



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)

**ISOLAMENTO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DO
GENOMA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ancistrus*
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**

Keteryne Rodrigues da Silva

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Março - 2016

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**ISOLAMENTO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DO
GENOMA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ancistrus*
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**

Keteryne Rodrigues da Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a PATRICIA PASQUALI PARISE-MALTEMPI

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).**

**Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 2016**

575.1 Silva, Keteryne Rodrigues da
S586i Isolamento de sequências repetitivas do genoma de
espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) /
Keteryne Rodrigues da Silva. - Rio Claro, 2016
99 f. : il., figs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Patricia Pasquali Parise Maltempi

1. Genética. 2. DNA satélite. 3. Transposon. 4.
Cromossomo sexual. 5. Sequenciamento genômico. 6.
Mapeamento cromossômico. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais Maria e Benedito
pelo apoio e dedicação de sempre!

Agradecimentos

Nenhuma batalha é vencida sozinha. Ao longo dessa conquista tive a sorte de ter pessoas especiais ao meu lado que me deram a mão e me ajudaram a chegar aqui. Aproveito para agradecer:

Primeiramente a **Deus** que me deu força para mais uma caminhada e que me permitiu mais uma conquista, com fé, saúde, sabedoria e muito amor.

Minha mãe, **Maria**, que com todo seu amor de “mãe coruja” soube quando me pôr embaixo de suas asas e quando me deixar voar; que sempre me apoiou em todas minhas decisões; que sempre teve paciência para minha impaciência. Meu PAIdastro, **Benedito**, que sempre me conduziu pelo caminho da sabedoria, esclarecendo minhas dúvidas e questionando minhas certezas e que, assim como minha mãe, sempre me apoiou em minhas decisões. Um me aprisiona, outro me liberta, ambos procurando o meu melhor. Eu amo vocês.

Meus familiares que sempre demonstraram orgulho por mim, mas que na verdade são o meu orgulho. Eu tenho os melhores, também amo vocês.

Meu namorado, **Josimar**, que além de muito carinho me deu muita força nos momentos que mais precisei, teve muita paciência e sempre foi muito companheiro. Eu te amo.

Minha professora, orientadora e amiga **Patricia Pasquali Parise-Maltempi** que em uma parceria que dura mais de 5 anos, sempre me orientou com muita sabedoria, dedicação, carinho e compreensão. Só tenho a agradecer pela confiança e amizade.

Meus amigos de laboratório, **Rafael (Mão)**, **Flávia (Flavictha)**, **Allison (Xuxu)**, **Carol** e **Nahanna**, que tornaram o ambiente de trabalho ainda mais agradável com a amizade e carinho de cada um.

Aos colegas de laboratório, **Diogo (Dioguinho)** e **Octavio**, que por tantas vezes esclareceram minhas dúvidas, me dando todo apoio técnico com muita paciência e dedicação. Assim como, **Profº Dr Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello** que também me deu todo apoio técnico e ajudou a construir este trabalho.

A **Profª Drª Sandra Mariotto** e **Profº Dr Liano Centofante**, colaboradores deste trabalho, que foram de extrema importância para execução do mesmo.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPQ)** pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”**

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O DNA pode estar organizado no genoma em sequências de cópias únicas e em sequências que se repetem várias vezes, denominadas sequências repetitivas. Estas sequências são constituídas basicamente por repetições em tandem (satélites, minissatélites e microssatélites) ou dispersas (transposons ou retrotransposons), e parecem estar envolvidas em diversos eventos celulares importantes, como por exemplo nos processos de replicação do DNA, de recombinação, de expressão gênica e de evolução dos cromossomos, auxiliando na manutenção e propagação do material genético celular. Em nível cromossômico parecem ser responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em diversos grupos. O gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) apresenta atualmente 68 espécies nominais, e uma enorme quantidade de espécies ainda não identificadas. Alguns trabalhos vêm utilizando sequências repetitivas também em análises citogenéticas e moleculares para identificação de cromossomos homólogos e marcadores cariotípicos interessantes que podem auxiliar os trabalhos de identificação de espécies. Apesar de serem amplamente estudadas em diversos organismos, há ainda muito a ser entendido sobre essas sequências e sua organização no genoma. Este trabalho teve como objetivo isolar sequências repetitivas no genoma de espécies de *Ancistrus*, afim de encontrar possíveis marcadores para o gênero, que pudessem contribuir para o entendimento da taxonomia deste grupo, bem como auxiliar no entendimento do processo de evolução dos cromossomos sexuais dessas espécies. Dentre as sequências isoladas está um transposon da família TC1/mariner que se mostrou presente em todos os cromossomos das espécies analisadas e dois DNAs satélites que se apresentam acumulados em regiões centroméricas de alguns cromossomos. Sendo assim, este estudo resultou em dados que poderão contribuir com o entendimento da evolução cariotípica do gênero *Ancistrus* bem como fornecer mais informações sobre características e evolução dos cromossomos sexuais em peixes.

Palavras-chave: Mapeamento cromossômico, sequenciamento genômico, DNA satélite, Transposon, Cromossomo sexual

ABSTRACT

DNA may be organized in the genome as single copy sequences and as sequences that are repeated several times, called repetitive sequences. These sequences are basically constituted by tandem repeats (satellites, minisatellites and microsatellites) or scattered (transposons and retrotransposons), and seem to be involved in important cellular events such as, DNA replication process, recombination, gene expression and chromosome evolution, assisting in maintenance and spread the genetic material of cells. At chromosome level, seems to be significant proportions of karyotypic variations observed in several groups. The genus *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) has, actually, 68 nominal species and several species not identified yet. Repetitive sequences have been used in molecular cytogenetic analysis for identification of homologous chromosomes and interesting karyotypic markers that can assist in species identification works. Despite being widely studied in several organisms, there is still much to be understood about these sequences and their organization in the genome. This study aimed to isolate repetitive sequences in the genome of *Ancistrus* species in order to find possible markers for the genus, which could contribute to the understanding of the taxonomy of this group and to the understanding of the process of evolution of sex chromosomes of these species. Among the isolated sequences, there is a family of TC1/mariner transposon that showed to be present in all the chromosomes of the analyzed species, and two satellites DNAs that have accumulated in centromeric regions. Thus, this study resulted in data that could be contribute to understanding the karyotype evolution of *Ancistrus* genus as well as providing more information on the characteristics and evolution of sex chromosomes in fish.

Key Words: Chromossomal mapping, genome sequence, satellite DNA, transposon, sex chromosome.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. MATERIAL	21
3.2. MÉTODOS.....	22
3.2.1 Extração de DNA de Tecidos Sólidos	23
3.2.3 Clonagem.....	25
3.2.4 Amplificação do DNA via PCR	27
3.2.5 Sequenciamento.....	29
3.2.6 Análise das sequências	29
3.2.7 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	30
4. RESULTADOS	33
4.1 Capítulo I: Characterization of a Tc1-like transposon in the Catfish, <i>Ancistrus</i> genera (Siluriformes: Loricariidae).....	34
4.2 Capítulo II: Mapeamento cromossômico de dois DNAs satélites (peri)centroméricos no genoma de espécies de <i>Ancistrus sp</i> (Siluriformes: Loricariidae).....	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6. REFERÊNCIAS	80
6. ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Sequências repetitivas

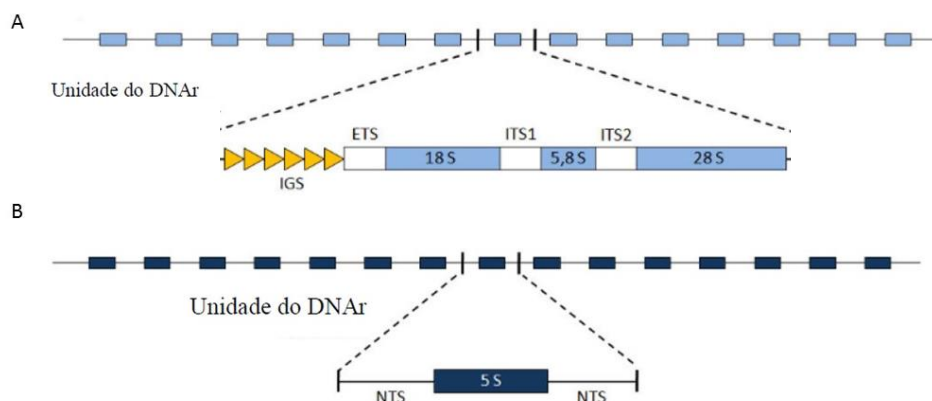
Diferentes espécies dos mais diversos grupos de eucariotos apresentam grande variação na quantidade de DNA, e esta variação não apresenta relação com a quantidade de genes apresentados e ocorre independentemente da complexidade do organismo (GREGORY, 2005). Esta ampla variação na quantidade de DNA nos genomas vem sendo atribuída a diferentes quantidades de DNAs repetitivos (DOOLITTLE; SAPIENZA, 1980; CAVALIER-SMITH, 1985; KIDWELL, 2002; GREGORY et al., 2007).

DNAs repetitivos são sequências de DNA que se repetem diversas vezes, constituindo grandes frações do genoma eucarioto. Em plantas e anfíbios, podem representar até 80% do genoma (LEWIN, 2014) e 50% ou mais do genoma humano (THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM, 2001). Os DNAs repetitivos podem ser classificados, de acordo com suas principais características, em sequências codificantes e não-codificantes, sendo as sequências codificantes representadas pelas famílias multigênicas que estão envolvidas na codificação de importantes proteínas e RNAs, e as não-codificantes representadas por sequências que apresentam repetições em tandem, tais como DNAs satélite (satDNA), minissatélites e microssatélites e sequências que apresentam repetições dispersas ao longo do genoma, como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994).

As famílias multigênicas são sequências de DNA (genes) que apresentam similaridade estrutural e funcional, originados a partir de um gene ancestral comum (NEI; ROONEY, 2005). Dentre estas sequências, os genes que transcrevem os RNAs ribossomais (RNAr) são constituídos de sequências nucleotídicas muito conservadas evolutivamente e podem ser encontradas em todos os eucariotas organizadas em dois distintos grupos arranjados em tandem. O maior arranjo (DNAr 45S) é formado pelos genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S. Estes genes são separados por espaçadores intergênicos transcritos internos (ITS-*Internal Transcribed Spacer*), e cada cluster de DNAr 45S separado por espaçadores transcritos externos (ETS-*External Transcribed Spacer*) e por espaçadores intergênicos (IGS – *Intergenic Spacer*), e encontram-se em regiões cromossômicas específicas correspondentes às regiões organizadoras de nucléolos (RONs) (Figura 1) (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).

O outro arranjo é formado pelas sequências dos genes que transcrevem o RNAr 5S. Estes genes são bastante conservados e espaçados por sequências não transcritas (NTS-*Non Transcribed Spacer*) que são extremamente variáveis em tamanho e composição nucleotídica, e não está envolvido na formação das RONS (Figura 1) (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007; MARTINS et al., 2010).

Figura 1: Organização dos genes que codificam os RNAs ribossomais 18S, 5.8S, 28S (A) e 5S (B) em eucariotos. A - As posições dos três genes de RNAr (18S, 5.8S, 28S) estão representadas em azul e as regiões processadas estão em branco (ETS = Espaçadores Transcritos Externos; ITS = Espaçadores Transcritos Internos). Entre as unidades de transcrição estão os Espaçadores Intergênicos = IGS. B - NTS =Espaçador Não Transcrito.



Adaptado de Martins et al., 2010.

As sequências repetitivas organizadas em tandem têm sido classificadas de acordo com o comprimento do segmento repetido, sendo então divididas em três classes e identificadas como microsatélites, minissatélites e satélites (Levinson e Gutman 1987). Em geral, os satélites apresentam aproximadamente 100 a 300 pb e o número de cópias pode ser bastante variável. Os minissatélites estão presentes nas regiões eucromáticas dos genomas de vertebrados, invertebrados, fungos e plantas e apresentam aproximadamente 15 a 100 pb, de 1.000 a 5.000 cópias no genoma (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; FARAH, 1997;

DELGADO, 1998). Os microssatélites são geralmente constituídos de 1 a 6 nucleotídeos com repetições em tandem e localizam-se em sua maioria nas regiões não codificantes do genoma, mas também podem ocorrer em regiões codificantes (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER; MAY, 1989; TOTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000). Os elementos transponíveis (TEs), descobertos em 1950 por Bárbara McClintock, são classificados de acordo com o tipo intermediário de transposição, sendo da classe I aqueles que possuem intermediários de RNA e da classe II aqueles cujos intermediários são moléculas de DNA (KIDWELL, 2002). Os retrotransposons, pertencentes a classe I, se propagam através da ação da enzima transcriptase reversa que tem a capacidade de formar um filamento de DNA através de uma molécula RNA. Já os transposons, pertencentes a classe II, representam grande parte das sequências moderadamente repetidas do genoma eucariótico, evoluíram através da capacidade de se replicar fazendo cópias de si mesmos e movendo-se para outras regiões do genoma (FINNEGAN, 1989). Sequências repetitivas também podem estar presentes na eucromatina, rica em genes, podendo causar mutações prejudiciais aos genes. No entanto, são eventualmente eliminadas pela pressão seletiva (DEININGER et al., 2003).

Estudos vêm demonstrando que as sequências repetitivas têm sido recentemente associadas a diversas funções como pode ser visto na revisão realizada por SHAPIRO (2010). Essas funções vão desde importante papel na estrutura dos cromossomos e no mecanismo de manutenção dos telômeros e centrômeros, devido ao fato de que a heterocromatina é encontrada nos centrômeros, telômeros e posições intersticiais ao longo dos braços cromossômicos, e várias proteínas se ligam por afinidade a estas sequências (PARDUE; DEBARYSHE, 2003; WONG; CHOO, 2004), até o envolvimento no processo de replicação do DNA (LI et al., 2002), de recombinação (BIET et al., 1999) e expressão gênica (LIU et al., 2001; PEASTON et al., 2004; HAN; BOEKE, 2005; VOLFF, 2006) e na origem e evolução de cromossomos sexuais e cromossomos supranumerários (LYON, 2000; BACHTROG, 2005, 2006; STEINEMANN; STEINEMANN, 2005; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; MATSUNAGA, 2009; CIOFFI et al., 2010). São ainda utilizadas como marcadores citogenéticos importantes em estudos de evolução, organização do genoma e na identificação de rearranjos cromossômicos em diversos grupos de organismos (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MARTINS, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

O grupo de peixes apresenta em seu genoma todos os tipos de DNAs repetitivos, e muitos trabalhos têm caracterizado este tipo sequência de DNA, descrevendo sua organização no genoma, e a relação destas com diferentes regiões cromossômicas, tais como regiões

centroméricas, teloméricas e regiões consideradas marcadores específicas de cromossomos sexuais e cromossomos B (LANFREDI et al., 2001; MARTINS, 2007; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; FERREIRA; MARTINS, 2008; POLETO; FERREIRA; MARTINS, 2010; VALENTE et al., 2011). Embora já exista na literatura muitos trabalhos envolvendo sequências repetitivas, há ainda muito o que estudar e compreender sobre essas importantes sequências no genoma de peixes, tendo em vista que este constitui um grupo extremamente diversificado que pode evoluir muito rapidamente, os quais representam mais da metade das espécies de vertebrados existentes, sugerindo a presença em seus genomas de poderosas ferramentas evolutivas (OZOUF-COSTAZ et al., 2004).

1.1.1 Elementos transponíveis da família TC1/mariner

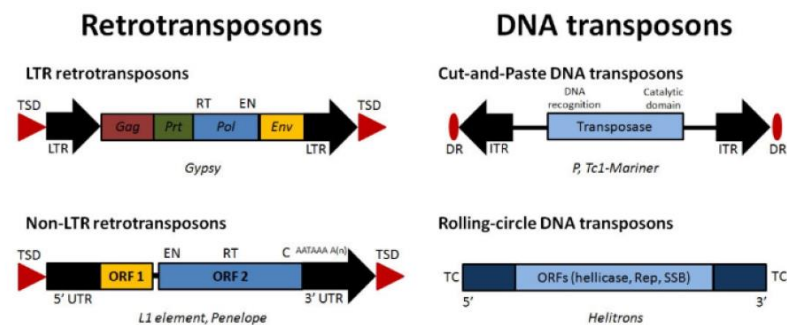
Graças ao avanço nas técnicas de sequenciamento tem sido possível confirmar que os elementos transponíveis dão origem a grande parte dos diversos elementos repetitivos (BÖHNE et al., 2008). A identificação e caracterização destes elementos transponíveis têm sido muito importantes para o estudo de DNA genômico, tendo em vista que esses desempenham papel estrutural e organizacional nos cromossomos, podendo induzir a formação de rearranjos cromossômicos ou atuando na prevenção de perdas teloméricas (CHARLESWORTH, 2001) e possivelmente representam o componente predominante do genoma dos eucariotos (FESCHOTTE, 2004).

Cerca de 40% do genoma humano, 50% do genoma dos primatas, 40% do genoma de rato e camundongo e 34% do genoma de cachorro são constituídos por esses elementos (BÖHNE et al., 2008). Dependendo da família do elemento transponível e da espécie em que ele se encontra, há uma variação no número de cópias no genoma, de 10 a milhares (TAFALLA; ESTEPA; COLL, 2006). Porém, existe uma grande variação entre o número de cópias, distribuição e tipos de elementos transponíveis entre diferentes espécies, decorrentes de fatores como características intrínsecas dos elementos transponíveis (TEs) e as diferentes forças evolutivas que atuam sobre esses (CAPY et al., 1998).

Os transposons são caracterizados pela presença de terminações repetidas invertidas e genes codificando para a enzima transposase (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994). Os mecanismos de transposição variam entre uma classe e outra de transposons, porém o mecanismo mais conhecido é aquele mediado pela transposase que retira

e reintegra a sequência de DNA alvo a uma nova posição no genoma, sendo este mecanismo replicativo ou não (Figura 2). A transposição replicativa é aquela na qual o elemento é copiado, permanecendo uma cópia no sítio original, enquanto a outra é inserida em um novo sítio, contribuindo para um aumento do número de cópias do mesmo. Já na transposição não-replicativa não ocorre um aumento no número de cópia, pois o elemento sai do local de origem e se insere em um novo local (LEWIN, 2004). A sua capacidade de se espalhar em diversas cópias pode ser considerada como uma força motriz para a evolução do genoma e, realmente parece promover a variabilidade deste, o que pode levar a determinar mutações reguladoras e rearranjos cromossômicos (SYVANEN, 1984; CHARLESWORTH et al., 1994).

Figura 2: Esquema representando a estrutura geral dos principais elementos transponíveis.



Adaptado de Martins et al., 2010.

Vários elementos da mesma família são encontrados em diferentes eucariotos, sugerindo que estes divergiram antes mesmo da divergência ocorrida entre a linhagem eucarionte (FESCHOTTE, 2004). Com base na similaridade entre as sequências de transposase e análises filogenéticas, os transposons podem ser classificados em dez famílias: Tc1/mariner, haT, elemento P, MuDR/Fokdback, Cacta, PiggyBac, Pif/Harbinger, Merlin, Transib e Banshee (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). A diversidade de classes de elementos transponíveis presentes no genoma de vertebrados, se dá essencialmente devido a evolução diferencial das famílias de elementos transponíveis, com cenários evolutivos que vão desde a completa extinção destes elementos do genoma até a introdução de uma linhagem específica dos mesmos (BÖHNE et al., 2008).

A descoberta de elementos transponíveis em DNA de eucariotos ocorreu por volta dos anos 50 (RADICE et al., 1994) e, desde então elementos como TC1/mariner têm sido isolados de diferentes espécies de peixes (RADICE et al., 1994; IZSVÁK; IVICS; HACKETT, 1995; IVICS et al., 1996; CAPRIGLIONE et al., 2002; KRASNOV et al., 2005; POCWIERZ-KOTUS; BURZYNSKI; WENNE, 2007; LIU et al., 2009).

Os elementos TC1, primeiramente identificados em invertebrados como *Caenorhabditis elegans*, apresentam em torno de 1600 pb e compartilham estruturas semelhantes, conhecidas como regiões terminais longas invertidas (TIRs) que mostram uma sequência de 6 a 5 pb idênticas em/ou perto das extremidades altamente conservadas (CAGTG/CAGTC) e está amplamente distribuído entre os organismos, desde protozoários até vertebrados (EIDE; ANDERSON, 1985; BREZINSKY et al., 1990; AVANCINI; WALDEN; ROBERTSON, 1996). Acredita-se que devido a diversos eventos de mutações, deleções e inserções que os tornaram componentes permanentes do genoma, a grande maioria encontra-se de forma inativa (MISKEY et al., 2005).

1.1.2 DNAs satélites

Uma das mais importantes regiões do cromossomo é o centrômero, que serve como base para a fixação do cromossomo ao fuso mitótico durante a divisão celular (ROSIC; KOHLER; ERHARDT, 2014). A constituição do centrômero, na maioria dos organismos, é de heterocromatina, muitas vezes referida como heterocromatina centromérica e heterocromatina pericentromérica, sendo essas regiões constituídas de sequências repetitivas, principalmente os DNAs satélites (CARROLL; STRAIGHT, 2006). Vários trabalhos demonstram que a localização dos DNAs satélites coincide com o padrão de bandeamento C dos cromossomos (região de heterocromatina constitutiva) (MIKLOS, 1985; JOHN, 1988; LOHE; HILLIKER; ROBERTS, 1993; LOHE; HILLIKER, 1995).

