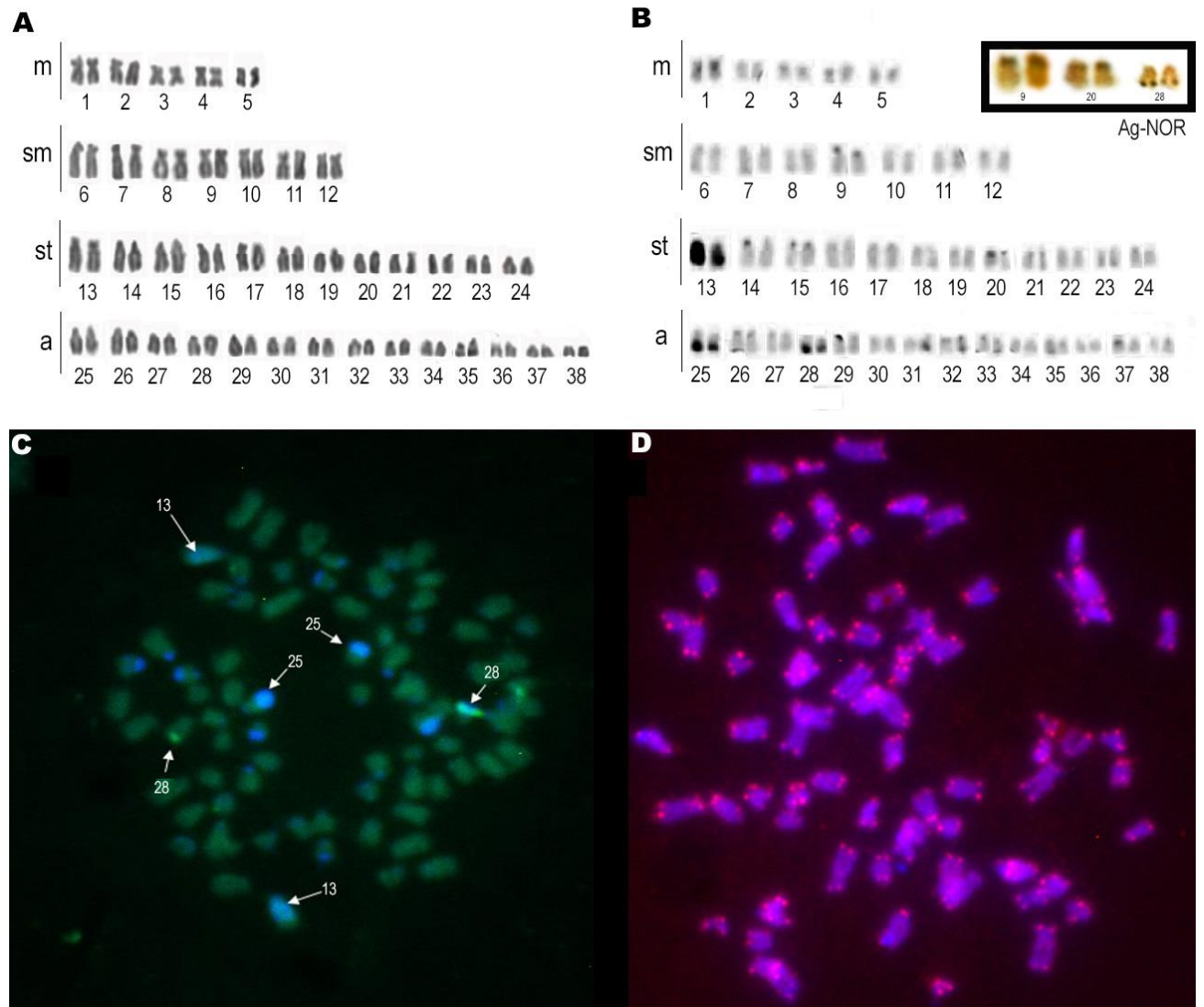


Figura 7