Os primeiros estudos sobre DNA satélite começaram por volta de 1960, quando cientistas notaram que algumas sequências de nucleotídeos eram frequentemente repetidas, ao observarem o padrão de reassociação da dupla fita de DNA *in vivo* (WARING; BRITTEN, 1966). O termo "DNA satélite" originou-se então pelo fato de que este tipo de sequência foi inicialmente isolado em padrões de bandas satélites em experimentos de ultracentrifugação em

gradiente de densidade de Cloreto de Césio (CsCl), devido à diferença no teor de A + T do resto do DNA genômico, formando frações ou picos diferenciados (satélites) (ALBERTS et al., 2007; SZYBALSKI, 1968).

DNAs satélites (satDNAs) são os componentes mais dinâmicos do genoma eucarioto e, caracterizam-se por apresentar repetições em tandem de aproximadamente 100 a 300 pb, em geral, com centenas ou milhares de cópias. Geralmente estão localizados nas regiões terminais e centroméricas e constituem o principal componente da heterocromatina (YUNIS; YASMINEH, 1971; MIKLOS, 1985; JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993; SHAPIRO; VON STERNBERG, 2005), porém alguns satélites são específicos de determinados cromossomos, como por exemplo de cromossomos sexuais ou cromossomos B (MESTRINER et al., 2000; PHILLIPS, 2001; STEIN; PHILLIPS; DEVLIN, 2001; ZIEGLER et al., 2003).

Em geral, sequências repetitivas deste tipo apresentam alta identidade intraespecífica e baixa identidade interespecífica. Isto significa que as repetições não estão evoluindo de forma independente uma da outra entre os genomas (DOVER, 1986).

A alta homogeneidade intraespecífica dessas repetições se dá pela evolução não-independente dos monômeros, denominada “Evolução em Concerto” dos monômeros, na qual as mutações são homogeneizadas em todos os membros de uma família, e concomitantemente fixadas dentro de um grupo de organismos ligados reprodutivamente (DOVER, 1982, 1986). O princípio da evolução em concerto das sequências repetitivas é baseado em diferentes mecanismos de deslizamento de replicação (*slippage*), círculo rolante de replicação, mecanismos de conversão semelhante ou algum outro mecanismo inexplicável em um tempo evolutivo relativamente curto, *cossing-over* desigual e conversão gênica (DOVER, 1982; OHTA; DOVER, 1984; revisado por CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994). Estes processos são mais eficientes dentro de subgrupos de DNAs satélites quando comparado com sequências localizadas em matrizes do mesmo cromossomo (DOVER, 1986), e por causa dessa diferença na taxa de homogeneização, monômeros adjacentes apresentam um maior grau de similaridade de sequência do que aqueles que se encontram em matrizes cromossômicas (WILLARD; WAYE, 1987; DURFY; WILLARD, 1989; SCHINDELHAUER, 2002; HALL, 2005; ROIZES, 2006). Sendo assim, o resultado final da evolução em concerto é uma maior homogeneidade de repetição dentro de linhagens (populações, subespécies, espécies, etc.) do que entre elas (DOVER, 1982; RUDD; WRAY; WILLARD, 2006; ELLINGSEN; SLAMOVITS; ROSSI, 2007).

Essas sequências podem sofrer alteração do número de cópias, mesmo entre espécies intimamente relacionadas, e este fenômeno pode ser acompanhado por alterações na sequência de nucleotídeos (UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002; CARABALLO; BELLUSCIO; ROSSI, 2010; PLOHL; METROVIC; MRAVINAC, 2012). Sendo assim, as famílias de DNA satélite podem distinguir entre si de acordo com a composição nucleotídica, tamanho da unidade de repetição, complexidade da sequência e tamanho das unidades de repetição (PLOHL; METROVIC; MRAVINAC, 2012).

Existem muitos trabalhos que abordam a estrutura, localização e variabilidade dos satDnas (SAITO; EDPALINA; ABE, 2007; PLOHL et al., 2008; BUSSIEK et al., 2009; LARRACUENTE, 2014; VITTORAZZI; LOURENÇO; RECCO-PIMENTEL, 2014) e, embora alguns deles tragam hipóteses a respeito da função desses elementos, esta ainda não está claramente definida. Devido as suas “limitações” funcionais, foi proposto que a taxa evolutiva do DNA satélite seja rápida (WICHMAN, 1991), tornando-as valiosa ferramenta para estudos taxonômicos (BACHMANN et al., 1993) e das relações evolutivas entre espécies relacionadas (ARNASON; GRÉTARSDÓTTIR; WIDEGREN, 1992) Garrido-Ramos et al. 1994, 1995 e 1999; Robles et al., (2004); Viñas et al., 2004. No entanto, nos últimos dez anos, um número crescente de estudos abordam evidências de que DNAs satélites possam ser transcricionalmente ativos (revisto por UGARKOVIC, 2005; UGARKOVIĆ, 2011; ENUKASHVILY; PONOMARTSEV, 2013).

CHARLESWORTH; LANGLEY; STEPHAN (1986) propuseram que a distribuição dos satDnas nos cromossomos é decorrente de um equilíbrio evolutivo entre a deriva genética, a seleção natural e a pressão de mutações. WILLARD (1998) e KOCH (2000) acreditam que o α -satélite humano exerce um papel no funcionamento dos centrômeros, e CSINK; HENIKOFF (1998) propuseram que os satDnas exercem uma função na manutenção de regiões que se replicam tardiamente, garantindo assim que o centrômero seja a última região a ser replicada. Já CHOO (2000) acredita que essas sequências não são necessárias para o centrômero tendo em vista que, em diversos organismos, desde fungos a mamíferos, essas sequências não se apresentam de forma conservada, sugerindo que não exista uma sequência nucleotídica de centrômeros conservada. Porém, trabalhos de MESTRINER et al. (2000), DE JESUS et al., 2003, MANTOVANI; MESTRINER; MOREIRA-FILHO (2004)(DE JESUS et al., 2003) por exemplo, demonstram a importância do DNA satélite como uma ferramenta para o esclarecimento da caracterização e evolução cariotípica.

1.2 Considerações gerais sobre a ordem Siluriformes, com destaque para a família

Loricariidae

Os peixes compreendem um dos maiores e mais diversificados grupos dentre os vertebrados, encontrados em praticamente todos os tipos de corpos de água doce e salgada do planeta (NELSON, 2006). A região Neotropical compreende a área mais diversificada da ictiofauna de água doce do mundo, estendendo-se do norte do México até o centro da Argentina, sendo que as ordens mais representativas desta região são os Characiformes e os Siluriformes (LOWE-MCCONNELL, 1999; MORRONE, 2001).

Os Siluriformes são um grupo de peixes que apresentam uma grande diversidade taxonômica e ecológica, e por este motivo tem sido alvo de muitos estudos (FINK; FINK, 1981; DE PINNA, 1998; BRITO, 2003). Tem a maioria de suas espécies habitando as regiões Tropicais e Neotropicais, com poucos representantes que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (BURGESS, 1989; NELSON, 2006). Os Siluriformes sul-americanos apresentam uma ampla diversidade de formas, tamanho corporal e habitats, especialmente na superfamília Loricaroidea. Este grupo apresenta apenas uma família exclusivamente marinha e duas que apresentam representantes marinhos e de água doce (RAPP PY-DANIEL, 2000).

O grupo é composto por 39 famílias e 3707 espécies válidas (ESCHMEYER, 2015). Compreende peixes que geralmente habitam o fundo dos rios e riachos permanecendo escondidos entre as rochas e a vegetação e possuem formas e tamanhos variados, com hábitos principalmente noturnos (PAXTON; ESCHMEYER, 1995). Muitas espécies são carnívoras, mas outras se alimentam principalmente de algas que são raspadas das folhas, pedras e galhos submersos (NELSON, 1994). São caracterizados por apresentarem corpo sem escama, coberto por uma pele lisa ou por placas ósseas e apresentam barbilhões ao redor da boca, normalmente em três pares. As nadadeiras peitorais e dorsais geralmente apresentam espinhos providos de serras nas margens (BRITSKI; SATO; ROSA, 1984; FERREIRA; ZUANON; SANTOS, 1998). As famílias detritívoras mais conhecidas na América do Sul são: Prochilodontidae, Curimatidae e Loricariidae (DELARIVA; AGOSTINHO, 2001) e devido a este fato alimentar, algumas espécies são comuns e muito

abundantes em áreas de várzea da Amazônia central, representando uma significativa parcela dos desembarques da pesca artesanal e comercial (PETRERE JR., 1978; GOULDING, 1980).

Dentro da ordem Siluriformes, a família Loricariidae é considerada a mais numerosa com 919 espécies válidas (ESCHMEYER, 2015), porém novas espécies são regularmente descritas a cada ano, refletindo a rica biodiversidade da região Neotropical. São popularmente conhecidos como “cascudos” e caracterizam-se pela presença de um “escudo ósseo” que recobre todo o corpo e cabeça, além de apresentarem pequenas estruturas ósseas em forma de espinho chamadas de odontódeos e boca sugatória com projeções carnosas (FISCH-MULLER, 2003). Apresentam grande capacidade adaptativa que pode ser exemplificada pela sua respiração, que além das brânquias, também é realizada pelas paredes vascularizadas do estômago, fato que lhe permite ficar fora da água por longo período. Em certos casos observa-se pronunciado dimorfismo sexual (MARIOTTO, 2008).

1.3 Gênero *Ancistrus*

A tribo Ancistrini apresenta atualmente 262 espécies válidas, sendo a maior e mais diversificada em número de espécies dentre os loricarídeos. O gênero *Ancistrus* KNER, 1854, é um dos mais diversificados da tribo, com atualmente 68 espécies nominais e diversas espécies ainda não descritas (ESCHMEYER, 2015). Caracteriza-se pela ausência de placas e odontódeos na margem anterior do focinho, odontódeos interoperculares bem desenvolvidos e dimorfismo sexual devido a existências de pequenos barbilhões carnudos e moles no focinho, onde em sua maioria é numeroso e bifurcado nos machos e curtos e esparsos nas fêmeas e em machos jovens (MARIOTTO, 2008). Além disso, as espécies do gênero são caracterizadas pela ocorrência de cuidado parental de ovos e larvas, de modo que este comportamento ocorre principalmente entre os indivíduos machos (SABAJ; ARMBRUSTER; PAGE, 1999). Embora as espécies de *Ancistrus* estejam amplamente distribuídas na região Neotropical, as bacias dos rios Amazonas e Paraguai nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul abrigam o maior número e diversidade de espécies do gênero (FISCH-MULLER, 2003).

Do ponto de vista citogenético e evolutivo, as espécies do gênero *Ancistrus* fazem parte de um grupo bastante interessante, uma vez que além de mostrarem variação do número cromossômico, já foi relatada a existência de sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos com heterogametia tanto feminina quanto masculina e ocorrência de polimorfismos cromossômicos envolvendo os cromossomos portadores da região organizadora de nucléolos para o grupo (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2003; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006; OLIVEIRA et al., 2007; MARIOTTO et al., 2009, 2013).

MARIOTTO et al. (2013) sugeriram a existência de 13 citótipos, baseado em análises cromossômicas, para as espécies de *Ancistrus* encontradas nas bacias do Paraguai, Araguaia-Tocantins e Amazônica no estado do Mato Grosso, e ainda propõem a existência de possíveis novas espécies nesta região.

Poucos são os gêneros de Ancistrini que tiveram seus cromossomos estudados e dentre as 23 espécies de sete gêneros, todos mostraram um número diploide supostamente ancestral de $2n=52$ cromossomos, predominantemente meta e submetacêntricos (ARTONI; CARLOS BERTOLLO, 2001; SOUZA, 2003; DE OLIVEIRA; SOUZA; VENERE, 2006). Somente espécies do gênero *Ancistrus* mostraram um número diploide que desvia dessa condição e a presença de um alto número de cromossomos acrocêntricos com número diploide variando de $2n=34$ a $2n=54$ cromossomos. De acordo com ALVES; OLIVEIRA; FORESTI (2003) e DE OLIVEIRA; SOUZA; VENERE (2006), fusões cêntricas são os principais rearranjos que ocorrem no grupo dos *Ancistrus*, no qual a redução do número diploide parece ser uma tendência evolutiva.

Outra interessante característica encontrada nos cariótipos de algumas das espécies de *Ancistrus* já estudadas é a presença de cromossomos sexuais heteromórficos. Sistemas do tipo ZZ/ZW e XX/XY foram encontrados em populações de *Ancistrus* cf. *dubius* do pantanal do Mato Grosso (MARIOTTO; ARTONI; MIYAZAWA, 2004; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006). Além desse sistema, foi também observado um interessante sistema do tipo X0 em *Ancistrus* n. sp.1 proveniente do Rio Vermelho localizado em Goiás (ALVES et al., 2006). Foram também descritos sistemas múltiplos dos tipos XX/XY₁Y₂ e Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂ para as espécies *Ancistrus* sp.1 “Balbina” e *Ancistrus* sp.2 “Barcelos” provenientes da Amazônia (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Levando em consideração a presença de diferentes tipos de sistemas de cromossomos sexuais em espécies de *Ancistrus*, tendo em vista que esses cromossomos possuem considerável

acúmulo de heterocromatina e que essas regiões são normalmente compostas por sequências de DNA repetitivo, o presente trabalho teve como objetivo isolar sequências repetitivas que pudessem estar relacionadas aos processos de origem e evolução dos cromossomos sexuais, além de encontrar possíveis marcadores que pudessem auxiliar no entendimento da evolução cariotípica deste grupo. O estudo deste tipo de sequências do DNA tem fornecido importantes informações sobre a natureza molecular dos cromossomos sexuais revelando dados sobre a evolução e possível origem deste tipo de cromossomo e também informações interessantes sobre os outros cromossomos dos complementos (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; HASHIMOTO et al., 2009; DA SILVA, 2012; MARRETA; FALDONI; PARISE-MALTEMPI, 2012; DA SILVA; BUSO; PARISE-MALTEMPI, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi isolar sequências repetitivas presentes no genoma de espécies de *Ancistrus*, analisar a organização destas sequências e suas distribuições cromossômicas na tentativa de auxiliar no entendimento das relações filogenéticas e cariotípicas que envolvem as espécies deste gênero, bem como contribuir com o entendimento dos mecanismos que possam estar relacionados com a evolução dos cromossomos sexuais no gênero.

2.2 Objetivos específicos:

- Isolar e caracterizar sequências repetitivas presentes no genoma das espécies de *Ancistrus* localizadas nos córregos Flecha e Currupira;
- Comparar o mapeamento cromossômico das sequências isoladas das espécies de *Ancistrus* localizadas nos córregos Flecha e Currupira com espécies localizadas no Córrego Pari e Rio Sangradouro;
- Elucidar o possível envolvimento dos cromossomos portadores destas sequências na origem dos sistemas sexuais.
- Caracterizar a estrutura cromossômica de algumas populações, pertencentes a bacia do Rio Paraguai, do gênero *Ancistrus*, descrevendo as características gerais de seus cariótipos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

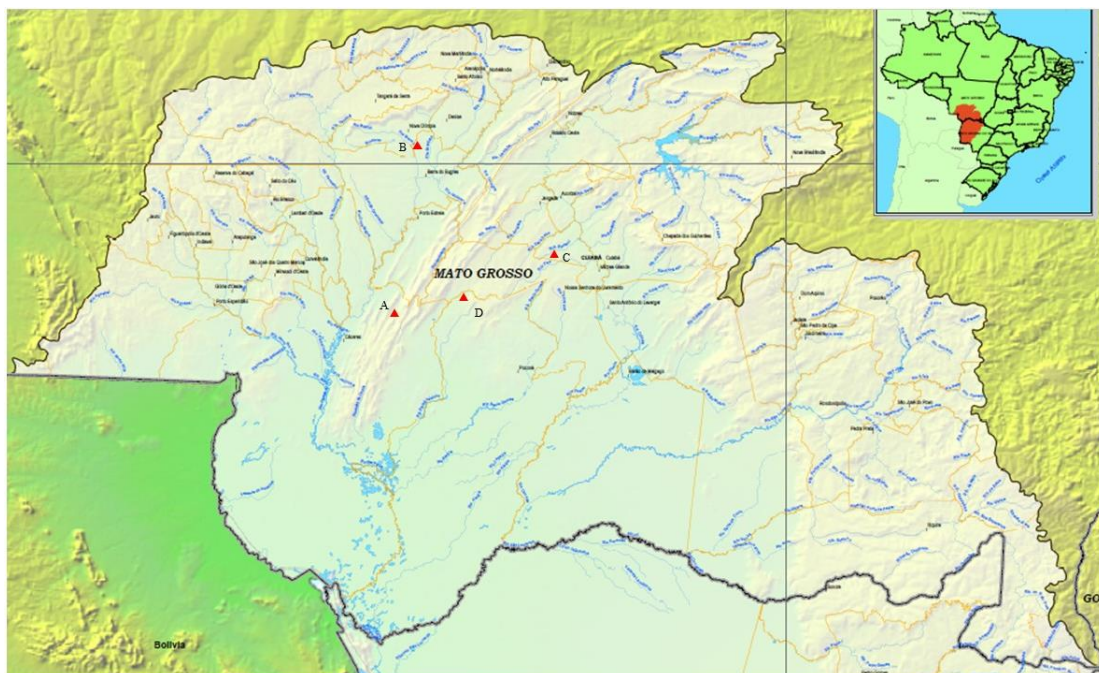
As coletas dos exemplares do gênero *Ancistrus* abordados neste trabalho (Figura 3) foram realizadas em rios e córregos pertencentes a bacia do Rio Paraguai no estado de Mato Grosso, conforme mostra a figura 4. Estas coletas foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Liano Centofante (Universidade Federal do Mato Grosso) e a Prof^a Dr^a Sandra Mariotto (Instituto Federal do Mato Grosso). Foram analisados 34 indivíduos machos e fêmeas da espécie *Ancistrus* sp1 “flecha” pertencentes ao Córrego Flechas, 42 indivíduos machos e fêmeas da espécie *Ancistrus* sp “currupira” pertencentes ao Córrego Currupira, 19 indivíduos machos e fêmeas da espécie *Ancistrus* sp “pari” pertencentes ao Córrego Pari e 9 indivíduos machos e fêmeas da espécie *Ancistrus* sp “sangradouro” pertencentes ao Córrego Sangradouro. Indivíduos das populações do Córrego Sangradouro e Rio Pari foram utilizados para análise comparativa da localização e caracterização das sequências.

Figura 3: Exemplares coletados. A - Rio Flecha, B - Córrego Currupira e C - Córrego Pari.



Fonte: Própria autoria e MARIOTTO (2008).

Figura 4: Mapa ampliado da rede hidrográfica do Rio Paraguai evidenciando os pontos de coleta (Triângulos vermelhos). A (Rio Flecha), B (Córrego Currupira), C (Córrego Pari) e D (Córrego Sangradouro).



Fonte Agencia Nacional das Águas (ANA).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparação de cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram realizadas a partir do rim anterior dos exemplares coletados nos córregos Flecha e Currupira, seguindo a metodologia descrita por FORESTI; OLIVEIRA; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO (1993), com adaptações de acordo com cada grupo.

Foi preparado uma solução de fermento biológico (0,3 g de fermento biológico comercial + 0,3 g de açúcar + 10 mL de água destilada) de acordo com o descrito em Oliveira et al (1988) e injetado 1 mL a cada 100 g de peso do animal, e os exemplares foram deixados por 24 horas em aquário aerado. No dia posterior foi injetado intraperitonalmente uma solução aquosa de colchicina na concentração de 0,025%, correspondendo a uma quantidade de 0,1 mL/10g do animal. Os exemplares foram mantidos no aquário por 25 minutos sob observação e então sacrificados, retirando-se as regiões posterior e anterior do rim. Este material foi dissociado em solução hipotônica de KCl 0,075 M com o auxílio de uma seringa de vidro, sem agulha e armazenado na estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado

aproximadamente 10 gotas de fixador (metanol 3: ácido acético 1) ao material e então este foi centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante (suspensão celular) foi descartado e adicionou-se 10 mL de fixador ressuspensando o material, que então foi centrifugado novamente por 10 minutos a 900 rpm. Este procedimento foi repetido duas vezes. O material foi ressuspensado novamente em uma quantidade suficiente de fixador para que se obtenha uma concentração satisfatória de células e armazenado em microtubos de 1,5 mL no freezer para posterior utilização.

Para visualização e utilização do material em técnicas posteriores, foram utilizadas lâminas aquecidas a 60 °C para pingar o material gelado. Este procedimento faz com que o material espalhe melhor sobre a lâmina.

3.2.1 Extração de DNA de Tecidos Sólidos

A extração de DNA foi realizada a partir de fígado e/ou nadadeira dos espécimes fixados em metanol/etanol (1:1), seguindo basicamente o protocolo de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico apresentado por SAMBROOK; RUSSEL (2001).

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume/Amostra
NaCl 5 M	80 µL
Tris HCl 2M pH 8	40 µL
SDS 10%	200 µL
EDTA 0,5 M pH 8	200 µL
Rnase (10mg/µL)	40 µL
Água autoclavada	3440 µL
Volume Final	4000 µL

Em uma cubeta, foram adicionados 4 mL da solução de digestão juntamente com pequenos pedaços de tecidos que foram homogeneizados. A solução foi levada ao banho maria a 50 °C por 30 minutos e foram acrescentados 20 µL de Proteinase K (20mg/mL) e levada novamente ao banho maria a 50 °C, em tubos de centrífuga cobertos com parafilm, durante 2-4 horas, homogeneizando o material periodicamente. Dentro da capela, foram acrescentados 400

μL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico e, após agitar durante 15 minutos o material foi levado à centrifuga a 7000 rpm por 15 minutos. Após isso, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente para um novo tubo e foram acrescentados 4 μL de NaCl a 5 M e duas vezes o volume coletado de Etanol absoluto. O material foi novamente centrifugado a 7000 rpm por 10 minutos e logo em seguida descartado o sobrenadante. Foram acrescentados 3 mL de etanol 70% e realizada novamente a centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Após secar em estufa por aproximadamente 1 hora o material foi ressuspensionado em 100 μL de água autoclavada e armazenado em freezer.

3.2.3. Isolamento de sequências repetitivas

O DNA genômico extraído foi digerido com diversas enzimas de restrição (HindIII, EcoRI, entre outras), porém a enzima com o melhor resultado no isolamento de sequências repetitivas foi a enzima de restrição Dra I.

Para cada 100 ng de DNA adiciona-se 30 μL de DNA e 3 μL de enzima. Esta solução foi deixada a 37 °C (temperatura de acordo com a enzima utilizada) *overnight*. Porém após 7 horas de digestão, foi acrescentado mais 3 μL de enzima. Para precipitação e purificação do DNA digerido, no dia seguinte, foi adicionado 2 μL de NaCl à 5M e 200 μL de Etanol 100% gelado. Esta solução foi armazenada por duas horas a -80 °C. Após as duas horas a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. Após secar, o DNA foi eluído em 10 μL de água destilada e armazenado no freezer para posterior utilização.

Para visualização do produto da digestão foi aplicado 10 μL do produto com 2 μL de *blue juice* em gel de agarose 2,5 %, aplicando uma corrida lenta para que as bandas fossem separadas corretamente e assim, melhor visualizadas. A visualização do gel foi realizada em um transluminador de luz ultravioleta.

As possíveis sequências repetitivas representadas nas bandas foram então purificadas para a dissociação do DNA da agarose de acordo com o protocolo do *QIAquick PCR Purification Kit* (Quiagen). As bandas foram cortadas com o auxílio de uma ponteira específica e uma pipeta de 1000 μL e, foram transferidas para um microtubo de 1,5 μL. Foi adicionado 200 μL de ADB *buffer* e colocado em banho maria a 55 ° C por aproximadamente 10 minutos (completa dissolução do gel). O líquido foi transferido para uma coluna e centrifugada a 14.000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e 200 μL de *Wash buffer* foram

adicionados. A solução foi centrifugada por 30 segundos a 14.000 rpm. Estes dois últimos procedimentos foram repetidos. O líquido foi eliminado, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 µL, 10 µL de água miliQ foram adicionados e a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 segundos. O DNA eluído no microtubo foi armazenado no freezer para posterior utilização.

3.2.3 Clonagem

Para a realização da clonagem, foi realizada a preparação de células competentes de *Escherichia coli* da seguinte maneira:

Soluções utilizadas:

Solução 1 – Meio LB (Luria- Bertani)	Volume
Triptona	5 g
Extrato de levedura	2,5 g
NaCl	5 g
Água	500
Volume Final	500 mL
Solução 2 - Glicerol 50 %	Volume
Glicerol	2,5 mL
Água	2,5 mL
Volume Final	5 mL
Solução 3 – 1 M CaCl₂	Volume
CaCl ₂	14,7 g
Água destilada	100 mL
Volume Final	100 mL

Solução 4 – 0,1 M CaCl₂	Volume
CaCl ₂ 1M	10 mL
Água destilada	90 mL
Volume Final	100 mL

Solução 5 – 0,1 M CaCl₂+Glicerol 15 %	Volume
1 M CaCl ₂	100 mL
Glicerol 50%	300 mL
Água destilada	600 mL
Volume Final	1000 mL

As soluções 1, 2 e 5 foram autoclavadas após preparação.

As células de *E. coli* foram estriadas em uma placa contendo meio LB sólido e ampicilina, que foi armazenada em estufa a 37 °C *overnight* para o crescimento das bactérias. No dia posterior foi selecionada uma colônia de bactérias e a mesma foi colocada em 10 mL de meio líquido em um tubo falcon e armazenada a 37 °C *overnight* para o crescimento da bactéria. No terceiro dia, a OD (Optical Density – Densidade Ótica) do crescimento da bactéria foi mensurado e ao atingir o ponto entre 0,4-0,6 o tubo falcon com as bactérias foi colocado em gelo por 20 minutos. A solução foi centrifugada a 4 °C a 2500 rpm por 10 minutos. Foi adicionado 5 mL da solução 4, armazenado no gelo por 30 minutos e centrifugado a 4 °C a 2500 rpm por 10 minutos. Foi adicionado 1.300 µL da solução 5. Foram feitas alíquotas de 200 µL em tubos de 1,5 µL pré-resfriados. Os microtubos foram resfriados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C para posterior utilização.

Os fragmentos de DNA foram inseridos em vetores plasmidiais com o kit pMOs *Blue* (Amershan Biosciences) seguindo as especificações do fabricante. Em um tubo de 100 µL foi adicionado 2,5 µL de H₂O milli-Q + 1 µL do tampão pK 10x + 0,5 µL de DDT 100 mM + 5 µL do produto a ser clonado. A reação de pk foi realizada no termociclador a 22 °C por 40 minutos e depois aquecida a 75 °C por 10 minutos também no termociclador. O tubo foi colocado no gelo por 2 minutos e depois foram acrescentados 1 µL (50ng/µL) do vetor *pBluescript II KS+* e 1 µL (4U) de DNA ligase. O produto foi incubado *overnight* a 22 °C e depois armazenado no freezer a -20 °C até a transformação das bactérias competentes.

Para o processo de transformação foram pipetadas 80 μL de células competentes em cada microtubo de 1,5 μL e adicionado 10 μL de produto ligação. Após misturar gentilmente, os tubos foram deixados no gelo por 30 minutos e em seguida foi dado um choque térmico por exatos 1 minutos e 30 segundos em banho maria a 42 °C. Após mais 5 minutos em gelo foi adicionado 80 μL de meio Soc (RT) em cada tubo, que foram deixados no *shaker* por 1 hora a 37 °C. A mistura foi então aplicada em placas preparadas com ampicilina e *X-Gal*. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 12 horas e armazenadas em geladeira.

3.2.4 Amplificação do DNA via PCR

Os clones recombinantes foram testados através da técnica de PCR utilizando os primers universais M13, a fim de que o vetor contendo o inserto fosse amplificado, de acordo com o protocolo que segue. A tabela 2 traz as particularidades dos conjuntos de primers M13 bem como aqueles que foram posteriormente desenhados de acordo com cada sequência de interesse isolada.

Nome	Primer
M13 F	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
KD7116-1 F	TCACAACACACGTTTGTGGA
KD7116-1 R	AGAGCAGGCTTTGAATCGG
KCL-1 F	AAGCCTTGTTGAATTTTAG
KCL-1 R	ATTTTACTAACTAAAGGTTGT
KCL-4 F	GTGATATGTGATGCCCATTG
KCL-4 R	CTCAGATTGCACCCGGGA

Tabela 2: Primers utilizados nas reações para obtenção das sequências isoladas no genoma de diferentes espécies de *Ancistrus*.

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume
Água autoclavada	4,78 µL
Tampão	1 µL
MgCl ₂	0,1 µL
Primer F	0,4 µL
Primer R	0,4 µL
Mix dNTP 5mM	0,32 µL
Taq Polimerase	0,1 µL
DNA (100-200 mg/ µL)	3 µL
Volume Final	10 µL

A reação de PCR com o primer M13 foi realizada nas condições gerais de desnaturação a 95°C durante 3 minutos, 34 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50°C durante 1 minuto, extensão de 72°C durante 2 minutos e elongação a 72 °C por 5 minutos. A reação de PCR com os primers KD7116-1, KCL-1 e KCL-4 foi realizada seguindo as condições: desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C durante 1 minuto, extensão de 72 °C durante 1 minuto e elongação a 72 °C por 7 minutos, para os primers KD7116-1 1 KCL4, e desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C durante 1 minuto, extensão de 72 °C durante 1 minuto e elongação a 72 °C por 7 minutos, para o primer KCL1.

Para a visualização dos resultados, foram aplicados 3 µL de produtos de PCR em gel de agarose 1,0%, corados com SYBR[®] Safe (10.000x) (Invitrogen[®]), em 2 µL de tampão de corrida *blue juice* (10x). O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta, a fim de verificar a qualidade dos fragmentos amplificados. Para a visualização do tamanho do produto gênico obtido foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]).

Os clones que se mostraram de tamanho suficiente para serem utilizados como sondas na hibridação *in situ* fluorescente foram armazenadas em glicerol em freezer -80C.

3.2.5 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos produtos de PCR, as amostras foram purificadas através do tratamento com a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare) utilizando-se 10 µL de produto de PCR, 2 µL ExoSAP e 2 µL H₂O milli-Q autoclavada. A reação foi levada ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37 °C seguido por um ciclo de 15 minutos a 80 °C.

Após a purificação, as amostras foram enviadas à empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia) para o sequenciamento Sanger. O genoma da espécie pertencente ao Córrego Currupira foi sequenciado através do *Next-generation sequencing (NGS)* pela plataforma Solexa da Illumina. Esta técnica permite o uso da clonagem *in vitro* em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (FEDURCO et al., 2006; TURCATTI et al., 2008), não sendo necessário a produção de clones bacterianos, montagem das placas de sequenciamento e separação dos fragmentos em géis, permitindo assim, que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez através da plataforma (CARVALHO, SILVA, 2010).

3.2.6 Análise das sequências

A sequências foram alinhadas com o programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) presente no software BioEdit (HALL, 1999).

Aquelas sequências que correspondiam a fragmentos do vetor foram retiradas das sequências consenso utilizando a ferramenta online de edição VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>). A ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizada para comparação das sequências obtidas com sequências já depositadas no banco de dados, bem como Censor (KOHANY et al., 2006), RepeatMasker, website (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) e ORF Finder, no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Os reads obtidos do sequenciamento genômico de nova geração (NSG) foram pré-processados através da ferramenta FASTX-TOOLKIT (Gordon e Hannon 2010) ou seja, filtrados e agrupados seguindo parâmetros pré-estabelecidos no próprio programa. Os clusters foram formados a partir do programa RepeatExplorer (NOVAK et al 2013) utilizando os parâmetros padrões do próprio programa. A procura de sequências de DNA satélite foi

primeiramente realizada através da análise de densidade dos gráficos de acordo com Novák et al (2010) e em seguida pelo programa Tandem Repeat Finder (BENSON, 1999). O programa de BioEdit também foi utilizado para alinhamento dessas sequências.

3.2.7 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Para a técnica de FISH, a marcação das sondas foi realizada utilizando a técnica de *Nick Translation*, descrita abaixo, seguindo o protocolo de PINKEL; STRAUME; GRAY (1986) com modificações de DA SILVA; DE BORBA; PARISE-MALTEMPI (2012).

Marcação de sonda por *Nick Translation*:

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume/Amostra
10x NT Buffer	2 µL
dCTP 0,4mM	2 µL
dATP 0,4mM	2 µL
dGTP 0,4mM	2 µL
dTTP 0,4mM	0,7 µL
Água autoclavada	2,78 µL
Digoxigenina ou Biotina	0,52 µL
Produto do PCR	5 µL
DNA polimerase I/DNAse I	3 µL
Volume Final	20 µL

O programa para a marcação da sonda por *Nick Translation* seguiu as condições gerais de 16 °C durante 90 minutos, seguidos de 10 minutos a 65 °C e temperatura de manutenção a 10 °C.

Tratamento das lâminas

As preparações citológicas foram pingadas nas lâminas em banho maria a 60 °C e as lâminas foram deixadas com a suspensão de células em estufa a 37 °C por pelo menos 1 hora para fixar bem o material sobre a mesma. Cada lâmina foi desidratada em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos e incubada em 100 µL de Rnase (0,4 % Rnase/2xSSC) a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 2xSSC e desidratadas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos.

Desnaturação dos cromossomos

O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70 % em 2xSSC, a 70 °C. Em geral, o tempo de desnaturação foi de 50 segundos. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (gelada a -20 °C) 70, 90 e 100% por 5 minutos.

Desnaturação da sonda

A solução de hibridação foi preparada com 6 µL da sonda marcada e 24 µL do tampão de hibridação (*Hybuffer*) por lâmina em um microtubo de 100 µL. A solução de hibridação foi desnaturada em termociclador a 95 °C por 10 minutos e cada lâmina foi montada com 30 µL de solução de hibridação contendo a sonda, cobertas com lamínula, e o conjunto mantido voltado para baixo *overnight* a 37 °C em câmara úmida.

Lavagens e Detecção

As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e lavadas em 2xSSC a 72 °C por 10 minutos e uma vez com PBD (1g de leite em pó + 20 µL de 20xSSC + 500 µL de Triton + 100 µL de água) a 45 °C por 5 minutos.

Cada lâmina foi incubada com 4 µL de Anti digoxigenina rodamina + 26 µL PBD por 40 minutos a 37 °C. Foram feitas três lavagens por 5 minutos com PBD a 45 °C.

Double FISH

Para detecção de duas sondas marcadas com Biotina e Digoxigenina cada, foi realizado a técnica de *Double FISH* na qual na fase de detecção as lâminas foram incubadas com 50 µL de PBD + 4 µL de Anti digoxigenina rodamina + 0,5 µL de Alexa.

Montagem das lâminas

Para montagem das lâminas foram colocados aproximadamente 10 µL de solução de DAPI + *antifading (Vectashiled)* sobre cada lâmina. As lâminas foram cobertas com lamínula, e armazenadas em geladeira no escuro.

A observação das lâminas foi realizada em um microscópio Olympus BX51 acoplado a um modelo de câmera digital Olympus D71 e as imagens foram capturadas pelo software DP controller.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a elaboração de dois artigos científicos que serão submetidos para publicação.

Capitulo I

Artigo a ser submetido a revista Mobile Genetics.

Characterization of a TC1-like transposon in the Catfish, *Ancistrus* genera (Siluriformes: Loricariidae)

Keteryne Rodrigues da Silva¹, Sandra Mariotto², Liano Centofante³, Patricia Pasquali Parise-Maltempi¹

¹Laboratório de Citogenética Animal – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro – Av 24A, 1515 Jardim Bela Vista- 13600-000- Rio Claro/SP, Brasil;

²Instituto Federal de Ciências e Tecnologia do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil;

³Instituto de Biociências, UFMT Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

Correspondence to: Patricia Pasquali Parise-Maltempi. E-mail address: parise@rc.unesp.br Telephone: +55 19 3526-4148 Address: Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética. Av. 24 A, 1515. CEP: 13506-900. Rio Claro, SP, Brasil.

Abstract

The Tc1 mariner element is widely distributed among organisms and have been already described in different species of fish. Among the order of the Siluriformes, the family Loricariidae is considered the second most numerous among neotropical fish, and are popularly known as “cascudo”. The genus *Ancistrus* has 68 nominal species and these species are part of an interesting group of taxonomical and cytogenetic point of view, since besides showing a variation of chromosome number, ranging from $2n=40$ to $2n=52$ chromosomes, has been reported the existence of simple and multiple sexual chromosome system and the occurrence of chromosomal polymorphisms involving the nucleolar organizing region bearing chromosomes. In this study, it was isolated a repetitive element by restriction enzyme, from an *Ancistrus* specie belonging to Rio Flecha, localized at basin from Paraguay river (Brazilian Mato Grosso state), that showed similarity with the transposable element Tc1 mariner. Its chromosomal location is distributed in heterochromatic regions and along the chromosomal arms of all specimens covered in this study, confirming the pattern dispersed of this element found in other studies carried out in other species. Thus, this result reinforces the hypothesis that the sequence AnDraI is really a dispersed element isolated. The results obtained in this study can help uncover the evolutionary history of the group, since studies involving transposons have aided phylogenetic studies of various species of fish.

Key Words: Repetitive DNA, enzyme digestion, chromosomal mapping, transposable elements, fluorescent in situ hybridization.

Introduction

The genome of eukaryotes consists mostly of large amount of repetitive DNA, which has been associated with a lot of functions in the genome, as can be seen in the review carried out by SHAPIRO¹. These functions range from important role in the structure of chromosomes, the telomere and centromeres maintenance mechanism^{2,3}, involvement in DNA replication process⁴, of recombination⁵ and gene expression⁶⁻⁹, in origin and evolution of sex and supernumerary chromosomes¹⁰⁻¹², besides being used as important markers for cytogenetic studies of evolution, the genome organization and identification of chromosomal rearrangements in various groups of organisms¹³⁻¹⁵.

Basically, the repetitive sequences are represented by tandem repeats, such as satellite DNA, minisatellite, and microsatellite repeats or dispersed along the DNA such as retrotransposons and transposons¹⁶. The transposable elements (TEs) are classified according to the type of intermediate transposition, being of class I those that possess RNA intermediates and class II those whose intermediates are DNA molecules¹⁷. Transposons, belonging to Class II, representing most of the moderately repeated sequences of the eukaryotic genome, can be located in the region of constitutive heterochromatin and / or interspersed along the chromosomes and evolved through the ability to replicate making copies of themselves and moving treated to other regions of the genome¹⁸.

Transposons can be transposed through two different mobilization mechanisms: replicative transposition, in which the element is copied, one copy remaining at the original site, while another is inserted at a new site, contributing to an increase in the number of copies of it; non- replicative transposition, in which the element out of the old site and is part of a new location without increasing the number of copies¹⁹. When transposed, if the transposition occurs within promoter regions, introns, untranslated regions, can affect the expression of this gene²⁰ and, although most of these mutations are harmful, the transposition of these elements have contributed to diversification of species due to generation of new alleles²¹. Its ability to spread in multiple copies may be regarded as a driving force for the evolution of the genome and, indeed seems to promote the variability of the genome, which may lead to a determination regulatory mutations and chromosomal rearrangements^{16,22}.

Based on the similarity between the sequences and phylogenetic analysis of the transposase, the transposable elements can be classified in ten families: Tc1/mariner, haT, elemento P, MuDR/Fokdback, Cacta, PiggyBac, Pif/Harbinger, Merlin, Transib and Banshee²³. Since the discovery of transposable elements in eukaryotes, elements such as Tc1 / mariner have been isolated from different fish species^{18,24–29}.

This element, belonging to a superfamily of transposons, presents 1000 to 2000 bp¹⁷, characterized by a simple structure with two inverted terminal repeats (TIRs) of approximately 28 bp. Also has an ORF (Opening Read Frame) encoding the transposase³⁰ and is widely distributed among organisms, from protozoa to vertebrates. However, due to various events mutations, deletions and insertions which become permanent component of the genome²⁹, the majority is currently in an inactive form³¹. The genus *Ancistrus* belongs to the Loricariidae, considered the second most numerous among Neotropical fish family, and are popularly known as “cascudos”. Currently there are 68 nominal species³² and it is one of the most diverse of subfamilies of Ancistrinae. Its taxonomy is very confusing, having an absence of identification at taxonomic, being restricted to specialists³³. Based on chromosomal analysis, MARIOTTO et al.³⁴ suggested the existence of 13 cytotypes for the *Ancistrus* species found in the Paraguay basin, Araguaia-Tocantins and the Amazon in the state of Mato Grosso, as well as the existence of possible new species in this region, which show variation in chromosome number, diploid number ranging from $2n = 34$ to $2n = 5$ chromosomes, the presence of simple and multiple sex chromosome systems with both heterogametic sex and occurrence of chromosomal polymorphisms involving the chromosomes carrying the nucleolar organizing region for the group^{35–39}. Systems of ZZ/ZW and XX/XY sex chromosomes were found in populations of *Ancistrus* cf. *dubius* and *Ancistrus* sp 08 from wetland Mato Grosso^{37,40}, the X0 system in *Ancistrus* n. sp.1 from “Rio Vermelho” located in Goiás³⁶ and multiple systems of XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2 for the species *Ancistrus* sp.1 “Balbina” and *Ancistrus* sp.2 “Barcelos” from Amazon⁴¹. The species covered in this study, *Ancistrus* sp1 “flecha”, belonging to the “Rio Flecha” in the Paraguay River Basin has $2n = 44$ chromosomes.

Thus, taking into account the presence of different types of sex chromosome systems in species of *Ancistrus*, given that these chromosomes have considerable accumulation of heterochromatin and that these regions are usually composed of repetitive DNA

sequences, this work aimed to isolated repetitive sequences that could be related to the process of origin and evolution of the sex chromosomes. Studies by ^{12,42-45}, with this type of DNA sequences has provided important information about the molecular nature of the sex chromosomes revealing data on the evolution and possible origin of this type of chromosome as well as interesting information about the other chromosomes of the complements.

Results

Analysis of AnDraI sequence

After isolation of repetitive sequences with restriction enzymes, it was possible to observe the formation of a band of approximately 700 bp. The product from this band was then cloned, resulting in 34 recombinant clones, from which one, named AnDraI was used in this study. The sequence of this clone had 618 bp and GC% content: 44.34. According with the databases consulted: Blast 2.0 RepeatMasker and Censor, the sequence obtained showed greater than 86% identity with the type of transposon Mariner/Tc1 of *Xenopus tropicalis*. In the analysis performed for possible coding regions, an ORF region of frame 3+ 188 bp (87-275) was found. As conserved domain, a region of approximately 180 nucleotides which corresponds to HTH_Tnp_Tc3_2_Transposase was found. By submitting this sequence in the protein data bank (Blastx), similarities were found with transposases of several species, including, *Rana pipiens*, *Xenopus*, *Dicentrarchus labrax*, *Salmo salar* and *Cyprinus Carpio* (Figure 1).

PCR analysis of the sequence Tc1-like in specimens from other populations

Amplification of AnDraI element by polymerase chain reaction in the genome of other specimens of other populations: *Ancistrus* sp “currupira” of Córrego Currupira, *Ancistrus* sp “pari” of Córrego Pari and *Ancistrus* sp “sangradouro” of Córrego Sangradouro revealed homogeneous length fragments in all specimens, both male and female.

Chromosomal mapping of the transposon

Hybridization *in situ* chromossomic performed on *Ancistrus* sp1 “flecha” which the sequence was obtained, revealed signals throughout all the chromosomes with preferably located in pericentromeric regions, with no difference between male and female (Figure 2).

Cross-Fish conducted in individuals from other localities also showed results similar to that found in the Rio Flecha specimens (Figure 2).

Discussion

The elements Tc1, first identified in invertebrates as *Caenorhabditis elegans*, have around 1600 pb and share similar structures, known as Terminals Reversed regions (TIRs) that show a sequence of 6 to 5 pb identical in/or near of the highly conserved ends (CAGTG/CAGTC)^{46,47}. However, there is a great variation between the number of copies, distribution and types of transposable elements, between different species arising from factors such as intrinsic characteristics of the transposable elements (TEs) and the different evolutionary forces that act on these⁴⁸.

The Tc1 Mariner element isolated in this work presents 618 pb, of which 532 pb paired with TcMar-Tc1 of *Xenopus* (Siluriana) *tropicalis*, equivalent to 86.08% of this element, in other words, appears to share a very similar structure with transposon type Tc1 of other species. This element appears well distributed throughout all the chromosomes of all specimens of *Ancistrus*, in view of that these specimens belong to distinct localities and isolated among themselves Paraguay's basin, and different karyotypes. Works that have not yet published (personal communication) indicate that such specimens present chromosomes rich in heterochromatin in centromeric regions. Thus, it can be said that, at least among the specimens analyzed, which may belong to different species, this element presents the same homogeneous pattern of distribution. It can be inferred that, despite the low number of sample size, in view of that the genus presents currently 68 nominal species, this is a possible element present in the genome of the genus *Ancistrus*. Although the Siluriformes group have a scientific and economic

very important, their systematic and taxonomy are still highly problematic and, in this context, the results obtained in this study can help uncover the evolutionary history of the group as well as their taxonomy, since studies involving transposons have aided phylogenetic studies of various species of fish^{18,26,29,49,50}.

Repetitive sequences may be present in centromere and telomeres of chromosome eukaryotic, rich regions in heterochromatin, as well as regions over the interstitial chromosomal arms⁵¹. The *in situ* hybridization experiments in the chromosomes of *Ancistrus* sp showed that the Tc1-like element is located throughout all the chromosomes with preferential markings in heterochromatic regions along the chromosomal arms, corroborating the results found in other studies carried out in other species, evidencing a pattern to disperse these elements^{18,52,53}.

The results found in the literature about the genomic organization of transposons, suggest that these elements are in different ways among the different groups of fish⁵⁴, as for example in the *Oreochromis niloticus* species¹⁴⁻¹⁶, *Perciformes Antarctic*⁵³ and in species of the subfamily Hypoptopomatinae⁵⁶, in which these elements can be found scattered throughout the genome. However, in species as *Tetraodon nigroviridis*^{56,57} and in most of the species of ciclideos^{58,59} they can be found accumulated in chromosomic regions rich in constitutive heterochromatin. Among the Siluriformes, the elements Rex1 and Rex3, in *Hisonotus leucofrenatus*, *Pseudotocinclus tietensis* and *Parotocinclus maculicauda* species, presented dispersed distributions patterns in the genome, similar to the pattern found for the transposable element AnDraI⁵⁵, as well as a new dispersed element, BamHI, isolated by Ferreira et al⁶⁰, in the genome of *Hisonotus leucofrenatus*. The genomic organization result of the Tc1 like element obtained in this work reinforces the hypothesis that the sequence AnDraI isolated is a disperse element, and reinforces the hypothesis proposed by FERREIRA et al.⁵⁴ in which all transposable elements behave similarly inside of a family or subfamily.

The identification of a growing number of transposable elements, particularly in fish, has helped to understand the relationship of these elements with genomic rearrangements⁶¹. Thus, the data obtained in the present work can also contribute in this context, as well as help in understanding of the genome of fish, and auxiliary in the problematic taxonomic resolution of *Ancistrus*.

Methodology

Material

The *Ancistrus* covered in this study were collected in the Rio Flecha, Córrego Currupira, Córrego Pari and Córrego Sangradouro in the Paraguay River Basin. The collected material was taken to the Animal Genetics Laboratory at the Federal University of Mato Grosso, where the chromosome preparations were obtained.

Methods

Preparation of mitotic chromosomes

The chromosome preparations were made from the kidney of specimens collected following the methodology described by FORESTI et al.⁶² The material was stored in a freezer at -20 °C.

Obtaining repetitive sequences

The extraction of genomic DNA was performed from liver and fin of the specimens collected, basically following the protocol phenol / chloroform / isoamyl alcohol made by SAMBROOK & RUSSELL⁶³. The extracted genomic DNA was digested with various restriction enzymes to isolation of repetitive sequences in a proportion of 30 uL DNA (100 ng) in 3 uL of enzyme. This solution was left at 37 °C (temperature according to the enzyme used) overnight and after 7 hours of digestion was further added 3 uL of enzyme. For precipitation and purification of the digested DNA 2 uL of 5M NaCl and 200 of ice cold 100% ethanol was added. This solution was stored for two hours at -80 °C and centrifuged after two hours digested DNA was eluted in 10 uL of distilled water and analyzed in agarose gel 1% stored in the freezer for later use. The bands of potential repetitive sequences were then purified according the QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen). To perform the cloning competent bacteria were used prepared in the laboratory according to chemical transformation with CaCl₂264. The DNA fragments were inserted into plasmid vectors with pMOS Blue Kit (Amersham Biosciences) following the manufacturer's specifications.

DNA amplification via PCR

The recombinant clones were subjected to PCR (Polymerase Chain Reaction) for amplification using the universal primers M13 F - GTA AAA CGA CGG CCA G and M13 R - CAG GAA ACA GCT ATG AC under the following conditions: denaturation at 95 °C for 3 minutes, 34 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 50 for 1 minute, 72 °C extension for 2 minutes and elongation at 72 °C for 5 minutes. After sequencing, the divergent primers were designed KD7116F – TCA CAA CAC ACG TTT GTG GA and KD7116R – AGA GCA GGC TTT GAA TCG G manually, which was synthesized by SIGMA company. Subsequently, the amplification of the sequence with the primer KD7116-1 also in other possible different species from other populations was performed following conditions: denaturation at 94 for 5 minutes, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 58 °C for 1 minute 72 °C extension for 1 min and elongation at 72 °C for 7 minutes.

Fluorescence in situ hybridization

In situ hybridization was performed following the protocol PINKEL et al.⁶⁵ with some modifications of DA SILVA et al.⁴³ The fluorescent probes were labeled with digoxigenin by nick translation. The slides were mounted with antifading solution containing DAPI and chromosomes observed using an Olympus BX51 microscope and digital camera model D71. The images were captured using the DP Controller software.

DNA sequencing

The amplified and purified DNA by treatment with ExoSAP enzyme (USB) was sequenced by the method of SANGER et al.⁶⁷ through outsourcing of services by MacroGen company (Korea). The editing of the sequences was performed on the program BioEdit⁶⁸ using the Clustal W tool⁶⁹ for performing alignment of the sequences. For the characterization of the tools sequences were used: BLAST - Basic Local Alignment Search Tool⁷⁰ at National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>); CENSOR⁷¹; RepeatMasker, website (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) and ORF Finder, the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

References

1. Shapiro JA. Mobile DNA and evolution in the 21st century. *Mobile DNA* 2010; 1:4; <http://www.mobilednajournal.com/content/1/1/4>
2. Pardue M-L, DeBaryshe PG. Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres. *Annu Rev Genet* 2003; 37:485–511; <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.38.072902.093115>
3. Wong LH, Choo KHA. Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. *Trends Genet* 2004; 20:611–6; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952504002835>
4. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Mol Ecol* 2002; 11:2453–65; <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>
5. Biet E, Sun JS, Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: An effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:596–600; <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/27.2.596>
6. Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A, Ju Z. Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 289:317–24; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01959789>
7. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, Knowles BB. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 2004; 7:597–606; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580704003259>
8. Han JS, Boeke JD. LINE-1 retrotransposons: Modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *BioEssays* 2005; 27:775–84; <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.20257>

9. Volff JN. Turning junk into gold: Domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays* 2006; 28:913–22; <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.20452>.
10. Lyon MF. LINE-1 elements and X chromosome inactivation: A function for “junk” DNA? *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:6248–9; <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.12.6248>
11. Steinemann S, Steinemann M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic Genome Research* 2005; 110:134–43; <http://www.karger.com/doi/10.1159/000084945>
12. Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic Genome Research* 2007; 116:218–23; <http://www.karger.com/doi/10.1159/000098190>
13. Biémont C, Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 2006; 443:521–4; <http://www.nature.com/doi/10.1038/443521a>
14. Martins C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics. Science*; 2007. page 421–53; http://www2.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/home_depto/Cesar/documentos/Capitulos_Livros/4a-ChromRepetitivea.pdf
15. Oliveira SG, Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C. Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. *Mol Cytogenet* 2013; 6:54; <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3906913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994; 371:215–20; from: <http://www.nature.com/nature/journal/v371/n6494/pdf/371215a0.pdf>
17. Kidwell MG. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 2002; :49–63; <http://link.springer.com/10.1023/A:1016072014259>

18. Capriglione T, Odierna G, Caputo V, Canapa A, Olmo E. Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. *Gene* 2002; 295:193–8; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354653>
19. Lewin B. Retrovirus and retroposons. In: *Gene VIII*. 2004. page 487–511.
20. Maksakova IA, Romanish MT, Gagnier L, Dunn CA, Van de Lagemaat LN, Mager DL. Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS Genet* 2006; 2:2; <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1331978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Kapitonov VV, Jurka J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:4540–5; <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600833103>
22. Syvanen M. The evolutionary implications of mobile genetic elements. *Ann Rev Genet* 1984; 18:271–93; papers2://publication/uuid/2CC08E63-0810-47ED-BF7E-B0C8717800DC
23. Feschotte C, Pritham EJ. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet* 2007; 41:331–68; <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>
24. Radice AD, Bugaj B, Fitch DH, Emmons SW. Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Mol Gen Genet* 1994; 244:606–12; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969029>
25. Ivics Z, Izsvak Z, Minter A, Hackett PB. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:5008–13; <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.10.5008>
26. Izsvák Z, Ivics Z, Hackett PB. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Gen Genet* 1995; 247:312–22; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7770036>
27. Liu D, You C, Liu S, Liu L, Duan W, Chen S, Yan J, Liu Y. Characterization of a Novel Tc1-Like Transposon From Bream (*Cyprinidae*, *Megalobrama*) and Its Genetic Variation in the Polyploidy Progeny of Bream–Red Crucian Carp Crosses. *J Mol Evol* 2009; 69:395–403; <http://link.springer.com/10.1007/s00239-009-9295-5>

28. Krasnov A, Koskinen H, Afanasyev S, Mölsä H. Transcribed Tc1-like transposons in salmonid fish. *BMC Genomics* 2005; 6:107; <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/107>
29. Pocwierz-Kotus A, Burzynski A, Wenne R. Family of Tc1-like elements from fish genomes and horizontal transfer. *Gene* 2007; 390:243–51; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111906007013>
30. Wallau GL, Huan-Van A, Capy P, Loreto ELS. The evolutionary history of mariner-like elements in Neotropical drosophilids. *Genetica* 2011; 139:327–38; <http://link.springer.com/10.1007/s10709-011-9552-6>
31. Miskey C, Izsvák Z, Kawakami K, Ivics Z. DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:629–41; <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4232-7>
32. ESCHMEYER W. Catalog of Fishes: : GENERA, SPECIES, REFERENCES. [Internet]. World Wide WebAvailable from: <http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>
33. Britski HA, Silimon KZ de S de, Lopes BS. Peixes do Pantanal: manual de identificação. 2a ed. 2007.
34. Mariotto S, Centofante L, Vicari M, Artoni R, Moreira Filho O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet* 2011; 5:289–300; <http://compcytogen.pensoft.net/articles.php?id=1733>
35. Alves AL, Oliveira C, Foresti F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 2003; 56:57–63; <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00087114.2003.10589308>
36. Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado Á, Foresti F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 2006; 128:1–9; <http://link.springer.com/10.1007/s10709-005-0715-1>
37. Sandra M, Miyazawa CS. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil.

- Caryologia 2006; 59:299–304;
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00087114.2006.10797929>
38. De Oliveira RR, Feldberg E, Dos Anjos MB, Zuanon J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop Ichthyol* 2007; 5:301–6;
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252007000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
39. Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Filho OM. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotrop Ichthyol* 2009; 7:595–600;
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252009000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
40. Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 2004; 57:327–31;
http://www1.unifi.it/caryologia/past_volumes/57_4/57-4_1249.pdf
41. de Oliveira RR, Feldberg E, dos Anjos MB, Zuanon J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica* 2008; 134:243–9; <http://link.springer.com/10.1007/s10709-007-9231-9>
42. Hashimoto DT, Laudicina A, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F. Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica* 2009; 137:135–40; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430915>
43. da Silva EL. Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de *Leporinus elongatus* em diferentes espécies da família Anostomidae (Teleostei, Characiformes). 2012;
44. Marreta ME, Faldoni FLC, Parise-Maltempi PP. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. *J Fish Biol* 2012; 80:630–7; <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2011.03199.x>

45. da Silva EL, Busso a F, Parise-Maltempi PP. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolus organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 2013; 139:22–8; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037972>
46. Brezinsky L, Wang GVL, Humphreys T, Hunt J. The transposable element Uhu from Hawaiian *Drosophila* — member of the widely dispersed class of Tc1-like transposons. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:2053–9.
47. Avancini RMP, Walden KKO, Robertson HM. The genomes of most animals have multiple members of the Tc1 family of transposable elements. *Genetica* 1996; 98:131–40; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8976061>
48. Capy P, Langin T, Anxolabehere D, Bazin C. Dynamics and evolution of transposable elements. *Mol Biol Intell Unit* 1998; :197.
49. Goodier JL, Davidson WS. Tc1 Transposon-like Sequences are Widely Distributed in Salmonids. *J Mol Biol* 1994; 241:26–34; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283684714707>
50. Leaver MJ. A family of Tc1-like transposons from the genomes of fishes and frogs: evidence for horizontal transmission. *Gene* 2001; 271:203–14; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111901005303>
51. Csink AK, Henikoff S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet* 1998; 14:200–4; <http://www.cell.com/article/S0168952598014449/fulltext>
52. Schemberger MO, Oliveira JIN, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Cestari MM, Moreira-Filho O, Vicari MR. Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. *Zebrafish* 2014; 0:1–10; <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/zeb.2014.1013>
53. OZOUF-COSTAZ C, BRANDT J, KÖRTING C, PISANO E, BONILLO C, COUTANCEAU J-P, VOLFF J-N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarct Sci* 2004; 16:51–7; http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954102004001816

54. Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mob Genet Elements* 2011; 1:112–7; <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mge.1.2.16731>
55. Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res* 2011; 132:64–70; <http://www.karger.com/doi/10.1159/000319620>
56. Dasilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Roest Crollius H. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:13636–41; <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.202284199>
57. Fischer C, Bouneau L, Coutanceau J-P, Weissenbach J, Volff J-N, Ozouf-Costaz C. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* 2004; 336:175–83; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246529>
58. Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira I a., Poletto a. B, Fantinatti BE a, Martins C. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid Fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:34–42; <http://www.karger.com/doi/10.1159/000322888>
59. Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenet Genome Res* 2009; 127:43–53; <http://www.karger.com/doi/10.1159/000279443>
60. Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. A new dispersed element in the genome of the catfish *Hisonotus leucomfrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae). *Mob Genet Elements* 2011; 1:103–6; <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3190325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Koga A, Iida A, Hori H, Shimada A, Shima A. Vertebrate DNA Transposon as a Natural Mutator: The Medaka Fish Tol2 Element Contributes to Genetic Variation

- without Recognizable Traces. *Mol Biol Evol* 2006; 23:1414–9;
<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/molbev/msl003>
62. Foresti F, Oliveira C, Foresti de Almeida-Toledo L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 1993; 49:810–3; <http://link.springer.com/10.1007/BF01923555>
63. Sambrook J, Russel MG. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. third edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
64. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 1970; 53:159–62;
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283670900513>
65. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:2934–8;
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. da Silva EL, de Borba RS, Parise-Maltempo PP. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. *Mol Cytogenet* 2012; 5:45;
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3541136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
67. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:5463–7;
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=431765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999; 41:95–8;
<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
69. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673–80;
<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/22.22.4673>

70. Altschul SF, Gish W, Pennsylvania T, Park U. Basic Local Alignment Search Tool Department of Computer Science. 1990; :403–10; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605803602>
71. Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. BMC Bioinformatics 2006; 7:474.

Figure Legends

Figure 1: Comparison of the amino acids sequence of Transposase expected of KD7116 with Tc1-like transposase of other species. X. t. – *Xenopus tropicalis*; S. s. – *Salmo salar*; C. c. – *Cyprinus carpio*; D. l. – *Dicentrarchus labrax*.

Figure 2: In situ fluorescence hybridization using KD7116-1 as probe in *Ancistrus* chromosomes: A – female of Rio Flecha; B – Male of Rio Flecha; C – Female of Córrego Currupira; D – Male of Córrego Currupira; E – Female of Córrego Pari; F – Male of Córrego Pari; G – Female of Córrego Sangradouro e H – Male of Córrego Sangradouro. Capítulo II – Este artigo não está no formato para envio para publicação uma vez que os resultados precisam ser melhor compreendidos.

Figures

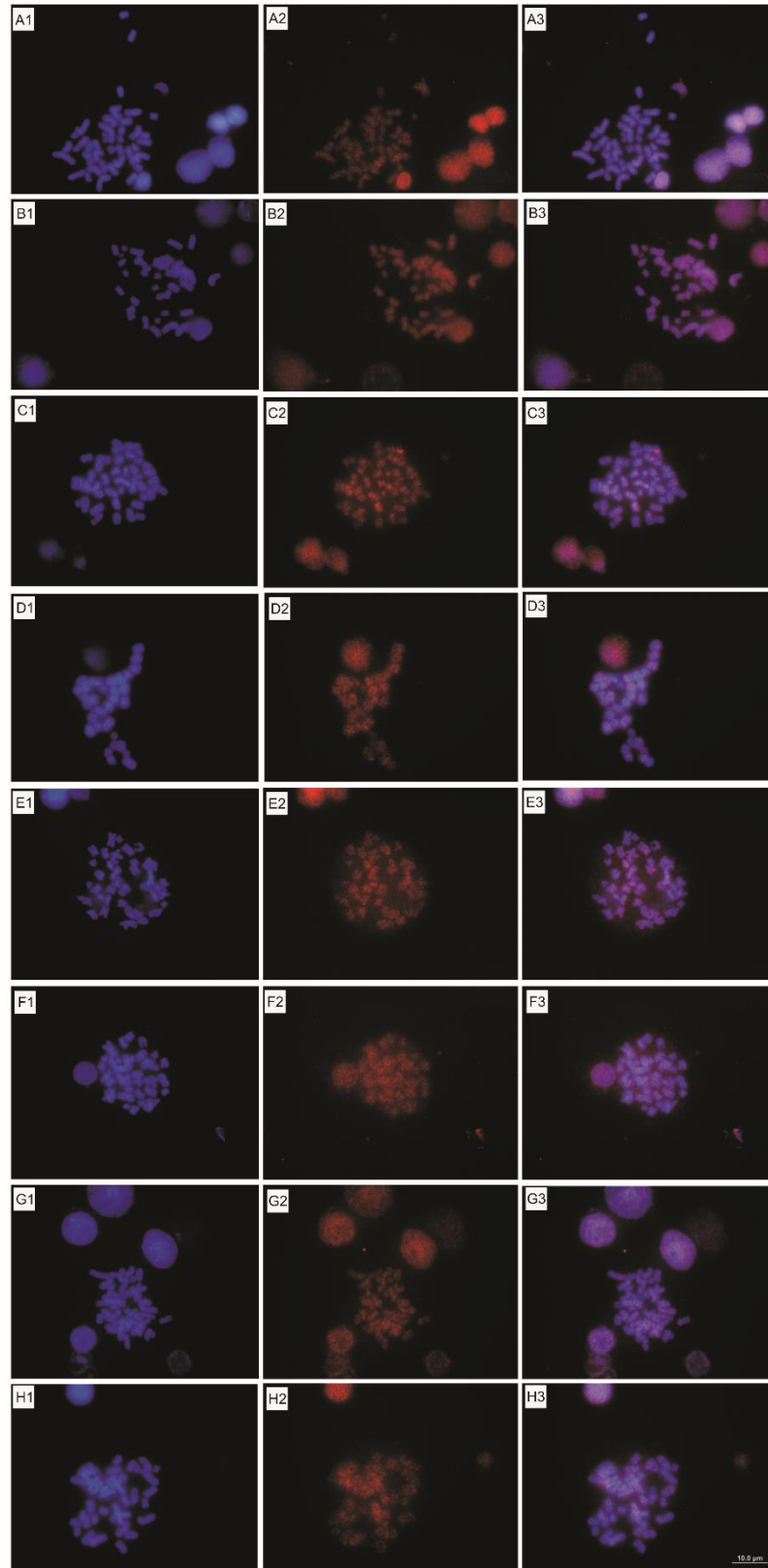
Figure 1

```

KD7116: 65 MARTKEIYEDLRKKAVDAHQAGKGYKTISKMFGLYQSTFRQIVYKWRKFKTIIVTLPRR~RPTKITQRARCIVIGEVTKDPK
X. t. : 1 MPRSKEIQEQMRKKVIEIYQSGKGYKAISKALGLQRTTVRAIIHKWQKHGTVVNLPRSGRPTKITPRAQRQLIREATKDPK
S. s. : 1 MAKTRELCKDIRDKIVDLHKAGMGYRTIGQLGEKATTVGAIIRKWKKFFMTVNHPRSGAPCKISPRGASMIMRKVRDQPR

KD7116: 1 RTKEIYEDLRKKAVDAHQAGKGYKTISKMFGLYQSTFRQIVYKWRKFKTIIVTLPRR~RPTKITQRARCIVIGEVTKDPK
C. c. : 2 RSKELPEELADRIVARHRSQGQYKKISAALKVPKSTVASIILKWKTFGMTRTLPRAGRLAKLSYRGRRALVREVKKNPK
D. l. : 2 RTKEIYEDLRKKAVDAHQAGKGYKTISKMFGLYQSTFRQIVYKWRKFKTIIVTLPR~RRPTKLSNRGRDLVREVKKNPK

```

Figure 2

Capítulo II

Mapeamento cromossômico de dois DNAs satélites centroméricos no genoma de espécies de *Ancistrus* sp (Siluriformes: Loricariidae)

Keteryne Rodrigues da Silva¹

Sandra Mariotto²

Liano Centofante³

Diogo Cavalcante Cabral-de-Mello¹

Patrícia Pasquali Parise-Maltempi¹

Resumo: DNAs satélites (satDNAs) são os elementos mais dinâmicos presentes no genoma de eucariotos, localizados em geral nas regiões terminais e centroméricas, constituindo regiões de heterocromatina. Dentre as possíveis funções apresentadas, os DNAs satélites podem ser utilizados como marcadores citogenéticos auxiliando na compreensão das relações filogenéticas entre diversos táxons no esclarecimento de problemas citotaxonômicos. O gênero *Ancistrus* apresenta atualmente 68 espécies nominais e apresenta uma taxonomia ainda muito confusa, além de apresentarem grande variação cariotípica, número diploide que vai de $2n=40$ a $2n=52$ cromossomos, bem como a existência de sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos. Os DNAs satélites abordados neste estudo foram obtidos a partir da técnica de sequenciamento de baixa cobertura *Illumina next-generation sequencing* (NGS), resultando em 175 clusters. O SatAn1 apresentou 152 pb e o SatAnd2 142 pb, ambos localizados em regiões centroméricas, porém SatAn1 apresenta menor número de cópias.

Palavra-chave: Sequenciamento genômico, Cross-FISH

1 Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética. Av. 24 A, 1515. CEP: 13506-900. Rio Claro, SP, Brasil.

2Instituto Federal de Ciências e Tecnologia do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil;

3Instituto de Biociências, UFMT Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

Introdução

O genoma de eucarioto contém grande quantidade de sequências repetitivas, agrupadas de acordo com suas organizações, que podem ser em tandem ou dispersas ao longo do genoma (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994). DNAs satélites (satDNAs) são os componentes mais dinâmicos do genoma eucarioto e, caracterizam-se por apresentar repetições em tandem de aproximadamente 100 a 300 pb, em geral, com centenas ou milhares de cópias (MARTINS, 2007). O comprimento mais comum dentre os monômeros é de 150-180 pb e 300-360 pb, detectado em diversos satélites em plantas e animais (SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; HENIKOFF; AHMAD; MALIK, 2001).

Em geral, satDNAs estão localizados nas regiões terminais e centroméricas e constituem o principal componente da heterocromatina, bem como DNA intercalar em cromossomos autossomos (YUNIS; YASMINEH, 1971; JOHN; GABOR MIKLOS, 1979; JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993; SHAPIRO; VON STERNBERG, 2005; PETROVIĆ et al., 2009). Alguns DNAs satélites são específicos de determinados cromossomos, como por exemplo cromossomos sexuais ou cromossomos B (MESTRINER et al., 2000; PHILLIPS, 2001; STEIN; PHILLIPS; DEVLIN, 2001; ZIEGLER et al., 2003). A quantidade de DNA satélite no genoma varia significativamente entre as espécies, por vezes, superior a 50% do DNA total (JOHN F. ELDER; TURNER, 1995; SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998) e, conseqüentemente, estão envolvidos na grande variação no tamanho do genoma de eucariotos (DOOLITTLE; SAPIENZA, 1980; CAVALIER-SMITH, 1985; KIDWELL, 2002; GREGORY et al., 2007).

Estudos mais recentes apresentam o significado funcional de DNAs satélites, contestando a interpretação de que essas sequências fossem DNA lixo. Em peixes, podem ser marcadores citogenéticos úteis (LANFREDI et al., 2001; CANAPA et al., 2002; SAITO; EDPALINA; ABE, 2007; FERREIRA; MARTINS, 2008), utilizados para compreender relações filogenéticas entre diversos táxons (DE LA HERRÁN et al., 2001; SAITO; EDPALINA; ABE, 2007), para esclarecer problemas na citotaxonomia (MANTOVANI; MESTRINER; MOREIRA-FILHO, 2004), auxiliar a evidenciar as prováveis origens de cromossomos supranumerários (MESTRINER et al., 2000; DE JESUS et al., 2003; ARTONI et al., 2006; VICARI et al., 2011), e na caracterização de

cromossomos sexuais (DEVLIN; STONE; SMAILUS, 1998; STEIN; PHILLIPS; DEVLIN, 2001; MACHADO et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011; DA SILVA; BUSSO; PARISE-MALTEMPI, 2013; PUCCI et al., 2014).

A família Loricariidae, constituída por peixes popularmente conhecidos como “cascudos”, é um dos mais diversificados da tribo Ancistrini. O gênero *Ancistrus* apresenta atualmente 68 espécies nominais (ESCHMEYER, 2015), e uma taxonomia ainda muito confusa, além de grande variação cariotípica, as quais podem ser relacionadas a variação do número cromossômico, que vai de $2n=40$ a $2n=52$ cromossomos, bem como com a existência de sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos com heterogametia tanto feminina quanto masculina e ocorrência de polimorfismos cromossômicos envolvendo os cromossomos portadores da região organizadora de nucléolos para o grupo (ALVES et al., 2003; ALVES et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2007; MARIOTTO et al., 2009; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006). De acordo com análises cromossômicas, MARIOTTO et al. (2013) sugeriram a existência de 13 citótipos para as espécies de *Ancistrus* encontradas na bacia do Paraguai, Araguaia-Tocantins e Amazônica no estado do Mato Grosso, propondo ainda a existência de possíveis novas espécies nesta região. Sistemas do tipo ZZ/ZW e XX/XY foram encontrados em populações de *Ancistrus* cf. *dubius* e *Ancistrus* sp 08 do pantanal do Mato Grosso (MARIOTTO et al., 2004; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006), sistema do tipo XO em *Ancistrus* n. sp.1 proveniente do Rio Vermelho localizado em Goiás (ALVES et al., 2006) e sistemas múltiplos dos tipos XX/XY1Y2 e Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2 para as espécies *Ancistrus* sp.1 “Balbina” e *Ancistrus* sp.2 “Barcelos” provenientes da Amazônia (DE OLIVEIRA et al., 2008). A espécie abordada neste trabalho, pertencente ao Córrego Currupira na bacia do rio Paraguai, apresenta $2n = 44$ e sistema sexual do tipo ZZ/ZW (Anexos dessa dissertação).

Tendo em vista esta grande diversidade cariotípica e a taxonomia confusa do grupo, o objetivo deste trabalho foi isolar sequencias repetitivas que pudessem estar relacionadas aos processos de origem e evolução dos cromossomos sexuais, bem como auxiliar no entendimento das relações filogenéticas e cariotípicas que envolvem as espécies do gênero *Ancistrus*.

Materiais e métodos

Preparação cromossômica de DNA genômico

Os 42 exemplares de *Ancistrus* abordados neste trabalho foram coletados no córrego Currupira na bacia do rio Paraguai (Figura 1). Os demais indivíduos utilizados para análise comparativa da localização e caracterização das sequências repetitivas isoladas, pertencem as populações do Rio Flecha (34 indivíduos), Córrego Sangradouro (9 indivíduos) e Córrego Pari (19 indivíduos). As preparações cromossômicas foram realizadas a partir do rim anterior dos exemplares coletados seguindo a metodologia descrita por FORESTI et al. (1993). O material foi armazenado em freezer a -20 °C. A extração de DNA foi realizada a partir de fígado e nadadeira dos espécimes coletados, seguindo basicamente o protocolo de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico apresentado por SAMBROOK; RUSSEL (2001).

Sequenciamento e análise das sequências

O genoma da espécie foi sequenciado pelo método *Next-generation sequencing* (NSG) através da plataforma Solexa da Illumina, pela empresa Macrogen localizada na Coreia. Os reads obtidos do sequenciamento genômico foram pré- processados (filtrados e agrupados) através da ferramenta FASTX-TOOLKIT (GORDON, HANNON 2010). Os clusters foram formados a partir do programa RepeatExplorer (NOVAK et al 2013) utilizando os parâmetros padrões do próprio programa. A procura de sequências de DNA satélite foi primeiramente realizada através da análise de densidade dos gráficos de acordo com NOVÁK et al (2010) e em seguida pelo programa Tandem Repeat Finder (BENSON, 1999). A sequências foram alinhadas com o programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) presente no software BioEdit (HALL, 1999). A ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), no National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi utilizada para comparação das sequências obtidas com sequências já depositadas no banco de dados, website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), bem como Censor (KOHANY et al., 2006), RepeatMasker, website (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) e ORF Finder, no National Center for Biotechnology Information (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Amplificação do DNA via PCR

Após o sequenciamento, foram desenhados, manualmente, primers divergentes que foram sintetizados pela empresa SIGMA (Tabela 1). A reação de amplificação seguiu as seguintes condições: desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58°C (primer KCL4) ou 54 °C (primer KCL1) durante 1 minuto, extensão de 72 °C durante 1 minutos e alongação a 72 °C por 7 minutos.

Hibridação *in situ* fluorescente

As sondas utilizadas para a técnica de hibridação *in situ* foram marcadas pela técnica de *nick translation* utilizando digoxigenina, segundo as descrições de PINKEL; STRAUME; GRAY (1986) com modificações de DA SILVA; DE BORBA; PARISE-MALTEMPI (2012). As lâminas foram montadas em solução antifading com DAPI e observados usando um microscópio Olympus BX51 e câmera digital modelo DP71. As imagens foram capturadas usando o software DP Controller software.

Para detecção de duas sondas marcadas com Biotina e Digoxigenina cada, foi realizado a técnica de *Double FISH* na qual na fase de detecção as lâminas foram incubadas com 100 µL de PBD + 4 µL de Anti digoxigenina rodamina + 0,5 µL de Alexa.

Resultados

Análise das sequências SatAn1 e SatAn2

O sequenciamento de baixa cobertura *Illumina next-generation sequencing* (NGS) realizado a partir do genoma do espécime pertencente ao Córrego Currupira resultou em 175 clusters, obtidos com o programa RepeatExplorer, de possíveis famílias de DNA repetitivo. Foram selecionados os cinco clusters mais representativos do genoma, que apresentaram características típicas de DNAs satélites, segundo Novák et al (2010) (Tabela 2). Os contigs presentes em cada cluster foram analisados pelo programa Tandem Repeat Finder e as sequências com maior repetição dentre eles foram selecionadas e alinhadas com a ferramenta ClustalW no programa BioEdit. Dentre os cinco clusters que representam possíveis DNA satélites, as duas sequências maiores

foram selecionadas para este trabalho, o SatAn1 que apresentou 142 pb e o SatAn2 com 139 pb (Tabela 3).

Análise de PCR das sequências SatAn1 e SatAn2 em espécimes de outras populações

A amplificação dos elementos SatAn1 e SatAn2 por reação em cadeia da polimerase no genoma de outros espécimes pertencentes a outras populações: Rio Flecha, Córrego Pari e Córrego Sangradouro, revelou padrão em escada, típico de DNA satélite, assim como no espécime pertencente ao Córrego Currupira do qual as sequências foram obtidas (Figura 2).

Distribuição cromossômica de SatAn1 e SatAn2

Foram analisadas 192 metáfases da população pertencente ao Córrego Currupira, 78 metáfases da população pertencente ao Rio Flecha, 34 metáfases da população do Córrego Pari e 118 metáfases da população do Córrego Sangradouro. Os resultados serão apresentados detalhadamente abaixo.

Satélite SatAn1

Na população do Córrego Currupira, da qual esta sequência foi obtida, o mapeamento cromossômico revelou marcações localizadas em regiões centroméricas de 10 pares cromossômicos, incluindo o centrômero dos cromossomos sexuais Z e W, enquanto os demais 24 cromossomos não apresentaram nenhuma marcação, não havendo diferença entre fêmea e macho (Figura 3A e 3B).

Nos cromossomos de fêmeas da população do Rio Flecha, as marcações ficaram distribuídas nas regiões centroméricas de 5 pares cromossômicos, e neste caso os centrômeros dos cromossomos sexuais XX não apresentam sinal (Figura 4A). Já os machos dessa população mostram 18 cromossomos marcados na região centromérica, porém não foi possível identificar os cromossomos sexuais em nenhuma das metáfases analisadas (Figura 4B).

Os indivíduos fêmea provenientes do Córrego Pari mostraram 5 pares de cromossomos marcados nas regiões centroméricas, sem identificação dos cromossomos sexuais XX (Figura 4C). Porém, nos indivíduos machos, foram observadas marcações

centroméricas em 11 cromossomos, sendo provavelmente esta marcação ímpar presente em um dos cromossomos sexuais (Figura 4D).

Foram observadas marcações centroméricas em 5 pares cromossômicos, tanto de fêmeas quanto de machos do Córrego Sangradouro e nenhuma marcação nos cromossomos sexuais X e Y (Figuras 4E e 4F).

Satélite SatAn2

O mapeamento cromossômico deste satélite, revelou marcações também centroméricas nos cromossomos da população do Córrego Currupira, em quase todos os cromossomos, inclusive nos cromossomos sexuais Z e W, não havendo diferença entre macho e fêmea (Figura 3C e 3D).

A técnica de Double-FISH foi realizada para comparar a localização dos dois DNAs satélites isolados e os resultados mostraram que os dois satélites encontram-se co-localizados em alguns cromossomos (Figura 3E e 3F).

Nas demais populações, os resultados foram semelhantes tanto em machos quanto em fêmeas, ou seja, quase todos os cromossomos mostraram marcações na região do centrômero. Nenhuma população mostrou marcações nos cromossomos sexuais (Figuras 5).

Discussão

Estudos vêm demonstrando que sequências repetitivas são importantes na organização estrutural e na variação do tamanho dos genomas (SCHUELER et al., 2001) e responsáveis por grande parte da variação cariotípica de muitos grupos, envolvendo-se em rearranjos cromossômicos como deleções, duplicações, inversões e translocações (KIDWELL, 2002). Além disso, um papel importante na manutenção e segregação do material nuclear, tendo em vista sua localização nos centrômeros e telômeros em cromossomos de eucariotos, necessária para o posicionamento correto das proteínas de definição dos centrômeros (ROSIC; KOHLER; ERHARDT, 2014). No fim dos anos de 1980 ocorreram as primeiras descrições de DNAs satélites em peixes (DATTA et al., 1988; MOYER et al., 1988), e desde então estudos vêm demonstrando que, além dessas sequências estarem localizadas em regiões centroméricas dos cromossomos

(LANFREDI et al., 2001; SOLA; GORNUNG, 2001; CANAPA et al., 2002), também se encontram em regiões pericentroméricas (DE JESUS et al., 2003; SCHEMBERGER et al., 2011; PAÇO et al., 2014; FELICIELLO et al., 2015) e teloméricas (SAITO; EDPALINA; ABE, 2007; VICARI et al., 2008; SCHEMBERGER et al., 2011).

A hibridação *in situ* dos dois satélites isolados neste trabalho, SatAn1 e SatAn2 mostra marcações centroméricas, em determinados cromossomos de todas os espécimes de *Ancistrus* analisados neste trabalho. Com base em dados prévios de bandeamento C (MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006; Anexo dessa dissertação), a distribuição de heterocromatina está restrita principalmente às regiões centroméricas dos cromossomos de *Ancistrus* (Figuras 1, 2, 3 e 4 – Anexo da dissertação). Sendo assim, o resultado obtido a partir da localização desses elementos repetitivos corrobora com dados encontrados em outros trabalhos, os quais afirmam a associação de DNAs satélites a regiões centroméricas, sendo o principal componente da heterocromatina. Infere-se que esta região tenha poucos genes e uma reduzida taxa de recombinação, o que leva ao acúmulo de sequências repetitivas, principalmente de DNA satélite (TEIXEIRA, 2008). Os resultados obtidos com o *Double FISH* reforçam que esses satélites encontram-se co-localizados em regiões centroméricas de alguns cromossomos sendo assim, por tratar-se de satélites diferentes, podemos inferir que a heterocromatina centromérica desta espécie possui pelo menos duas classes de DNA satélites diferentes.

Uma característica interessante da maioria dos satélites localizados nas regiões centroméricas, é que estes apresentam uma unidade de comprimento de 155-180 pb (HENIKOFF; AHMAD; MALIK, 2001), o que está de acordo com os satélites isolados SatAn1 e SatAn2, que mostraram tamanho de 142 e 139 pb, respectivamente.

Baseado em estudos com o cromossomo 8 de arroz, foi levantada a hipótese de que a ocorrência de uma baixa abundância de repetições satélites em determinados centrômeros representa uma fase inicial na evolução deste centrômero, caracterizada por acumulação progressiva de satélite em centrômeros maduros (NAGAKI et al., 2004; WU et al., 2004). Esta pode ser uma possível explicação da ausência de sinais dos satélites SatAn1 e SatAn2 em alguns cromossomos. Outra explicação seria de que essas sequências se apresentam com baixo número de cópias em alguns centrômeros, o que dificulta a detecção de sinal pela técnica de FISH, o que não significa que elas não estejam presentes nesses centrômeros.

Estudos comparativos de DNAs satélites mostraram que, em alguns casos, apesar de rápida divergência nucleotídica, algumas regiões contendo poucos nucleotídeos permaneceram conservadas entre DNAs satélites de espécies filogeneticamente distantes (MADSEN et al., 1994). O exemplo mais interessante é o das sequências pertencentes à família alfa satélite, presente em todas as espécies de primatas investigadas. Trata-se de um DNA satélite com unidades de repetição de aproximadamente 170 pb que está presente no centrômero de todos os cromossomos da maioria das espécies de primatas, com exceção do Y (HAAF et al., 1995). Em cada unidade de repetição de 170 pb, existe um elemento conservado de 17 pb, denominado de *CENP-B box*, que é usado como sítio de ligação de uma proteína centromérica específica, a *CENP-B*. Esta proteína se liga a uma proteína associada aos microtúbulos (MAP), que por sua vez, se liga aos microtúbulos do fuso (THERMAN; SUSMAN, 1996). Esses fatos indicam que o DNA satélite alfa deve estar envolvido na formação do centrômero, contribuindo para a segregação dos cromossomos na mitose e meiose através de interações com proteínas centroméricas específicas (WILLARD, 2001). Esta mesma sequência também foi encontrada nos DNAs satélites das espécies de roedores *Mus musculus* (BROCCOLI; MILLER; MILLER, 1990), *Gerbillus nigeriae* (VOLOBOUEV et al., 1995), galinhas e em Zebrafish (LI; KIRBY, 2003).

No caso dos *Ancistrus* ainda não foi possível mostrar alguma relação dos satélites isolados com as funções centroméricas e diferente do caso do satélite dos primatas citado acima, foi possível observar uma pequena diferença na distribuição dos satélites centroméricos SatAn1 e SatAn2 nas populações analisadas.

O grupo dos *Ancistrus* é taxonomicamente confuso e as populações aqui abordadas ainda não estão taxonomicamente identificadas, porém acredita-se tratar de espécies diferentes, e os dados obtidos neste trabalho podem ser mais uma ferramenta para auxiliar nessa identificação. Apesar das populações que apresentam cromossomos sexuais XX/XY (Flecha, Pari e Sangradouro) mostrarem em geral 10 pares marcados com o SatAn1 e nenhuma marcação nos cromossomos sexuais, pode-se observar uma pequena diferença na quantidade de marcações nos cromossomos de indivíduos machos da população do Rio Flecha e Córrego Pari. Além disso, há uma grande diferença dessas populações com a aquela proveniente do Córrego Currupira, que apresenta par sexual do tipo ZZ/ZW.

Sequências de DNAs satélites são intraespecíficas, ou seja, são mais homogêneas quando comparadas entre uma espécie, do que quando comparada entre espécies distintas (UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002). Esta homologia das sequências de DNA satélite se dá através da evolução em concerto (DOVER, 1986). Nestes casos, a dispersão intercromossômica seria mais rápida que a taxa de mutação/homogeneização intracromossômica. Diante da dinâmica evolutiva extremamente variável dos DNAs satélites estes podem, de fato, prover informações úteis tanto para estudos microevolutivos (no caso de satélites espécie específicos ou cromossomos específicos) (UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002), como para estudos filogenéticos (onde um DNA satélite é compartilhado por algumas espécies de um determinado grupo) (PONS; PETITPIERRE; JUAN, 2002; PONS; GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009).

Estudos provam que os DNAs satélites são úteis no esclarecimento de uma variedade de questões, dentre elas a estrutura centromérica, e origem e evolução de cromossomos sexuais e cromossomos supranumerários assim como, contribuem para o desenvolvimento de marcadores genéticos de grande importância para a biologia fundamental e aplicada de peixes (MARTINS, 2007). Sendo assim, a riqueza de sequências repetitivas nas regiões centroméricas nos cromossomos de *Ancistrus* sugerem que tais sequências desempenham um papel importante na manutenção e evolução da estrutura cromossômica desta espécie. No entanto, a diversidade e as diferenças entre os centrômeros sugerem que mecanismos adicionais também desempenham um papel na determinação do centrômero, sugerindo que eventos de deleção/amplificação os tornaram altamente dinâmicos.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei , Siluriformes , Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57–63, 2003.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, Á.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, n. 1-3, p. 1–9, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-005-0715-1>>.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; DE JESUS, C. M.; DE ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p. 277–284, 2006.

BROCCOLI, D.; MILLER, O. J.; MILLER, D. A. Relationship of mouse minor satellite DNA to centromere activity. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 54, n. 3-4, p. 182–186, 1990. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000132989>>.

CANAPA, A.; CERIONI, P. N.; BARUCCA, M.; OLMO, E.; CAPUTO, V. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. **Chromosome Research**, v. 10, n. 4, p. 297–304, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1016519708187>>.

CAVALIER-SMITH, T. Selfish DNA and the origin of introns. **Nature**, v. 315, n. 6017, p. 283–284, 23 maio 1985. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/315283b0>>.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA in Eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215–20, 15 set. 1994. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v371/n6494/pdf/371215a0.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2015.

DA SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolus organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and genome research**, v. 139, n. 1, p. 22–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037972>>.

DA SILVA, E. L.; DE BORBA, R. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012. Disponível

em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3541136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DATTA, U.; DUTTA, P.; MANDAL, R. K.; UNIT, E. Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. v. 62, p. 331–336, 1988.

DE JESUS, C. M.; GALETTI, P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25–32, 2003.

DE LA HERRÁN, R.; FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; ROSSI, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. a. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 3, p. 432–436, 2001.

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 301–306, 2007.

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 134, n. 2, p. 243–249, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-007-9231-9>>.

DEVLIN, R. H.; STONE, G. W.; SMAILUS, D. E. Extensive Direct-Tandem Organization of a Long Repeat DNA Sequence on the Y Chromosome of *Chinook Salmon* (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, n. 3, p. 277–287, mar. 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/PL00006304>>.

DOOLITTLE, W. F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, v. 284, n. 5757, p. 601–603, 17 abr. 1980. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/284601a0>>.

DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. Trends in **Genetics**, v. 2, p. 159–165, 1986.

ESCHMEYER, W. Catalog of Fishes: GENERA, SPECIES, REFERENCES. Disponível em: <<http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>>. Acesso em: 1 out. 2015.

FELICIELLO, I.; AKRAP, I.; BRAJKOVI, J.; ZLATAR, I.; UGARKOVI, U. Satellite DNA as a Driver of Population Divergence in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 228–239, 22 jan. 2015. Disponível em: <<http://gbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/gbe/evu280>>.

FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 411–418, jun. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432807000364>>.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810–813, 1993.

GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K.; LEITCH, I. J.; MURRAY, B. G.; KAPRAUN, D. F.; GREILHUBER, J.; BENNETT, M. D. Eukaryotic genome size databases. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database, p. D332–D338, 3 jan. 2007. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkl828>>.

GORDON, A.; HANNON, G.J. FASTX-Toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools. 2010. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/.

HAAF, T.; MATER, A. G.; WIENBERG, J.; WARD, D. C. Presence and abundance of CENP-B box sequences in great ape subsets of primate-specific alpha-satellite DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 4, p. 487–491, out. 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00160320>>.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K.; MALIK, H. S. The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving DNA. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1098–1102, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1062939>>.

JOHN, B.; GABOR MIKLOS, G. L. Functional Aspects of Satellite DNA and Heterochromatin. In: [s.l: s.n.]p. 1–114.

- JOHN F. ELDER, J.; TURNER, B. J. Concerted Evolution of Repetitive DNA Sequences in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 3, p. 297–320, 1995. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3035722>>.
- JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescentin situ hybridization. **Chromosome Research**, v. 1, n. 3, p. 167–174, set. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00710770>>.
- KANTEK, D. L. Z.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of the Constitutive Heterochromatin of *Astyanax* sp. (Characiformes: Characidae) from the Upper Iguaçu River (PR). **Folia Biologica**, v. 57, n. 1, p. 37–41, 31 dez. 2009. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0015-5497&volume=57&issue=1&spage=37>>.
- KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, p. 49–63, 2002.
- KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 474, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/474>>.
- LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; HERRÁN, R. dela; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; REJÓN, C. R.; REJÓN, M. R.; FONTANA, F. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. **Chromosome Research**, v. 9, n. 1, p. 47–52, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1026739616749>>.
- MACHADO, T. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; PUCCI, M. B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC genetics**, v. 12, n. 1, p. 65, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/12/65>>.
- MADSEN, C. S.; BROOKS, J. E.; KLOET, E. de; KLOET, S. R. de. Sequence conservation of an avian centromeric repeated DNA component. **Genome**, v. 37, n. 3,

- p. 351–355, jun. 1994. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g94-050>>.
- MANTOVANI, M.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. *Astyanax scabripinnis*. **System**, v. 542, n. 4A, p. 536–542, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134341>>.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.; FILHO, O. M. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 595–600, 2009.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O. Diversificação de sítios do DNA ribossômico 5S e 18S em populações de sete espécies do gênero *Ancistrus* (Loricariidae, Ancistrini) das três bacias hidrográficas do Mato Grosso, Brasil. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 1689–1699, 2013.
- MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C. S. *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 299–304, 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://000244626300001>.
- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Fish **Cytogenetics**. p. 421–453.
- MESTRINER, C. A.; GALETTI, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, n. 1, p. 1–9, 7 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1046/j.1365-2540.2000.00702.x>>.
- MOYER, S. P.; MA, D. P.; THOMAS, T. L.; GOLD, J. R. Characterization of a highly repeated satellite DNA from the cyprinid fish *Notropis lutrensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 91, n. 4, p. 639–646, jan. 1988. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030504918890185X>>.

NAGAKI, K.; CHENG, Z.; OUYANG, S.; TALBERT, P. B.; KIM, M.; JONES, K. M.; HENIKOFF, S.; BUELL, C. R.; JIANG, J. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. **Nature Genetics**, v. 36, n. 2, p. 138–145, 11 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14716315>>.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, 11, 378. 2010.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAIŠL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics Advance Access**. p1-2. 2013.

PAÇO, A.; ADEGA, F.; MEŠTROVIĆ, N.; PLOHL, M.; CHAVES, R. Evolutionary story of a satellite DNA from *Phodopus sungorus* (Rodentia, Cricetidae). **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 10, p. 2944–55, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4224359&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PETROVIĆ, V.; PÉREZ-GARCÍA, C.; PASANTES, J.; SATOVIĆ, E.; PRATS, E.; PLOHL, M. A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 124, n. 1, p. 63–71, 2009. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000200089>>.

PHILLIPS, R. B. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to fish genetics and genome mapping. **Marine Biotechnology**, v. 3, p. S145–S152, 2001.

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

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PONS, J.; GILLESPIE, R. G. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide

composition of the repeats. **Gene**, v. 313, n. 1-2, p. 169–177, ago. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111903006760>>.

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Molecular biology and evolution**, v. 19, n. 8, p. 1329–1340, 2002.

PUCCI, M. B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, n. 3, p. 541–553. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bij.12218>>.

ROSIC, S.; KOHLER, F.; ERHARDT, S. Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. **The Journal of Cell Biology**, v. 207, n. 3, p. 335–349, 10 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201404097>>.

SAITO, Y.; EDPALINA, R. R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, n. 2, p. 157–166, 5 set. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-006-9126-1>>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, M. G. **Molecular cloning: a laboratory manual**. third edn ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHEMBERGER, M. O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; SCHÜHLI, G. S.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 139, n. 11-12, p. 1499–1508, 24 dez. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-012-9649-6>>.

SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 5, p. 195–199. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138598012230>>.

SCHUELER, M. G.; HIGGINS, A. W.; RUDD, M. K.; GUSTASHAW, K.; WILLARD, H. F. Genomic and Genetic Definition of a Functional Human Centromere. **Science**, v.

294, n. 5540, p. 109–115, 5 out. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1065042>>.

SHAPIRO, J. A; VON STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 80, n. 2, p. 227–250, 2005.

SOLA, L.; GORNUNG, E. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): An overview. **Genetica**, v. 111, n. 1-3, p. 397–412, 2001.

STEIN, J.; PHILLIPS, R. B.; DEVLIN, R. H. Identification of the Y chromosome in *Chinook salmon* (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 92, n. 1-2, p. 108–110, 2001. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000056878>>.

THERMAN, E.; SUSMAN, M. Cromosomas humanos: estrutura, comportamento y efectos. 3a. ed. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 1996.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO journal**, v. 21, n. 22, p. 5955–5959, 2002.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 1, p. 67–72, 2008. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000151318>>.

VICARI, M. R.; DE MELLO PISTUNE, H. F.; CASTRO, J. P.; DE ALMEIDA, M. C.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M.; ARTONI, R. F. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, n. 8, p. 1073–1081, 27 ago. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-011-9611-z>>.

VOLOBOUEV, V.; VOGT, N.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; MALFOY, B.; DUTRILLAUX, B. Characterization and chromosomal location of two repeated DNAs in three *Gerbillus* species. **Chromosoma**, v. 104, n. 4, p. 252–259, dez. 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00352256>>.

WILLARD, H. . Evolution and function of alpha satellite DNA. **Pathology Biology**, v. 49, p. 390, 2001.

WU, J.; YAMAGATA, H.; HAYASHI-TSUGANE, M.; HIJISHITA, S.; FUJISAWA, M.; SHIBATA, M.; ITO, Y.; NAKAMURA, M.; SAKAGUCHI, M.; YOSHIHARA, R.; KOBAYASHI, H.; ITO, K.; KARASAWA, W.; YAMAMOTO, M.; SAJI, S.; KATAGIRI, S.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; KATAYOSE, Y.; MATSUMOTO, T.; SASAKI, T. Composition and structure of the centromeric region of rice chromosome 8. **The Plant cell**, v. 16, n. 4, p. 967–976, 2004.

YUNIS, J. J.; YASMINEH, W. G. Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function. **Science**, v. 174, n. 4015, p. 1200–1209, 17 dez. 1971. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.174.4015.1200>>.

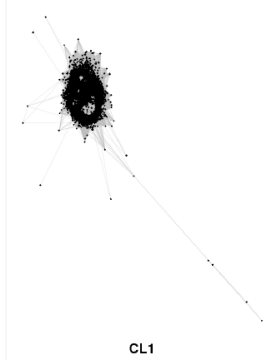
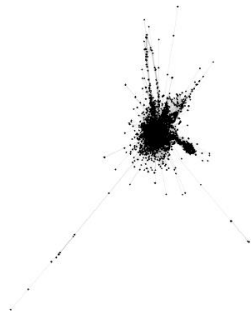
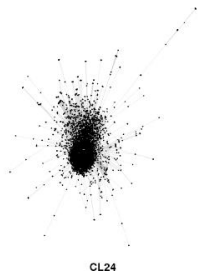
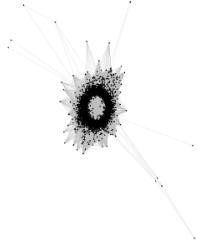
ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, n. 1, p. 23–35, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1022053931308>>.

Tabelas

Tabela 1: Primers utilizados nas reações para obtenção das sequências isoladas no genoma de diferentes espécies de *Ancistrus*.

Tabela de Primers	
KCL-1 F	AAGCCTTGGTTGAATTTTAG
KCL-1 R	ATTTTACTAACTAAAGGTTGT
KCL-4 F	GTGATATGTGATGCCCATTG
KCL-4 R	CTCAGATTGCACCCGGGA

Tabela 2: Tabela do sequenciamento da amostra 7355 com a representação dos clusters selecionados de acordo com o gráfico, que demonstra similaridade com DNAs satélites.

Amostra	Número de reads	Gráfico
KCL1	11826	
KCL4	19475	
KCL24	9998	
KCL27	9004	

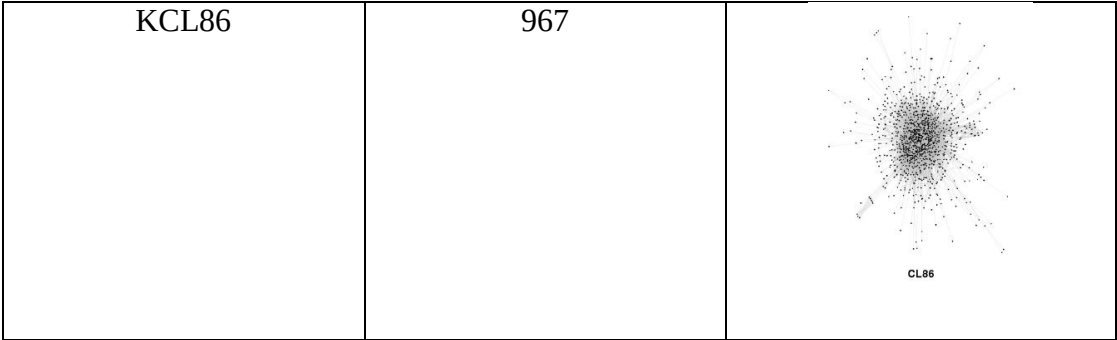


Tabela 3: Sequência de nucleotídeos dos DNAs satélites SatAn1 e SatAn2.

Satélite	Sequência
SatAn1	CATACTACAACCTTTAGTTTTAGTAAAATAAGCCTTGGTTGAATTTTAGTTAATTTTTTC TATAAATAAATTGCTACTGTAATACAGTCATATGATTTATTGATATAATTTTCGCTTGT AGTGTGGAGAGACACATCTGATAAA
SatAn2	GGCCACGAAATTCGGCAAGCTTGGTCCCGGGTGCAATCTGAGGTGATATGTGATGCC CATTGGGCCCCTATGGACCCCGGGTGGGCCCTGTGGACCCTGGGTGGGCCAATGACT GTAAC TCAGTCAGTTTTCGACCTAC

Figuras

Figura 1: Mapa ampliado da rede hidrográfica do rio Paraguai evidenciando os pontos de coleta (Triângulos vermelhos). A (Rio Flecha), B (Córrego Currupira), C (Córrego Pari) e D (Córrego Sangradouro). Fonte Agencia Nacional das Águas (ANA).

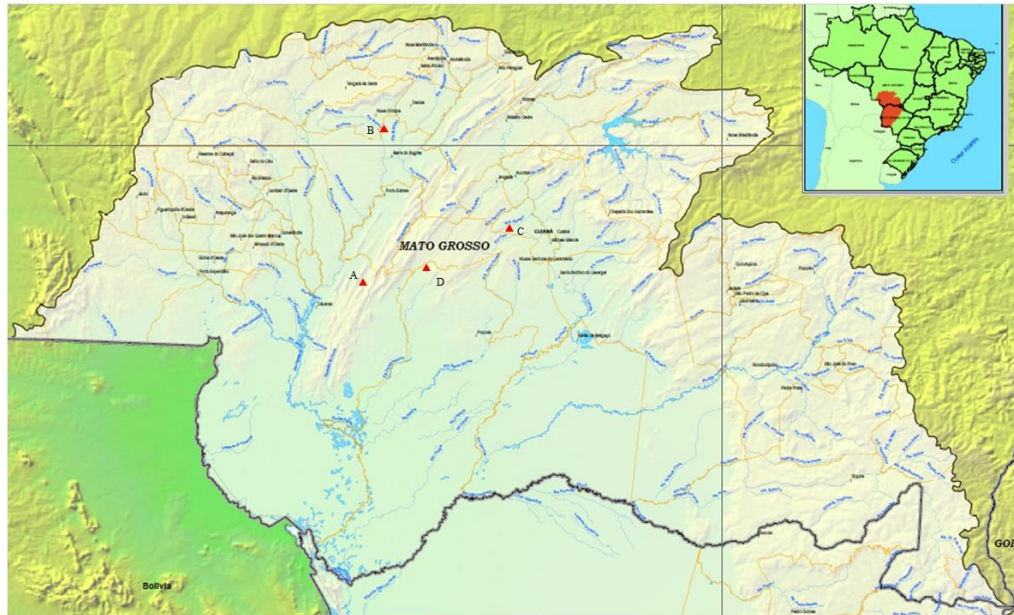


Figura 2: Gel de eletroforese da amplificação a partir do DNA genômico. A – Currupira macho, Currupira fêmea (SatAn1); Currupira fêmea e Currupira macho (SatAn2). B – Flecha macho, flecha fêmea, pari macho, pari fêmea, sangradouro macho e sangradouro fêmea, com SatAn1; C - – Flecha macho, flecha fêmea, pari macho, pari fêmea, sangradouro macho e sangradouro fêmea, com SatAn2.

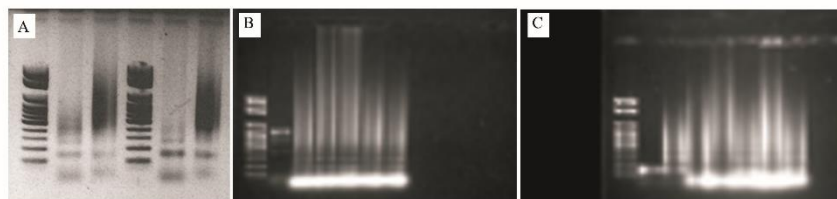


Figura 3: Hibridação *in situ* fluorescente nos cromossomos da população do Córrego Currupira. A – Fêmea com SatAn1; B – Macho com SatAn1; C – Fêmea SatAn2; D – Macho com SatAn2; E – Double FISH com as duas sondas em macho.

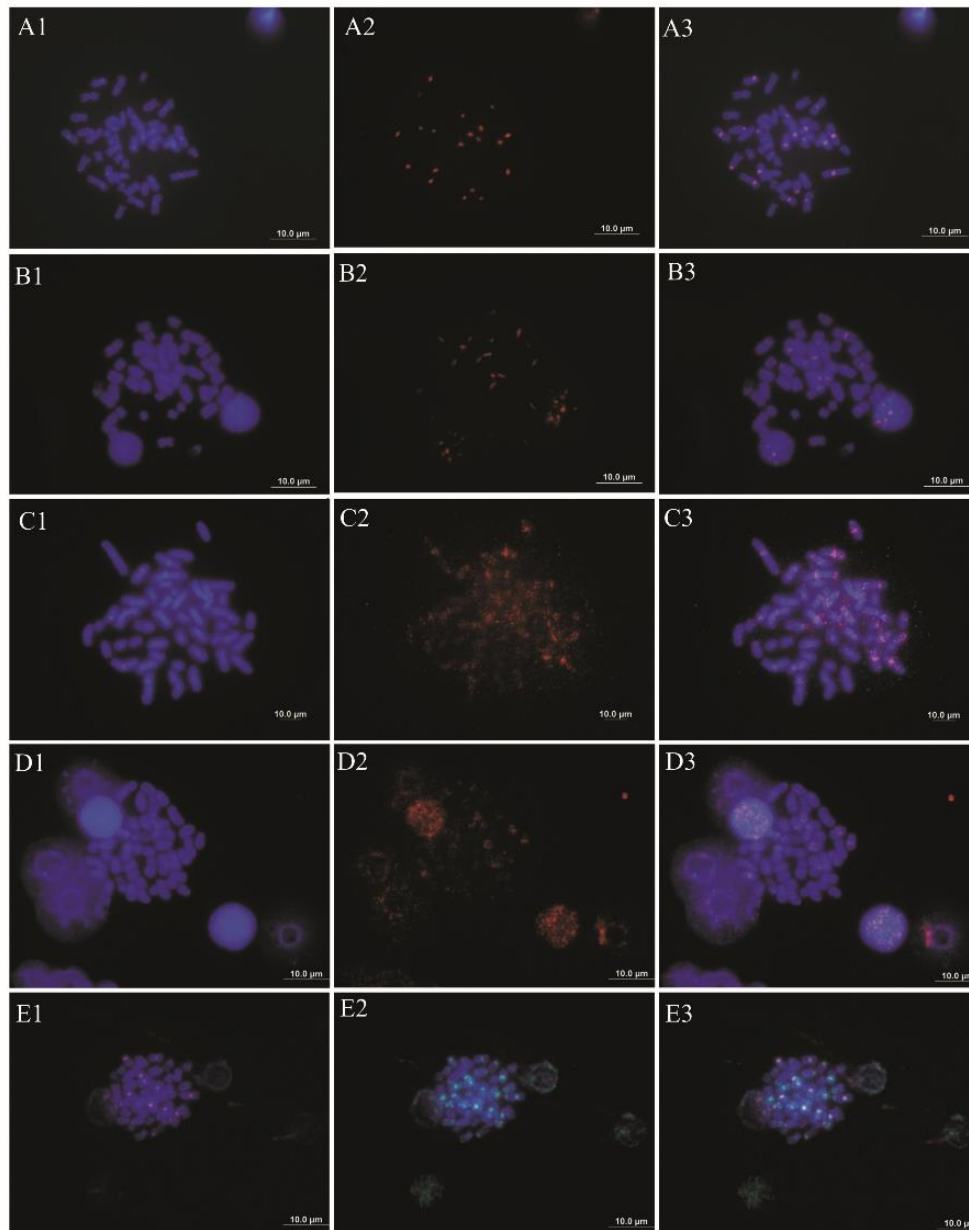


Figura 4: Hibridação *in situ* fluorescente utilizando SatAn1 como sonda. A – Rio Flecha fêmea; B – Rio Flecha macho; C – Córrego Pari fêmea; D – Córrego Pari macho; E – Córrego Sangradouro fêmea; F Córrego Sangradouro macho.

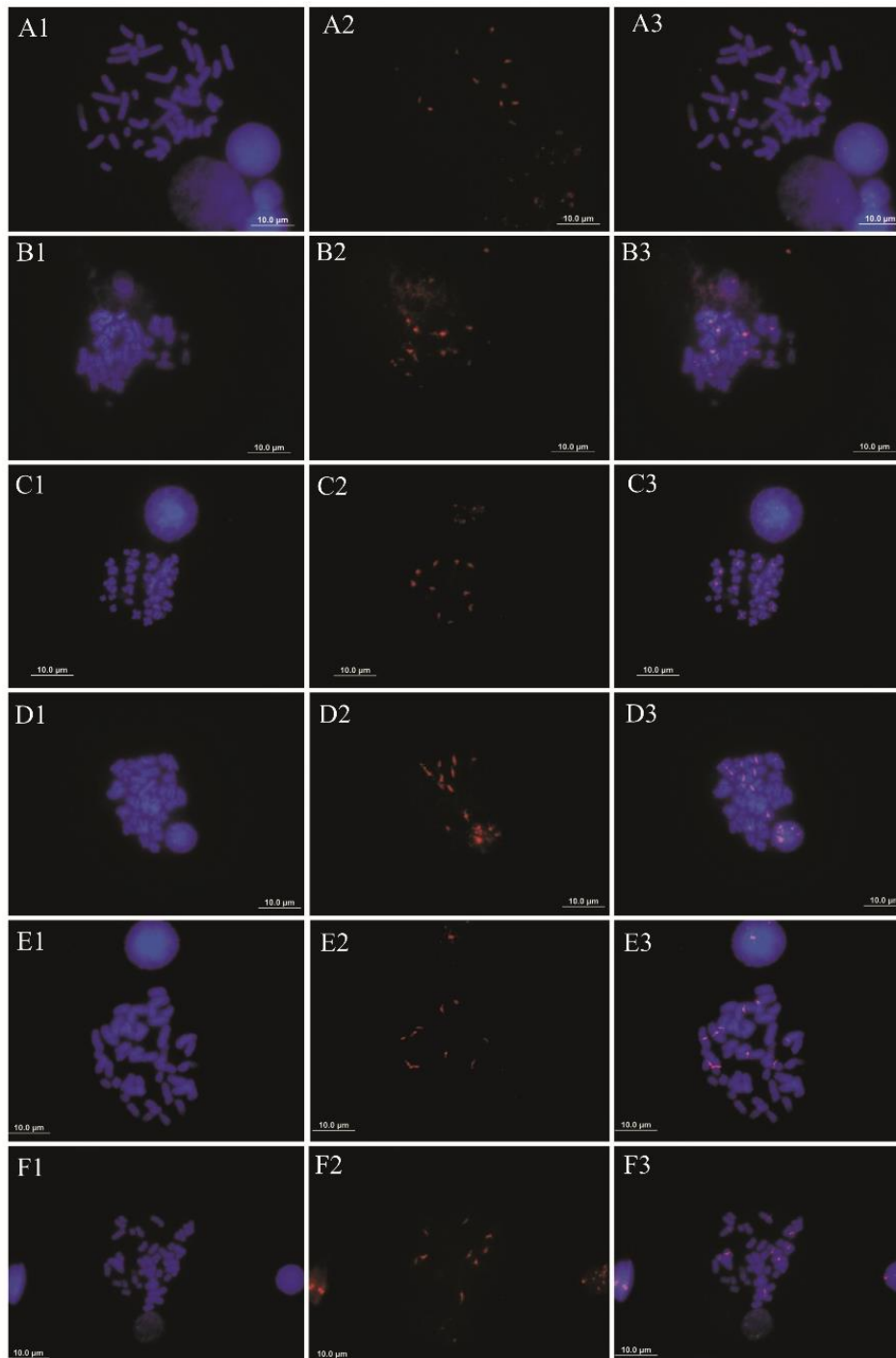
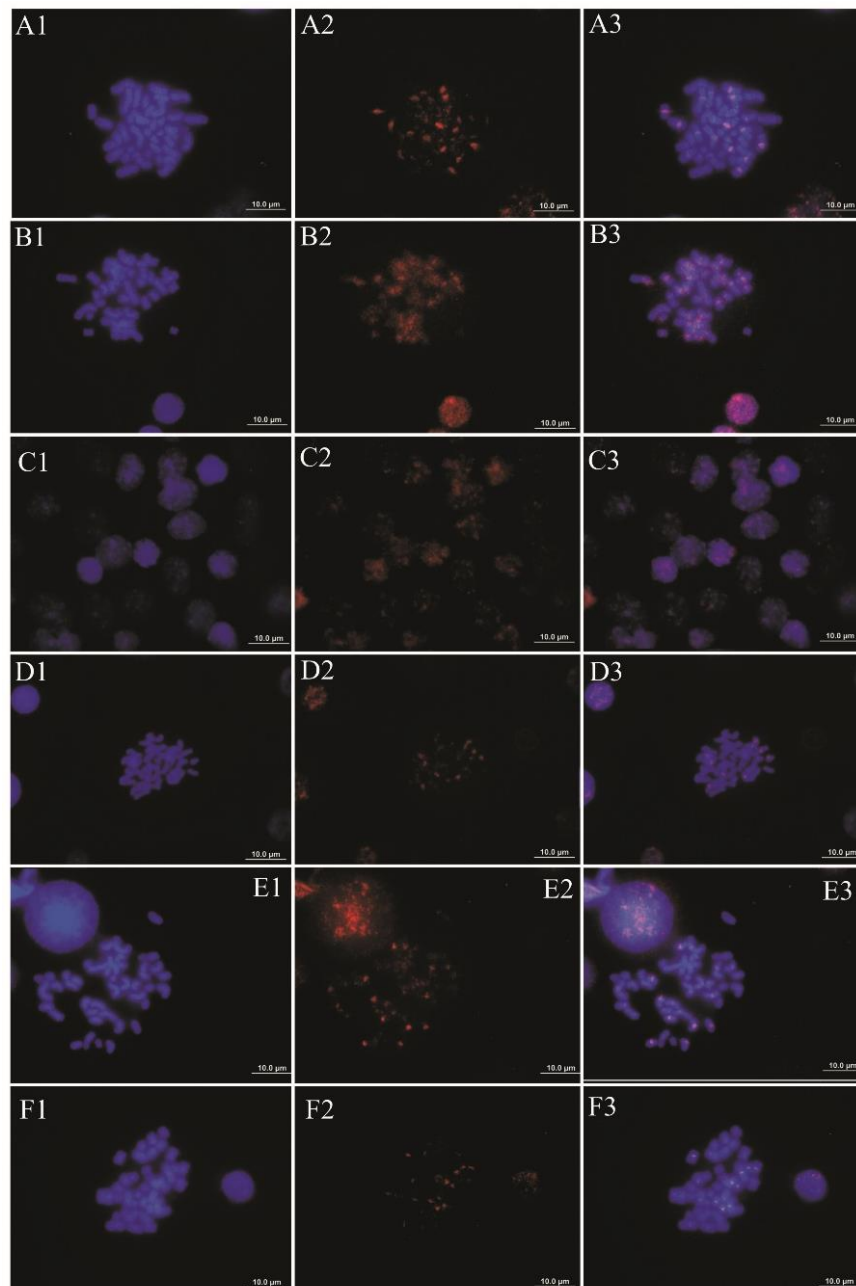


Figura 5: Hibridação *in situ* fluorescente utilizando SatAn2 como sonda. A – Rio Flecha fêmea; B – Rio Flecha macho; C – Córrego Pari fêmea; D – Córrego Pari macho; E – Córrego Sangradouro fêmea; F Córrego Sangradouro macho.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Ancistrus* apresenta uma grande variedade cariotípica. Neste trabalho foram apresentados espécimes que possuem $2n=42$ e cromossomos sexuais XX/XY (representantes do Rio Flecha, Córrego Pari e Córrego Sangradouro), bem como espécimes que possuem $2n=44$ e cromossomos sexuais ZZ/ZW (representantes do Córrego Currupira);

A sequência isolada por digestão enzimática do DNA genômico de exemplares do Rio Flecha corresponde possivelmente a um elemento transponível da família TC1/mariner, e este apresenta-se distribuído ao longo de todos os cromossomos de todos os espécimes analisados neste trabalho, sendo assim um possível marcador citogenético para o grupo de *Ancistrus*;

As sequências isoladas SatAn1 e SatAn2 apresentam um padrão de distribuição similar a DNAs satélites, e estão organizados principalmente nas regiões de heterocromatina centroméricas de alguns cromossomos das populações analisadas. Os resultados obtidos permitiram a observação de pequenas diferenças entre as populações do Rio Flecha, Córrego Pari e Córrego Sangradouro, que possuem sistema sexual do tipo XX/XY e grande diferença destas com a população do Currupira que possui sistema sexual do tipo ZZ/ZW;

No estudo da diversificação cariotípica e genômica de distintos grupos eucariotos, bem como no estudo da origem e evolução de cromossomos sexuais, o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente tem demonstrado ser uma ferramenta muito útil.

Além desses dados interessantes em relação aos centrômeros, encontrados para este grupo, pode-se destacar nesse trabalho que as novas tecnologias de sequenciamento (Sequenciamento genômico de baixa cobertura) para isolar sequências repetitivas são altamente eficientes permitindo a obtenção de uma grande quantidade de informação com mais rapidez.

Referências

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; JULIAN LEWIS, M. R.; ROBERTS, K.; WALTER, P. MOLECULAR STRUCTURE OF GENES AND CHROMOSOMES. In: **Molecular biology of the cell**. p. 405–445. 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605803602>>.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57–63, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00087114.2003.10589308>>.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, Á.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, n. 1-3, p. 1–9, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-005-0715-1>>.
- ARNASON, U.; GRÉTARSDÓTTIR, S.; WIDEGREN, B. Mysticete (baleen whale) relationships based upon the sequence of the common cetacean DNA satellite. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 6, p. 1018–1028, 1992.
- ARTONI, R. F.; CARLOS BERTOLLO, L. A. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, n. 3, p. 201–210, 22 abr. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.2001.00201.x>>.
- AVANCINI, R. M. P.; WALDEN, K. K. O.; ROBERTSON, H. M. The genomes of most animals have multiple members of the Tc1 family of transposable elements. **Genetica**, v. 98, n. 2, p. 131–40, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8976061>>.
- BACHMANN, L.; SCHIBEL, J. M.; RAAB, M.; SPERLICH, D. Satellite DNA as a taxonomic marker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 1, p. 3–11. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030519789390004B>>.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 573–580, 1999.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521–524, 5 out. 2006. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/443521a>>.

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

<<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/27.2.596>>.

BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J.-N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates.

Chromosome Research, v. 16, n. 1, p. 203–215, 2008.

BREZINSKY, L.; WANG, G. V. L.; HUMPHREYS, T.; HUNT, J. The transposable element Uhu from Hawaiian *Drosophila*--member of the widely dispersed class of Tc1-like transposons. **Nucleic Acids Res**, v. 18, n. 8, p. 2053–2059, 1990.

BRITO, M. R. **Análise filogenética da ordem siluriformes com ênfase nas relações da superfamília loricarioidea (teleostei:ostariophys)**. 2003. Universidade de São Paulo, 2003.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. **Manual de identificação de peixes da região de três marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do são francisco)**. 1984.

BURGESS, W. E. **An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the siluriformes**. Tfh Pubns Inc, 1989.

BUSSIEK, M.; HOISCHEN, C.; DIEKMANN, S.; BENNINK, M. L. Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. **Journal of Structural Biology**, v. 167, n. 1, p. 36–46, 2009.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.010>>.

CAPRIGLIONE, T.; ODIERNA, G.; CAPUTO, V.; CANAPA, A.; OLMO, E.

Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*.

Gene, v. 295, n. 2, p. 193–8, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354653>>.

CAPY, P.; LANGIN, T.; ANXOLABEHERE, D.; BAZIN, C. Dynamics and evolution of transposable elements. **Molecular Biology Intelligence Unit**, p. 197, 1998.

CARABALLO, D. A.; BELLUSCIO, P. M.; ROSSI, M. S. The library model for satellite DNA evolution: a case study with the rodents of the genus *Ctenomys* (Octodontidae) from the Iberá marsh, Argentina. **Genetica**, v. 138, n. 11-12, p. 1201–1210, 12 dez. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-010-9516-2>>.

CARROLL, C. W.; STRAIGHT, A. F. Centromere formation: from epigenetics to self-

assembly. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 2, p. 70–78, fev. 2006. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892405003326>>.

CARVALHO, M.C.G.; SILVA, D.C.G. Review: Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, 2010.

CAVALIER-SMITH, T. Selfish DNA and the origin of introns. **Nature**, v. 315, n. 6017, p. 283–284, 23 maio 1985. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/315283b0>>.

CHARLESWORTH, B. The effect of life-history and mode of inheritance on neutral genetic variability. **Genetic Research**, v. 77, n. 2, p. 153–66, 2001.

CHARLESWORTH, B.; LANGLEY, C. H.; STEPHAN, W. The evolution of restricted recombination and evolution of repeated DNA sequences. **Genetics**, v. 112, p. 947–962, 1986.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA in Eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215–220, 15 set. 1994. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v371/n6494/pdf/371215a0.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2015.

CHOO, K. H. A. Centromerization. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 182–188, maio 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892400017396>>.

CSINK, A. K.; HENIKOFF, S. Something from Nothing: The Evolution and Utility of Satellite Repeats. **Trends in Genetics**, v. 14, n. 5, p. 200–204, 5 maio 1998. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0168952598014449/fulltext>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

DA SILVA, E. L. **Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de *leporinus elongatus* em diferentes espécies da família anostomidae (teleostei , characiformes)**. 2012. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

DA SILVA, E. L.; BORBA, R. S. de; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3541136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DA SILVA, E. L.; BUSSO, a F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolus organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and genome research**, v.

- 139, n. 1, p. 22–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037972>>.
- DE JESUS, C. M.; GALETTI, P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25–32, 2003.
- DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 134, n. 2, p. 243–249, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-007-9231-9>>.
- DE OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso; Lucinda, 2003. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, mar. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252006000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. p. 279–330.
- DEININGER, P. L.; MORAN, J. V.; BATZER, M. A.; KAZAZIAN, H. H. Mobile elements and mammalian genome evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 6, p. 651–658, dez. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X03001515>>.
- DELARIVA, R. L.; AGOSTINHO, A. A. Relationship between morphology and diets of six neotropical loricariids. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 3, p. 832–847, mar. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00534.x>>.
- DOOLITTLE, W. F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, v. 284, n. 5757, p. 601–603, 17 abr. 1980. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/284601a0>>.
- DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 111–117, 9 set. 1982. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/299111a0>>.
- DOVER, G. a. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**, v. 2, p. 159–165, 1986.

DURFY, S. J.; WILLARD, H. F. Patterns of intra- and interarray sequence variation in alpha-satellite from the human X chromosome: evidence for short-range homogenization of tandemly repeated DNA sequences. **Genomics**, v. 5, p. 810–821, 1989.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. **Genetics**, v. 175, n. 2, p. 477–485, 1 fev. 2007. Disponível em: <<http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.107.071399>>.

EIDE, D.; ANDERSON, P. Transposition of Tc1 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 6, p. 1756–60, 1985. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ELLINGSEN, A.; SLAMOVITS, C. H.; ROSSI, M. S. Sequence evolution of the major satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia). **Gene**, v. 392, n. 1-2, p. 283–290, maio 2007. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111907000455>>.

ENUKASHVILY, N. I.; PONOMARTSEV, N. V. Mammalian Satellite DNA. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. V. 90. p. 31–65. 2013.

ESCHMEYER, W. **Catalog of Fishes: : GENERA, SPECIES, REFERENCES**. Disponível em: <<http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>>. Acesso em: 1 out. 2015.

FEDURCO, M.; ROMIEU, A.; WILLIAMS, S.; LAWRENCE, I.; TURCATTI, G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*, v. 34, n. 3, p. 1–13, 6 fev. 2006. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gnj023>>.

FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S.; SANTOS, G. M. dos. **Peixes comerciais do médio amazonas: região de santarém**. [s.l.] Brasília : Edições IBAMA, 1998.

FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 411–418, jun. 2008.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432807000364>>.

FESCHOTTE, C. Merlin, a New Superfamily of DNA Transposons Identified in Diverse Animal Genomes and Related to Bacterial IS1016 Insertion Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 9, p. 1769–1780, 21 maio 2004. Disponível em:

<<http://mbe.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/molbev/msh188>>.

- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, n. 1, p. 331–368, 2007. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>>.
- FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297–353, ago. 1981. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1096-3642.1981.tb01575.x>>.
- FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 103–107, jan. 1989. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168952589900395>>.
- FISCH-MULLER, S. subfamily Ancistrinae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. [s.l.] EDIPUCRS, 2003. p. 729.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 810–813, set. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01923555>>.
- GOULDING, M. . **The fishes and the forest: exploration in amazonian natural history**. 1980.
- GREGORY, T. R. Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 9, p. 699–708, set. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrg1674>>.
- GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K.; LEITCH, I. J.; MURRAY, B. G.; KAPRAUN, D. F.; GREILHUBER, J.; BENNETT, M. D. Eukaryotic genome size databases. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database, p. D332–D338, 3 jan. 2007. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkl828>>.
- HALL, S. E. Differential Rates of Local and Global Homogenization in Centromere Satellites From Arabidopsis Relatives. **Genetics**, v. 170, n. 4, p. 1913–1927, 23 maio 2005. Disponível em: <<http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.038208>>.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** **Nucleic Acids Symposium Series**, 1999. . Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>.
- HAN, J. S.; BOEKE, J. D. LINE-1 retrotransposons: Modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? **BioEssays**, v. 27, n. 8, p. 775–784, 2005. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.20257>>.

HASHIMOTO, D. T.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Genetica**, v. 137, n. 2, p. 135–40, 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430915>>.

IVICS, Z.; IZSVAK, Z.; MINTER, A.; HACKETT, P. B. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 5008–5013. 1996. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.10.5008>>.

IZSVÁK, Z.; IVICS, Z.; HACKETT, P. B. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). **Molecular & general genetics : MGG**, v. 247, n. 3, p. 312–322, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7770036>>.

JOHN, B. The biology of heterochromatin. **Heterochromatin**, 1988.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosome Research**, v. 1, n. 3, p. 167–174, set. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00710770>>.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49–63, 2002. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1023/A:1016072014259>>.

KOCH, J. Neocentromeres and alpha satellite: a proposed structural code for functional human centromere DNA. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 2, p. 149–154, 2000.

Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10607825&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/uuid/2744A2AA-4DA5-434B-A4D7-E6B228B98505>>.

KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 474, 2006. Disponível em:

<<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/474>>.

KRASNOV, A.; KOSKINEN, H.; AFANASYEV, S.; MÖLSÄ, H. Transcribed Tc1-like transposons in salmonid fish. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, p. 107, 2005. Disponível em:

<<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/107>>.

LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; HERRÁN, R. dela; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; REJÓN, C. R.; REJÓN, M. R.; FONTANA, F. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species.

Chromosome Research, v. 9, n. 1, p. 47–52, 2001. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1023/A:1026739616749>>.

LARRACUENTE, A. M. The organization and evolution of the Responder satellite in species of the *Drosophila melanogaster* group: dynamic evolution of a target of meiotic drive. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 233, 25 dez. 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4280042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LEWIN, B. The Content of the Genome. In: **Gene XI**. p. 100–119.

LI, Y.-C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453–2465, dez. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>>.

LIU, D.; YOU, C.; LIU, S.; LIU, L.; DUAN, W.; CHEN, S.; YAN, J.; LIU, Y.

Characterization of a Novel Tc1-Like Transposon From Bream (*Cyprinidae*, *Megalobrama*) and Its Genetic Variation in the Polyploidy Progeny of Bream–Red Crucian Carp Crosses.

Journal of Molecular Evolution, v. 69, n. 4, p. 395–403, 2009. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s00239-009-9295-5>>.

LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 2, p. 317–324, 2001. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01959789>>.

LOHE, A.; HILLIKER, A. J. Return of the H-word (heterochromatin). **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 5, n. 6, p. 746–755, dez. 1995. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0959437X9580007R>>.

LOHE, A. R.; HILLIKER, A. J.; ROBERTS, P. A. Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 134, n. 4, p. 1149–1174, 1993.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes**

tropicais.v.3,p543. 1999.

LYON, M. F. LINE-1 elements and X chromosome inactivation: A function for “junk” DNA?

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 12, p. 6248–6249, 2000.

Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.12.6248>>.

MANTOVANI, M.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. *Astyanax scabripinnis*.

System, v. 542, n. 4A, p. 536–542, 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134341>>.

MARIOTTO, S. **Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo ancistrini (siluriformes, loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras**. 2008.

Universidade Federal de São Carlos, 2008.

MARIOTTO, S.; ARTONI, R. F.; MIYAZAWA, C. S. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River

Basin, Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 57, n. 4, p. 327–331, 2004. Disponível em:

<http://www1.unifi.it/caryologia/past_volumes/57_4/57-4_1249.pdf>.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.;

MOREIRA FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999

(Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 595–600,

2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252009000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

62252009000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O. Diversificação de sítios do DNA ribossômico 5S e 18S em populações de sete espécies do gênero *Ancistrus*

(Loricariidae, Ancistrini) das três bacias hidrográficas do Mato Grosso, Brasil. **Journal of**

Chemical Information and Modeling, v. 53, p. 1689–1699, 2013.

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C. S. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a

complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of

sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil.

Caryologia, v. 59, n. 4, p. 299–304, 2006. Disponível em: <<Go to

ISI>://000244626300001>.

MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic mapping

of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly

repetitive DNA sequence. **Journal of Fish Biology**, v. 80, n. 3, p. 630–637, 2012. Disponível

em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2011.03199.x>>.

- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): Fish Cytogenetics.** Science, 2007. p. 421–453.
- MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; MESTRINER, C. A.; GALETTI, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, n. 1, p. 1–9, 7 jul. 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1046/j.1365-2540.2000.00702.x>.
- MIKLOS, G. L. G. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. In: **Molecular evolutionary genetics**, p. 241–321, 1985.
- MISKEY, C.; IZSVÁK, Z.; KAWAKAMI, K.; IVICS, Z. DNA transposons in vertebrate functional genomics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 629–641. 2005. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4232-7>.
- MORRONE, J. J. Biogeografía de América Latina y el Caribe. **M&T - Manuales & Tesis SEA**, v. 3, p. 148, 2001.
- NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, n. 1, p. 121–152. 2005. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1464479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3th. ed. 600p. John Wiley and Sons, 1994.
- OHTA, T.; DOVER, G. A. The cohesive population genetics of molecular drive. **Genetics**, v. 108, n. 2, p. 501–521, 1984.
- OLIVEIRA, R. R. de; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B. dos; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 301–306, set. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252007000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- OLIVEIRA, S. G.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. **Molecular cytogenetics**, v. 6, n. 1, p. 54, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3906913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PARDUE, M.-L.; DEBARYSHE, P. G. Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 37, n. 1, p. 485–511, 2003. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.38.072902.093115>>.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*.

Cytogenetic and Genome Research, v. 116, n. 3, p. 218–223, 2007. Disponível em:

<<http://www.karger.com/doi/10.1159/000098190>>.

PAXTON, J. R.; ESCHMEYER, W. N. **Encyclopedia of fishes (natural world)**. [s.l.]

Academic Press; Second Printing edition (February 14, 1995), 1995.

PEASTON, A. E.; EVSIKOV, A. V; GRABER, J. H.; DE VRIES, W. N.; HOLBROOK, A. E.; SOLTER, D.; KNOWLES, B. B. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Developmental cell**, v. 7, n. 4, p. 597–606, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580704003259>>.

PETREIRE JR., M. Pesca e esforço de pesca no Estado do Amazonas. II. Locais, aparelhos de captura e estatística de desembarque. **Acta Amazonic**, v. (supl. 2), p. 1–54, 1978.

PHILLIPS, R. B. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to fish genetics and genome mapping. **Marine Biotechnology**, v. 3, p. S145–S152, 2001.

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

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIĆ, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1-2, p. 72–82, fev. 2008. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111907005859>>.

PLOHL, M.; MESTROVIC, N.; MRAVINAC, B. **Satellite DNA Evolution**. In: Garrido-Ramos MA (ed): Repetitive DNA. Genome Dyn. Basel, p. 126–152. 2012.

- POCWIERZ-KOTUS, A.; BURZYNSKI, A.; WENNE, R. Family of Tc1-like elements from fish genomes and horizontal transfer. **Gene**, v. 390, n. 1-2, p. 243–251, abr. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111906007013>>.
- POLETO, A. B.; FERREIRA, I. a; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/1>>.
- RADICE, a D.; BUGAJ, B.; FITCH, D. H.; EMMONS, S. W. Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 244, n. 6, p. 606–12, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969029>>.
- RAPP PY-DANIEL, L. Tracking evolutionary trends in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **International Congress on the Biology of Fish**, p. 55–70, 2000.
- ROIZES, G. Human centromeric alphoid domains are periodically homogenized so that they vary substantially between homologues. Mechanism and implications for centromere functioning. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 6, p. 1912–1924, 23 mar. 2006. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkl137>>.
- ROSIC, S.; KOHLER, F.; ERHARDT, S. Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. **The Journal of Cell Biology**, v. 207, n. 3, p. 335–349, 10 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201404097>>.
- RUDD, M. K.; WRAY, G. a; WILLARD, H. F. The evolutionary dynamics of alpha -satellite. **Genome Research**, v. 16, p. 88–96, 2006.
- SABAJ, M. H.; ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. Spawning In *Ancistrus* (Siluriformes: Locaridae) With Comments On The Evolution Of The Snout Tentacles As A Novel Reproductive Strategy: Larval Mimicry. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 10, p. 217–229, 1999.
- SAITO, Y.; EDPALINA, R. R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, n. 2, p. 157–166, 5 set. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10709-006-9126-1>>.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, M. G. **Molecular cloning: a laboratory manual**. third edn ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHINDELHAUER, D. Evidence for a Fast, Intrachromosomal Conversion Mechanism

From Mapping of Nucleotide Variants Within a Homogeneous alpha -Satellite DNA Array.

Genome Research, v. 12, n. 12, p. 1815–1826. 2002. Disponível em:

<<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.451502>>.

SHAPIRO, J. A; VON STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 80, n. 2, p. 227–250, 2005.

SHAPIRO, J. A. Mobile DNA and evolution in the 21st century. **Mobile DNA**, v. 1, n. 1, p. 4, 2010. Disponível em: <<http://www.mobilednajournal.com/content/1/1/4>>.

SOUZA, A. C. . **Descrição cariotípica de peixes dos gêneros baryancistrus, parancistrus, peckoltia e ancistrus (ancistrinae, loricariidae) da bacia amazônica**. 2003. Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi, 2003.

STEIN, J.; PHILLIPS, R. B.; DEVLIN, R. H. Identification of the Y chromosome in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 92, n. 1-2, p. 108–110, 2001. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000056878>>.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 134–143, 2005. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000084945>>.

SYVANEN, M. The evolutionary implications of mobile genetic elements. **Ann. Rev. Genetics**, v. 18, p. 271–293, 1984. Disponível em: <papers2://publication/uuid/2CC08E63-0810-47ED-BF7E-B0C8717800DC>.

SZYBALSKI, W. Use of cesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation. In: Methods in Enzymology. **Nucleic Acids**, Part B v. 12. p. 330–360. 1968.

TAFALLA, C.; ESTEPA, A.; COLL, J. M. Fish transposons and their potential use in aquaculture. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 397–412. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165605007947>>.

THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860–921, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994. Disponível em:

<<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/22.22.4673>>.

TOTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p. 967–981. 2000. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.10.7.967>>.

TURCATTI, G. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic acids research**, v.36, e25, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2275100/?tool=pubmed>>.

UGARKOVIC, D. Functional elements residing within satellite DNAs. **EMBO reports**, v. 6, n. 11, p. 1035–1039. 2005. Disponível em: <<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.embor.7400558>>.

UGARKOVIĆ, Đ. Long non-coding rnas. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**. v. 51. 2011.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles--causes and effects. **The EMBO journal**, v. 21, n. 22, p. 5955–5959, 2002.

VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I. A.; POLETO, A. B.; FANTINATTI, B. E. A.; MARTINS, C. Cytogenetic Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New Insights on the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 133, n. 1, p. 34–42, 2011. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000322888>>.

VITTORAZZI, S.; LOURENÇO, L.; RECCO-PIMENTEL, S. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC genetics**, v. 15, n. 1, p. 111, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4201667&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VOLFF, J.-N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. **BioEssays**, v. 28, n. 9, p. 913–922, set. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.20452>>.

WARING, M.; BRITTEN, R. J. Nucleotide Sequence Repetition: A Rapidly Reassociating Fraction of Mouse DNA. **Science**, v. 154, n. 3750, p. 791–794. 1966. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.154.3750.791>>.

WICHMAN, H. A. Genomic Distribution of Heterochromatic Sequences in Equids: Implications to Rapid Chromosomal Evolution. **JOURNAL OF HEREDITY**, v. 82, p. 369–

377, 1991.

WILLARD, H. F. Centromeres: the missing link in the development of human artificial chromosomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, n. 2, p. 219–225. 1998.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X98801445>>.

WILLARD, H. F.; WAYE, J. S. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. **Trends in Genetics**, v. 3, p. 192–198. 1987. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168952587902320>>.

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

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952504002835>>.

YUNIS, J. J.; YASMINEH, W. G. Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function.

Science, v. 174, n. 4015, p. 1200–1209, 17 dez. 1971. Disponível em:

<<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.174.4015.1200>>.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.;

SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, n. 1, p.

23–35, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1022053931308>>.

Anexos

Figura 1: Banda C de fêmea e macho do Rio Flecha, evidenciando par de cromossomos sexual XX/XY.

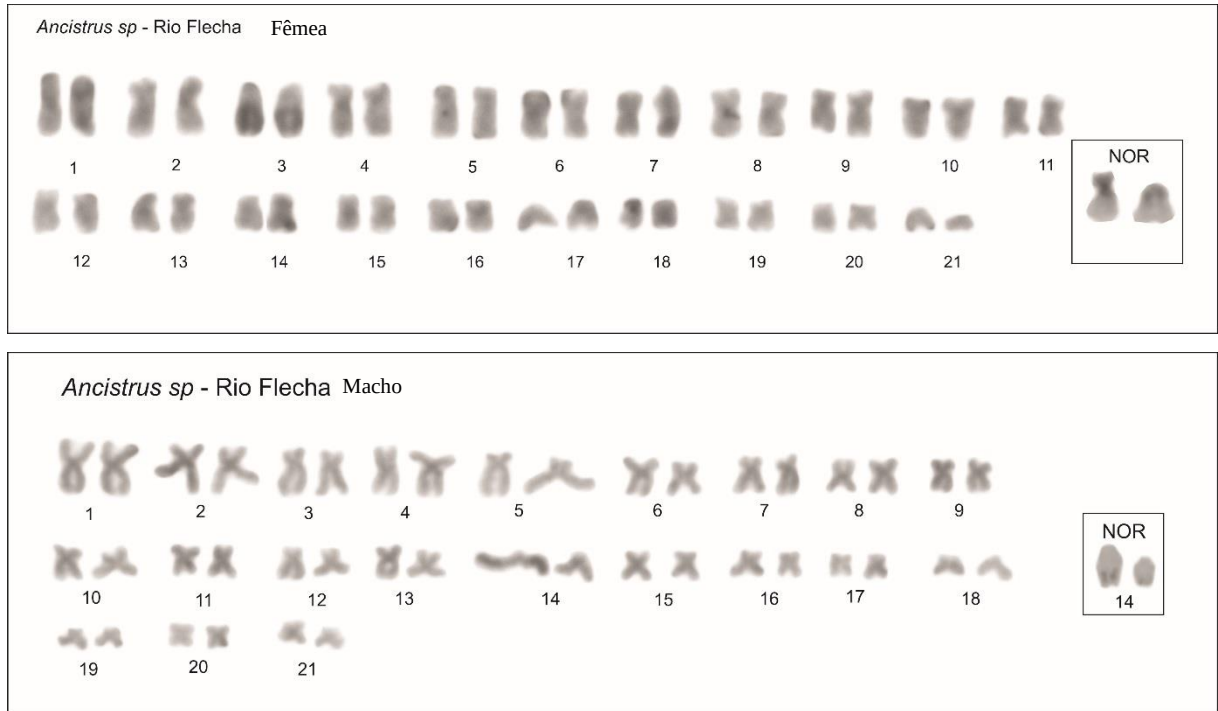


Figura 2: Banda C de fêmea e macho do Córrego Currupira.

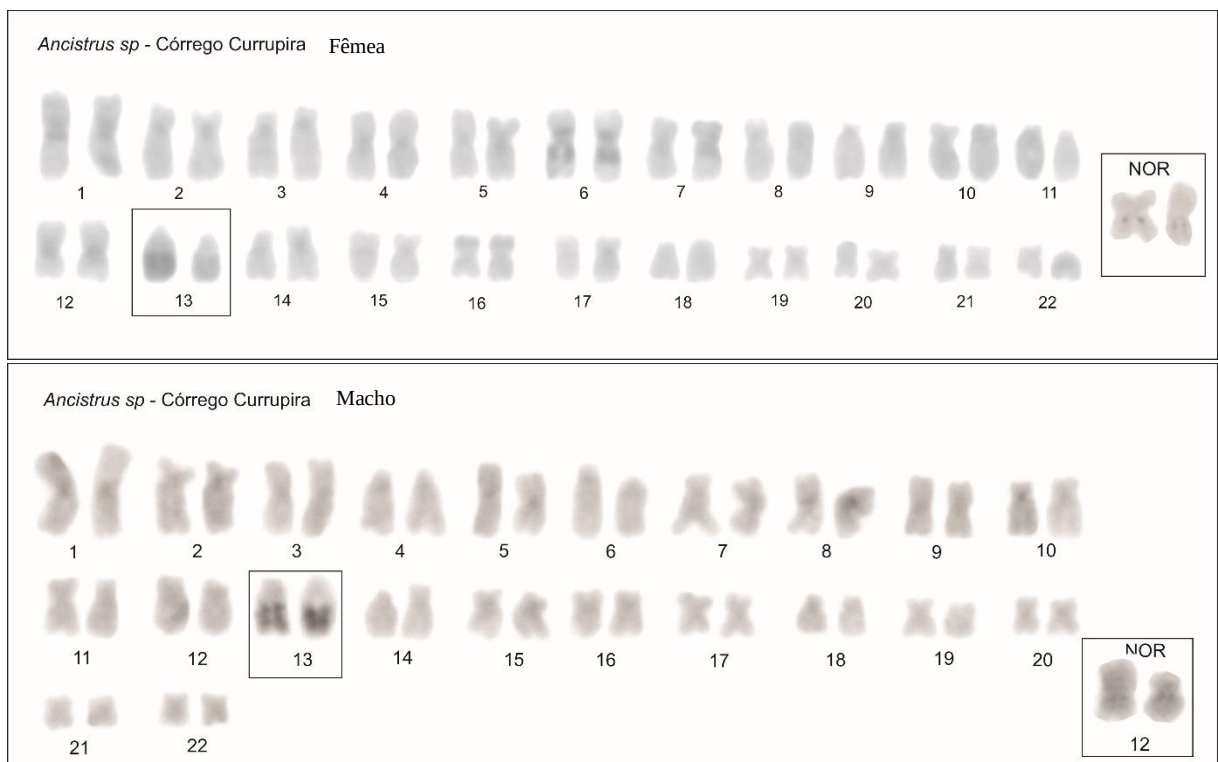
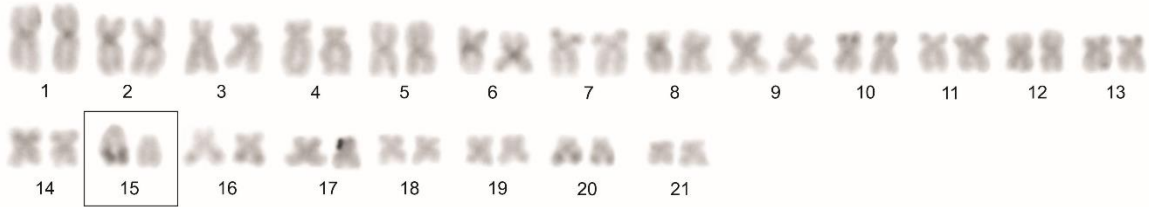


Figura 3: Banda C de macho e fêmea do Córrego Pari, evidenciando par de cromossomos sexual XX/XY.

Ancistrus sp. pari (2n=42 - macho)



Ancistrus sp. pari (2n=42 - fêmea)

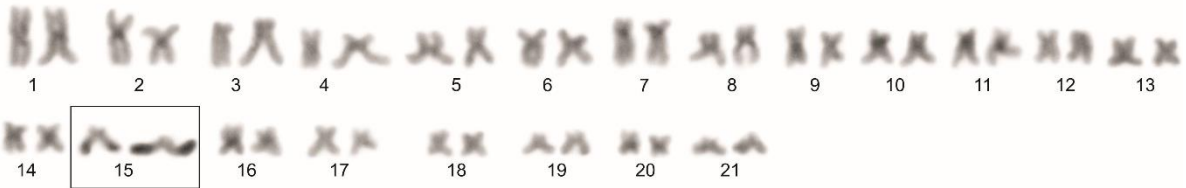
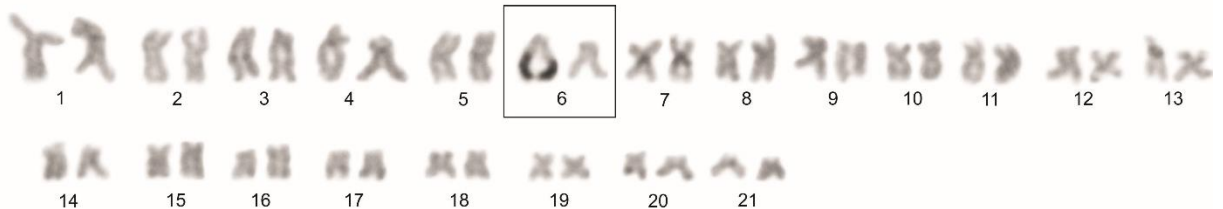


Figura 4: Banda C de macho e fêmea do Córrego Sangradouro, evidenciando par de cromossomos sexual XX/XY.

Ancistrus sp. sangradouro (2n=42 - macho)



Ancistrus sp. sangradouro (2n=42 - fêmea)

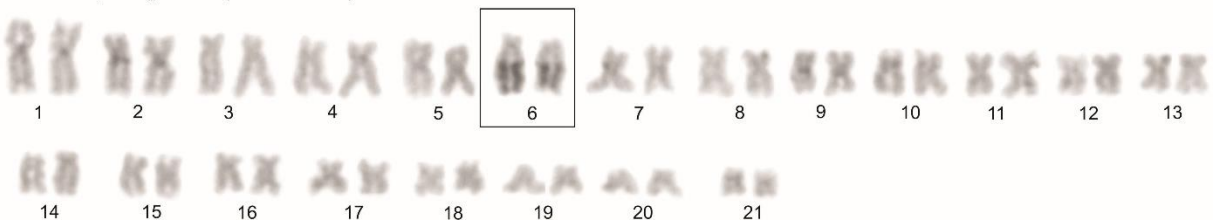
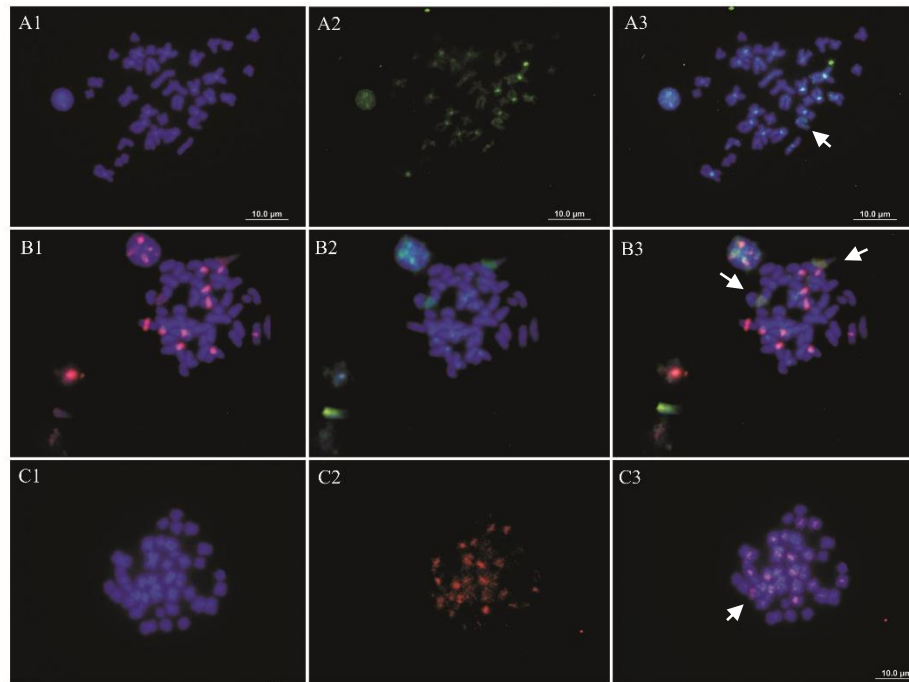


Figura 5: Hibridação *in situ* utilizando SatAn2 como sonda nos cromossomos de *Ancistrus*. A – Currupira fêmea; B – Sangradouro fêmea; C – Sangradouro macho. Notar a presença de um grande sinal no braço longo dos cromossomos sexuais (setas em A3, B3 e C3). Essas marcações não estavam presentes em todas as vezes em que a técnica foi realizada.



Aluna: Keteryne Rodrigues da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempi