



Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Faculdade de Ciências e Letras de Assis

Análise da variabilidade cariotípica em *Corydoras aeneus*

(Siluriformes, Teleostei)

Dissertação

Weidy Rozendo Clemente Aguiar

Bauru, 2023

Weidy Rozendo Clemente Aguiar

Análise da variabilidade cariotípica em *Corydoras aeneus* (Siluriformes, Teleostei)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área do conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Dr. Ricardo Utsunomia

Co-Orientador: Dr. Fabio Porto-Foresti

Bolsista: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES), Código de financiamento 001

Bauru, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

A282a Aguiar, Weidy Rozendo Clemente
Análise da variabilidade cariotípica em *Corydoras aeneus*
(Siluriformes, Teleostei) / Weidy Rozendo
Clemente Aguiar. — Assis, 2023
35 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. Ricardo Utsunomia

1. Citogenética - Peixes. 2. Cromossomos.
3. Cariótipo. 4. Siluriformes (Bagre Peixe). 5. *Corydoras aeneus*
(Peixe). I. Título.

CDD 572.8

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE WEIDY ROZENDO CLEMENTE, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 24 dias do mês de março do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de WEIDY ROZENDO CLEMENTE, intitulada **Análise da variabilidade cariotípica em *Corydoras aeneus* (Siluriformes, Teleostei)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RICARDO UTSUNOMIA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Prof. Dr. DUILIO MAZZONI ZERBINATO DE ANDRADE SILVA (Participação Virtual) do(a) National Institute of Health, Profa. Dra. SILVANA DE MELO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Morfologia / UNESP/Botucatu. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RICARDO UTSUNOMIA



Documento assinado digitalmente
RICARDO UTSUNOMIA
Data: 28/03/2023 17:09:53 -0300
Verifique em <https://validar.ig.gov.br>

Agradecimentos

Agradeço à Deus, por ter me possibilitado chegar até aqui, me dando força, sabedoria e mais uma vez permitindo que meus sonhos se realizassem.

Agradeço à CAPES, pelo auxílio financeiro.

Agradeço à UNESP e ao PPG Biociências, por todo acolhimento.

Ao LAGEMPE, que de portas abertas me recepcionou tão bem, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram nessa trajetória.

Ao Prof. Fábio Porto-Foresti, pela oportunidade de fazer parte da equipe LAGEMPE.

Ao meu orientador Ricardo Utsunomia, por todo apoio, atenção e oportunidade de fazer parte da equipe LAGEMPE.

Agradeço a Natália e Caio por generosamente terem compartilhado de seus conhecimentos e experiência em citogenética.

Agradeço em especial aos meus pais (Valdenice e Stênio), pelo apoio incondicional, por sempre terem me incentivado e acompanhado tão de perto, por sempre terem acreditado em mim, dando não só suporte financeiro e emocional, mas também por tantas vezes ficarem horas me ouvindo falar do projeto de pesquisa com toda atenção e carinho. Vocês são incríveis, minha força e inspiração diária. Amo vocês!

Ao Gabriel, meu esposo, por todo apoio. Te amo, gigante!

RESUMO

O gênero *Corydoras* representa um importante e grande grupo, sendo o maior da ordem siluriforme, e da família Callichthyidae, contabilizando cerca de 166 espécies. Uma das características marcantes do grupo seria a presença de uma cobertura corporal com duas fileiras de placas ósseas, corpo alto, dorsalmente cinza-escuro e ventralmente amarelado; com nadadeiras escuras, barbilhões maxilares curtos e seu tamanho modesto, alcançando o máximo de 52 mm. Comumente ocupa riachos, lagoas e canais, alimentando-se de larvas de insetos e algas, com hábitos noturnos e bentônicos. O táxon também dispõe de ser um dos grupos mais significativos para o comércio, representando um dos mais exportados na aquicultura ornamental. Estudos pioneiros se voltavam para análises de características morfológicas, entretanto com as limitações apresentadas por essas análises, novas técnicas foram desenvolvidas, como avaliações citogenéticas, de genética molecular, até as mais recentes em bioinformática. A citogenética analisa estrutura, função, classificação, tamanho, quantidade e posição de centrômeros e NORS em cromossomos. Os primeiros estudos relacionados a avaliação cariotípica de peixes da região neotropical surgem na década de 70, com essas possibilidades, foi possível observar que o gênero *Corydoras* apresenta grande variação em seus cariótipos, diferenças na fórmula cariotípica e presença frequente de cromossomos supranumerários ou cromossomos B. Neste grupo, *Corydoras aeneus* apresenta alta instabilidade mitótica e presença de cromossomos supranumerários, justificado pela alta variabilidade em cariótipos analisados. Entretanto, estudos citogenéticos em *C. aeneus* são considerados escassos. Assim, o presente estudo buscou realizar uma análise citogenética atual, juntamente com auxílio de ferramentas de bioinformática, com um total de 26 amostras de duas populações de *C. aeneus*, coletadas em dois pontos, o rio Batalha, afluente da bacia do rio Tietê, e rio Alambari, afluente da bacia do rio Paranapanema. Além de analisadas citogeneticamente, foi caracterizado o satelitoma da espécie, realizada bandagem C e FISH com sondas de DNAr 5s e 18s.

Palavras-chave: Cariótipo, Siluriformes, *Corydoras aeneus*

ABSTRACT

The genus *Corydoras* represents an important and large group, being the largest of the Siluriform order, and of the Callichthyidae family, accounting for about 166 species. One of the striking characteristics of the group would be the presence of a body covering with two rows of bony plates, a tall body, dark gray dorsally and yellowish ventrally; with dark fins, short maxillary barbels and its modest size, reaching a maximum of 52 mm. It commonly occupies streams, lakes and canals, feeding on insect larvae and algae, with nocturnal and benthic habits. The taxon also has to be one of the most significant groups for trade, representing one of the most exported in ornamental aquaculture. Pioneer studies focused on analyzes of morphological characteristics, however with the limitations presented by these analyses, new techniques were developed, such as cytogenetic evaluations, molecular genetics, even the most recent ones in bioinformatics. Cytogenetics analyzes structure, function, classification, size, quantity and position of centromeres and NORs in chromosomes. The first studies related to the karyotypic evaluation of fish from the Neotropical region appeared in the 1970s, with these possibilities, it was possible to observe that the genus *Corydoras* presents great variation in its karyotypes, differences in the karyotypic formula and frequent presence of supernumerary chromosomes or B chromosomes. With regard to the genus *Corydoras*, *C. aeneus* has already been reported as a group with high mitotic instability and the presence of supernumerary chromosomes, justified by the high variability in analyzed karyotypes, however, cytogenetic studies on *C. aeneus* are considered scarce. Thus, the present study sought to carry out a current cytogenetic analysis, together with the aid of bioinformatics tools, with a total of 26 samples from two populations of *C. aeneus*, collected at two points, the Batalha river, a tributary of the Tietê river basin, and Alambari river, tributary of the Paranapanema river basin. In addition to being cytogenetically analyzed, the species' satelliteitome was characterized, C and FISH banding were performed with 5s and 18s rDNA probes.

Keywords: karyotypes, Siluriformes, *Corydoras aeneus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1- CONSIDERAÇÕES SOBRE A ORDEM SILURIFORMES E A FAMÍLIA CALLICHTHYIDAE.....	9
1.2- CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>CORYDORAS</i> E A VARIAÇÃO CARIOTÍPICA RELATADA.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1- OBJETIVOS GERAIS.....	13
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1- MATERIAL	14
3.1.1- LOCAIS DE COLETA	14
3.2- MÉTODOS.....	15
3.2.1- ESTIMULAÇÃO DE MITOSES.....	16
3.2.2- OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS	16
3.2.3- COLORAÇÃO CONVENCIONAL	17
3.3- BANDAMENTO C	17
3.4- ANÁLISE E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS.....	17
3.5- EXTRAÇÃO DE DNA	18
3.6- SONDAS DE DNAR 5S	18
3.7- HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	18
3.8- SEQUÊNCIAMENTO MASSIVO DE DNA	20
3.9- ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS	20
3.9.1- CARACTERIZAÇÃO DE SATELITOMA DE <i>C. AENEUS</i>	20
4. RESULTADOS	21
4.1- ANÁLISES CITOGENÉTICAS	21
4.2- ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
7. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre a ordem Siluriformes e família Callichthyidae

A ictiofauna representa um grupo amplo e diverso dentro dos vertebrados, apresentando cerca de 5.230 gêneros, 36.385 espécies, das quais 18.427 espécies são habitantes de regiões de água doce (Nelson 2006). Em especial, as áreas totais de ambiente dulcícolas da região Neotropical apresentam uma larga biodiversidade (Frickle et al 2022), apesar de ser considerada pouco conhecida, devido à falta de dados sistemáticos à nível de espécie para vários grupos, informações inadequadas e dificuldade de associar hipóteses filogenéticas e geológicas.

Em relação a ampla diversidade da ictiofauna em ambientes de água doce, a superordem Otophysa é um grupo dominante nesses ambientes, constituindo cerca de 72% das espécies da ictiofauna Neotropical, estando representada na América do Sul e Central por três grupos principais: Characiformes (lambaris, dourados, curimatás, etc.); Siluriformes (peixes de couros, cascudos, bagres, surubim); Gymnotiformes (tuviras, sarapós, etc.); (Bizerril e Primo, 2001; Malabarba 2020) (Figura 1).

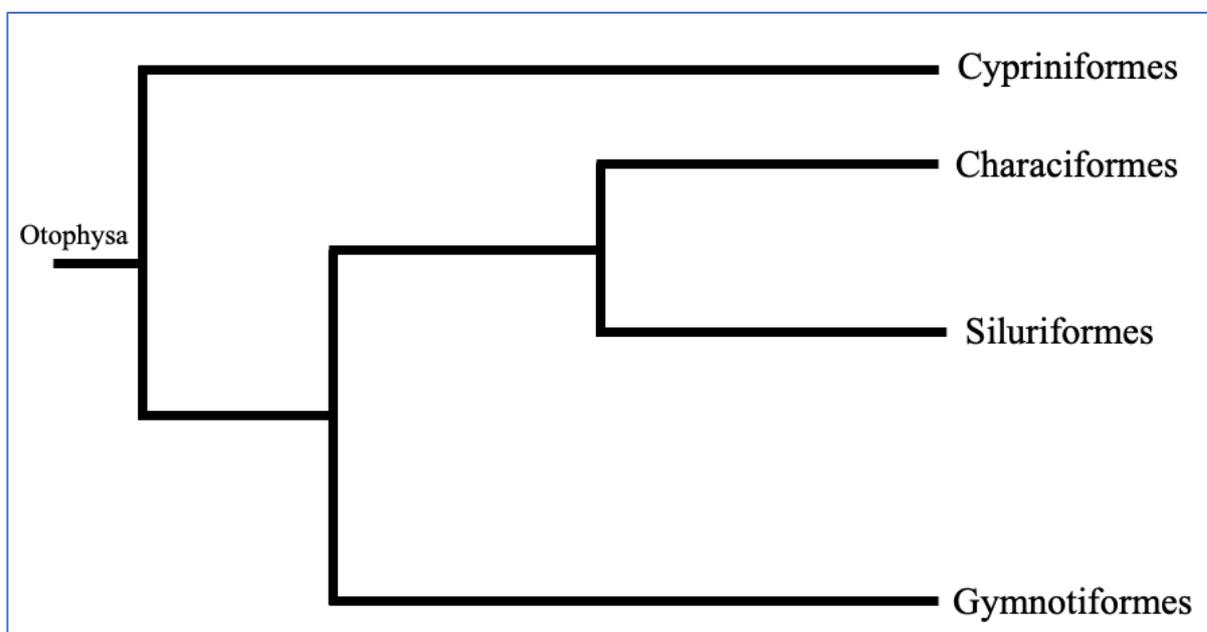


FIGURA 1. Filogenia dos Otophysa. (adaptado de Melo et al. 2022).

A ordem dos Siluriformes é considerada o maior grupo de peixes encontrado na região Neotropical e engloba os peixes popularmente conhecidos como bagres e cascudos,

representando um grupo bem diversificado, que inclui peixes de pequeno a grande porte (Ferraris, 2007), sendo a maioria de água doce. Os Siluriformes apresentam, em sua maioria, o corpo cilíndrico com um ventral achatado, o que auxilia na alimentação bentônica, apresentam quatro pares de barbilhões na cabeça, um nasal, um maxilar e dois no queixo (Bruton, 1996; Jin et al. 2016, Nelson 2006). Outra característica que destaca esse grupo é ter o corpo revestido por uma couraça óssea, composta por séries longitudinais de placas dérmicas (Reis 1998). Atualmente, a ordem está organizada em 40 famílias, 502 gêneros e 4.150 espécies (Fricke et al. 2022).

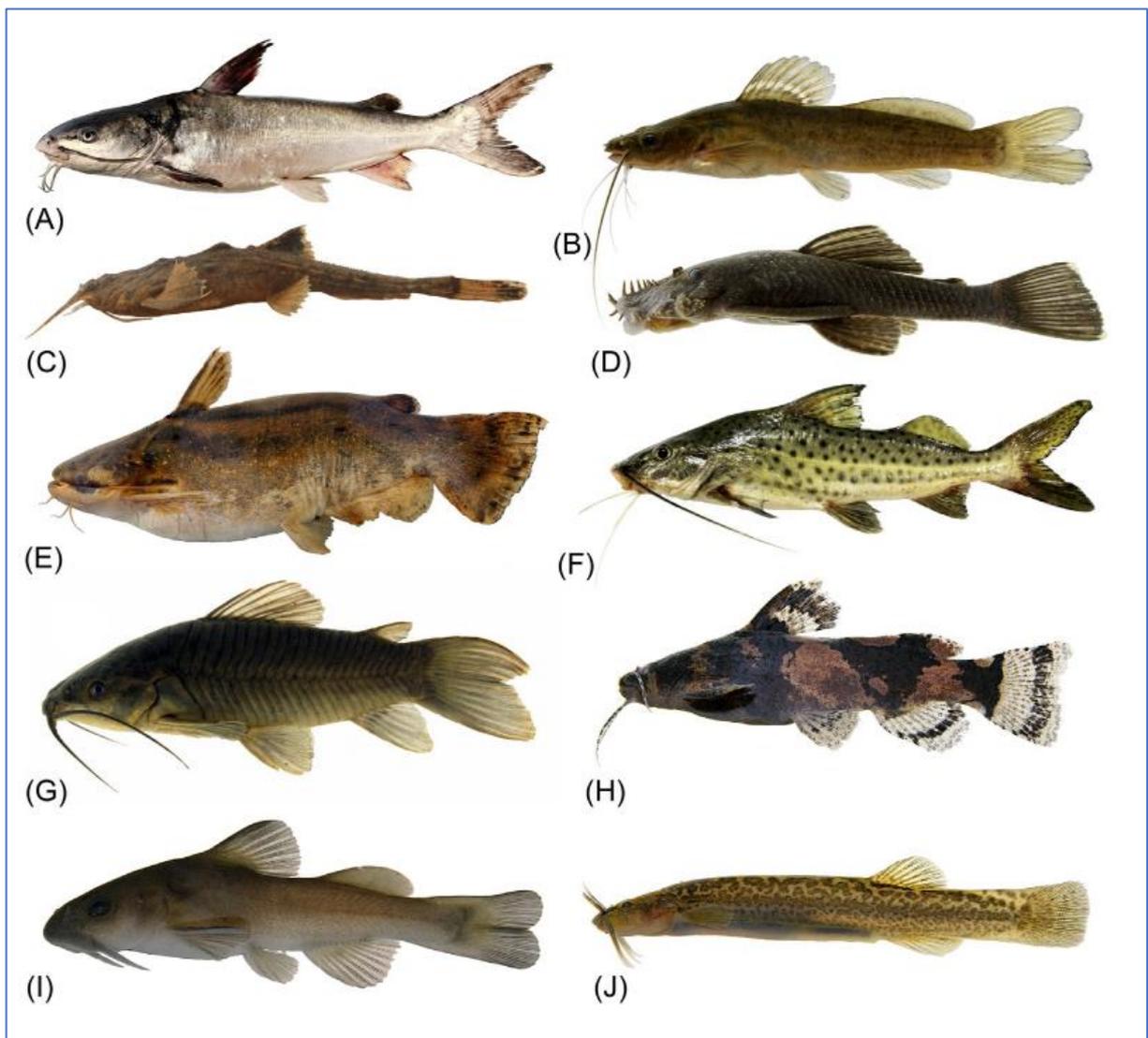


FIGURA 2. Principais grupos representantes da ordem Siluriformes: (A) Ariidae, (B) Heptapteridae, (C) Aspredinidae, (D) Loricariidae, (E) Auchenipteridae, (F) Pimelodidae, (G) Callichthyidae, (H) Pseudopimelodidae, (I) Diplomystidae, e (J) Trichomycteridae. (Malabarba 2020).

Nessa ordem, as famílias mais abundantes são Loricariidae, Trichomycteridae e Callichthyidae (Ferraris 2007). Esta última, representa umas das mais significativas em número de espécies, sendo constituída por 8 gêneros e cerca de 222 espécies (Fricke et al. 2022). Estes peixes se destacam pela presença de um tipo de cobertura óssea, dividida em duas fileiras de placas dérmicas sobrepostas, que servem de proteção ao corpo, bexiga natatória envolta em osso, boca pequena e ventral, um ou dois pares de barbilhões curtos, barbatanas dorsal e peitoral com espinho forte (Nelson 2016).

A hipótese de que Callichthyidae poderia ser subdividida em duas subfamílias foi proposta a partir de análises morfológicas (Hoedeman 1952), sendo a família Callichthyidae e as subfamílias Callichthyinae e Corydoradinae, grupos considerados monofiléticos (Shimabukuro-Dias et al. 2004). Assim, a subfamília Callichthyinae é composta pelos gêneros *Dianema*, *Lepthoplosternum*, *Megalechis*, *Hoplosternum* e *Callichthys*, enquanto a subfamília Corydoradinae inclui os gêneros *Corydoras*, *Aspidoras* e *Brochis* (Shimabukuro-Dias et al. 2004).

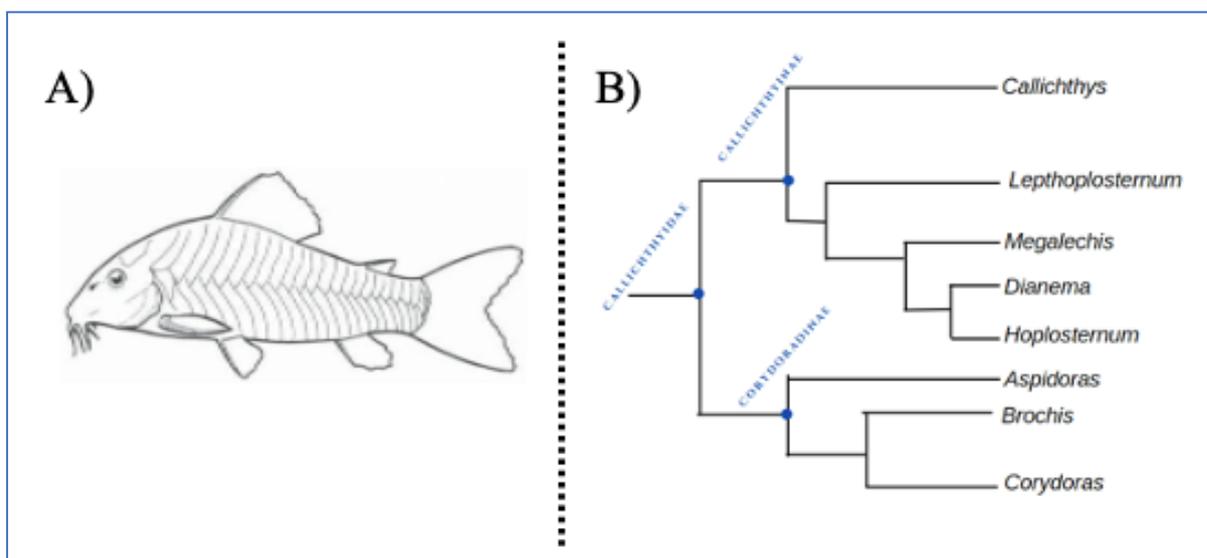


FIGURA 3. Em (A), modelo de peixe da família Callichthyidae. (Nelson, 2016). Em (B), filogenia da família Callichthyidae, adaptada de Shimabukuro-Dias et al. (2004)

1.2. Considerações sobre o gênero *Corydoras* e a variação cariotípica relatada

Descrito pela primeira vez por Lacepede em 1803, o primeiro nome dado ao holótipo do grupo *Corydoras*, foi *Corydoras geoffroy* (posteriormente alterado para *Corydoras geoffroyi*). O epíteto genérico foi concedido em consideração à couraça e capacete, *Cory*=

capacete e *Doras*= pele, características marcantes dos indivíduos deste grupo. Já o epíteto específico foi uma homenagem ao naturalista francês Étienne Geoffroy Saint-Hilaire. Características gerais deste gênero incluem tamanho pequeno e cobertura corporal com duas fileiras de placas ósseas (Reis 1998), além de disporem de corpo alto, de cor dorsalmente cinza-escuro e ventralmente amarelado; com nadadeiras escuras e barbilhões maxilares curtos (Graça e Pavanelli 2007).

Este gênero é o mais abundante dentro da família Callichthyidae, bem como da ordem dos Siluriformes (Ferraris 2007, Brito 2003, Tencatt et al 2019, Tencatt et al 2021), englobando aproximadamente 180 espécies (Fricke et al. 2022). Em geral, estas espécies podem ser encontradas em riachos, lagoas e canais, alimentando-se de larvas de insetos e algas (Graça e Pavanelli 2007).

Do ponto de vista citogenético, a despeito de sua elevada riqueza e ampla distribuição, poucas espécies do gênero *Corydoras* foram analisadas até o momento, revelando uma ampla variabilidade cariotípica, com números diploides que variam desde $2n=40$, em *C. nattereri* (Oliveira et al. 1990), até $2n=102$, em *C. aff. punctatus* (Oliveira et al. 1993). Estas variações estão relacionadas a extensivos eventos de fusão e fissão cromossômica ocorridos ao longo da história evolutiva deste grupo (Oliveira et al. 1993).

Um caso particularmente interessante é o da espécie *Corydoras aeneus*. Primariamente, esta espécie foi relatada exibindo um cariótipo com $2n= 132$, em amostras de origem desconhecida (Scheel 1972). Esse resultado foi posteriormente confrontado com os resultados de um estudo realizado por Oliveira et al. (1988), no qual foram analisadas amostras de quatro populações distintas, de afluentes da bacia do Rio Tietê. Estas análises revelaram a ocorrência de 7 cariótipos distintos entre os indivíduos, sendo que o cariótipo base da espécie foi estabelecido como $2n= 60$, mais a ocorrência de 0 a 3 cromossomos supranumerários mitoticamente instáveis (Oliveira et al. 1988). Além disso, um caso de rearranjo Robertsoniano envolvendo o par N° 1, foi observado em amostras de duas das quatro populações.

Diante do exposto, consideramos que a caracterização cariotípica de duas novas populações de *C. aeneus* é importante para verificar a extensão destes cromossomos em populações de bacias hidrográficas distintas. Desta forma, análises citogenéticas foram realizadas em amostras de *C. aeneus* coletadas no rio Batalha (bacia do rio Tietê) e no rio Alambari (bacia do rio Paranapanema).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O presente projeto teve como objetivo a caracterização e comparação citogenética de duas populações de *C. aeneus* de bacias hidrográficas distintas (Paranapanema e Tietê), a fim de verificar a presença de cromossomos supranumerários e possíveis distinções cariotípicas entre as bacias e os dados registrados na literatura, relacionando-as com o conjunto de DNAs satélites dessas duas populações.

2.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar o cariótipo de exemplares de *C. aeneus* coletados no rio Batalha (Bacia do rio Tietê);
- Caracterizar o cariótipo de exemplares de *C. aeneus* coletados no rio Alambari (Bacia do rio Paranapanema);
- Caracterizar o satelitoma da espécie e verificar se alguns satDNAs se acumularam diferencialmente em alguma das populações.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Locais de coletas

No presente trabalho, nós analisamos 26 exemplares de peixes da espécie *C. aeneus* coletados em diferentes localidades (Figura 5). As amostras são provenientes de 2 populações distintas e correspondem ao rio Batalha que é afluente da bacia do rio Tietê, localizado próximo à cidade de Bauru, e ao rio Alambari que é afluente da bacia do rio Paranapanema, situado próximo à cidade de Brasília Paulista (Figura 5).



FIGURA 4. Exemplar de *Corydoras aeneus*.

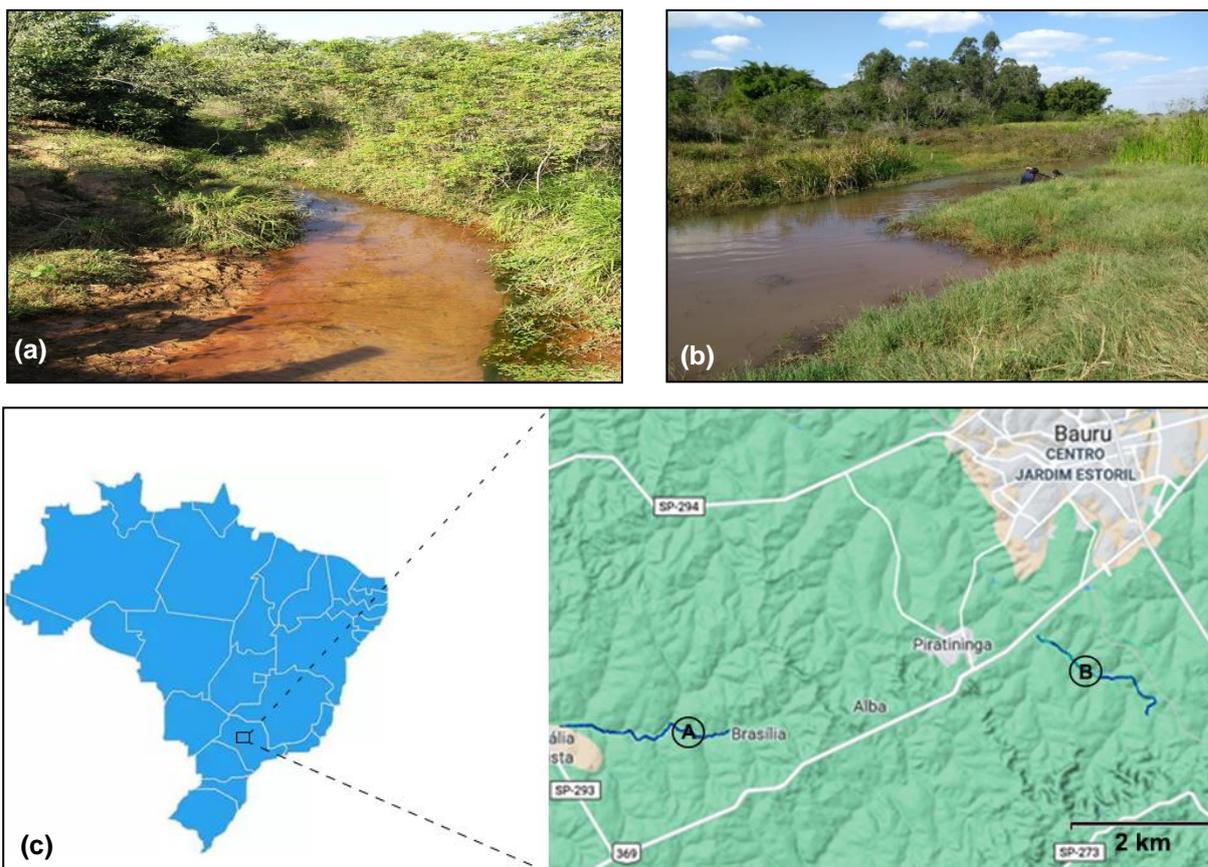


FIGURA 5. Imagem do local de coleta no rio Alambari (a) e no rio Batalha (b). Em (c), mapa evidenciando a localização de ambos os pontos de coleta.

Os exemplares foram coletados com o auxílio de peneiras e puçás e acondicionados imediatamente em tambores com aeração até o transporte ao Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes. Após a chegada ao Laboratório, os indivíduos foram acondicionados em aquários bem aerados, onde foram mantidos até o início dos experimentos.

3.2. Métodos

Para as análises citogenéticas, os animais foram submetidos ao método de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.* 1988a), para as preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.* 1981). Após as análises, os indivíduos foram armazenados na coleção de peixes do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes, na Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Bauru, SP. Após o processamento dos indivíduos, fragmentos de tecido muscular foram fixados em etanol 100% para os estudos moleculares.

3.2.1. Estimulação de mitoses

Para estimulação de mitoses, foi realizado um protocolo de estímulo de divisão celular, o qual para essa etapa, deve-se inocular uma solução de fermento biológico na musculatura dorsal do peixe (Oliveira *et al.* 1988.a). O protocolo aplicado apresenta os seguintes procedimentos:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7mL de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37° C) por cerca de 30 min;
- 3) injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1mL para cada 100 g de peso do animal. A dose administrada pode ser realizada em duas doses, dividida e aplicada em um período de 48hs;
- 4) manter o animal em aquário bem aerado.

3.2.2. Obtenção de cromossomos metafásicos

A técnica aplicada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1981), com adaptações. A técnica é baseada na inibição da polimerização dos microtúbulos mediante a atuação da colchicina, posteriormente com hipotonização de células em suspensão, seguido da fixação celular por intermédio de fixador Carnoy (metanol e ácido acético em proporção 3:1). O protocolo aplicado apresenta os seguintes procedimentos:

- 1) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1mL para cada 100g de peso do animal;
- 2) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período aproximado de 50 min;
- 3) sacrificar o animal, e retirar o rim anterior, posterior e por algumas ocasiões parte das brânquias. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7mL de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5) transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;

- 6) retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 7) adicionar cerca de 6mL de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8) retirar o sobrenadante, e logo após ressuspender o material precipitado em 7mL de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9) repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma boa lavagem e completa fixação uma das células em suspensão;
- 10) pingar o material em lâminas previamente tratadas em solução de HCL 10%;
- 11) deixar secar ao ar.

3.2.3. Coloração convencional

Após a obtenção de cromossomos metafásicos, as suspensões celulares contendo preparações cromossômicas foram pingadas em lâminas de microscopia, coradas em solução Giemsa 5%, em tampão fostato com pH 6,7 por 10 minutos.

3.3. Bandamento C

Para a localização da heterocromatina constitutiva, utilizamos a técnica de bandamento-C descrita por Summer (1972):

- Hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente
- Passar as lâminas por uma solução de Ba(OH)₂ a 60°C, por cerca de 20 segundos e lavar em água destilada;
- Enxaguar as lâminas em HCl 1N a 60°C e lavar em água destilada;
- Incubar por 30 minutos em 2xSSC (pH= 6,8), a 60°C;
- Corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato (pH= 6,7).

3.4. Análise e montagem dos cariótipos

Depois de coradas, as lâminas foram analisadas sob um microscópio óptico Olympus, modelo BX61. As fotos foram capturadas com o software DP Controller (Olympus) em objetiva de imersão de 100X. Através das imagens capturadas, os cromossomos foram organizados e

classificados de acordo com morfologia e tamanho, utilizando o software Adobe Photoshop CC 2015.

3.5. Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos músculos, que se encontravam preservados em etanol 100%, foi realizada utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Uma etapa adicional de remoção de RNA foi realizada com a utilização de RNase A (Invitrogen). Os resultados gerados pela etapa anterior foram conferidos em gel de agarose a 1% para a verificação da integridade do DNA genômico extraído.

3.6. Sondas de DNAr 5S

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR a partir do DNA genômico de *C. aeneus*, extraído conforme descrição no item anterior. Para isso, usamos os *primers* 5SF (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3) e 5SR (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAACG-3') (Pendás et al. 1994). Esta sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada utilizando anti-digoxigenina-rhodamina. Os parâmetros da utilizados para a marcação da sonda foram o seguinte: 1x tampão de Taq polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 100µM de digoxigenina 11-dUTP, 0,1µM de cada *primer*, 0,5U de Taq Polimerase, 100ng de DNA genômico e H₂O ultrapura completando 25µL. O programa utilizado no termociclador foi o seguinte: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 15 s, 54°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram checados em gel de agarose a 2%.

3.7. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

As sondas de DNAr 5s foram utilizadas para a localização dos clusters ribossômicos nos indivíduos das populações analisadas. Para isso, realizamos a técnica de FISH, utilizando os procedimentos descritos por Pinkel et al. (1986), com algumas modificações já estabelecidas em nosso laboratório:

Primeiro dia:

Primeira lavagem:

1. Lavar as lâminas em solução PBS 1x, por 3 min.

Tratamento com Pepsina:

1. Incubar em 0,005% pepsina/10mM HCl por 10 min, a 37°C;
2. Lavar em PBS 1x por 3 min, em temperatura ambiente.

Fixação com formaldeído

1. Fixar em 1% em PBS 1x/50 mM MgCl₂ por 10 min, em temperatura ambiente;
2. Lavar em PBS 1x por 3 min;
3. Desidratar em série alcoólica (70%,85% e 100%) gelada por 3 min cada e secar as lâminas.

Mix de Hibridação

1. Preparar o *mix* de hibridação (15 ul de formamida 70%, 6 ul de sulfato dextrano 10%, 3 ul 20xSSC, entre 1 ou 2 ul de sonda por lâmina, completando de água até o total de 30ul).

Pré-Hibridação

1. Desnaturar as lâminas em formamida 70% em 2xSSC, por 2 min a 70°C;
2. Desnaturar a sonda por 10 min;
3. Desidratar as lâminas em série alcoólica, 3 min cada e secar as lâminas.

Hibridação

1. Montar as lâminas com a solução de hibridação, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida a 37°C overnight.

Segundo dia:

Lavagens:

1. Retirar as lamínulas e lavar as lâminas em 1x SSC em 42°C por 5min, realizando a agitação do recipiente;
2. Lavar as lâminas em 4xSSC/0,5% Triton por 3min, em temperatura ambiente realizando a agitação do recipiente.

Bloqueio

1. Incubar as lâminas em Tampão 5% NFDm/4xSSC (2,5g de leite em pó desnatado + 10 ml de 20xSSC + 40ml H₂O) por 15 min a temperatura ambiente;
2. Lavar 2x em 4xSSC/0,5% Triton por 3 min cada, a temperatura ambiente.

Detecção

1. Incubar as lâminas com 100 ul de NFDm/0,5 ul de anti-digoxigenina rodamina por 1h em câmara úmida a 37°C;
2. Lavar 3x em 4xSSC/0,5% Triton por 3 min cada, em temperatura ambiente;
3. Desidratar em série alcoólica, 3 min cada e secar as lâminas;
4. Montar as lâminas inserindo 15 ul de DAPI e cobrir com lamínula, mantendo estas em um local escuro até sua visualização.

3.8. Sequenciamento massivo de DNA

Para realizar a caracterização do satelitoma da espécie em estudo e o posterior estudo de abundância e divergência destes satélites nas duas populações, um indivíduo sem sexo definido da população do Rio Alambari e um indivíduo fêmea da população do Rio Batalha, sob os vouchers 12729 e 12954, respectivamente, depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE) localizado na UNESP-Bauru, SP. Estes indivíduos foram selecionados, pois são de populações diferentes, bem como apresentavam números cromossômicos bastante distintos. Enquanto o indivíduo 12729 apresentou 64 cromossomos na maioria das metáfases analisadas, o indivíduo 12954 exibiu a maioria das metáfases com 60 cromossomos. Para o sequenciamento massivo de DNA, utilizamos a plataforma BGISEQ-500 da BGI (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China), com a opção *paired-end* 2x101bp, resultando em coberturas de 0,86X para o indivíduo do Rio Alambari e 0,91X para o indivíduo do Rio Batalha, considerando o genoma aproximado de *C. aeneus* próximo a 1,36Gb.

3.9. Análises bioinformáticas

3.9.1. Caracterização do satelitoma de *C. aeneus*

A caracterização do satelitoma foi realizada utilizando a pipeline TAREAN (Novák et al. 2017), para as duas bibliotecas do estudo individualmente. Ambas as bibliotecas passaram por um processo de filtragem de qualidade e correção nos tamanhos das leituras, utilizando o software Trimmomatic, com os filtros LEADING:3; TRAILING:3; SLIDINGWINDOW:4:15;

MINLEN:100 e CROP:101 (Bolger et al. 2014). Para cada iteração no TAREAN, foi realizado uma seleção aleatória de 2x 500.000 leituras e após a prospecção dos DNAs satélites (satDNAs) pelo TAREAN, utilizamos o programa DeconSeq (Schmieder e Edwards, 2011) para a remoção de leituras com similaridade aos satDNAs nas bibliotecas de estudo. A última iteração foi dada ao não ser encontrada mais nenhuma sequência com potencial de ser um DNA satélite nas duas bibliotecas.

Após finalizada a etapa de TAREAN, concatenamos os catálogos de satDNAs encontrados nos dois indivíduos e realizamos uma busca de similaridade destas sequências com famílias multigênicas, para a remoção destas, dado ao fato deste tipo de sequência também possuir a característica de ser repetida em *tandem* e, com isso, ser um potencial resultado do software TAREAN (*Tandem Repeat Analyzer*). Após a remoção de famílias multigênicas, realizamos uma busca de similaridade entre as sequências do catálogo geral, utilizando os padrões estabelecidos por Ruiz-Ruano et al. (2016), para a classificação dos satDNAs quanto a uma superfamília (similaridade > 50% e < 80%), família (similaridade > 85% e < 95%) ou um mesmo DNA satélite (similaridade > 95%).

Para a determinar os parâmetros de abundância e divergência de todas as famílias de DNA satélites presentes no nosso catálogo, utilizamos o software RepeatMasker (Smit et al. 2017), utilizando a opção “cross_match” nas duas bibliotecas genômicas de *C. aeneus*. Para estimar a abundância, foi realizada uma proporção entre a quantidade de leituras mapeadas em cada satélite, multiplicado por 100 (tamanho de cada leitura em pares de bases) e dividido pelo total de nucleotídeos analisados. A nomeação de cada família do satelitoma foi dada em ordem decrescente de abundância, como sugerido por Ruiz-Ruano et al. (2016). Também como resultante do RepeatMasker, averiguamos a divergência média entre as famílias de satDNAs, utilizando a distância entre as sequências, para isso utilizamos o Kimura-2- parâmetro, tendo como base o script calcDivergenceFromAlign.pl pertencente ao RepeatMasker (Smit et al. 2017).

4- RESULTADOS

4.1. Análises Citogenéticas

Foram avaliadas múltiplas metáfases por indivíduo (em média, 20 metáfases), sendo que dos 26 indivíduos estudados, 12 faziam parte da população do rio Alambari, e 14 faziam parte da população do rio Batalha. Os detalhes sobre os exemplares analisados de *C. aeneus*, local de coleta e número de cromossomos encontrados, estão apresentados na Tabela 1.

O cariótipo padrão base encontrado em ambas as populações foi de $2n= 60$ cromossomos, entretanto, uma elevada variação cromossômica intra- e interindividual foi encontrada em quase todos os exemplares analisados, caracterizando a ocorrência de cromossomos B mitoticamente instáveis nesta espécie, sendo que nossas análises demonstraram células contendo de 0 a 4 cromossomos supranumerários (Tabela 1). Deve-se notar que a variação cromossômica é maior nos indivíduos do rio Alambari, em relação aos indivíduos do Batalha, sendo que a maioria das células contadas no Alambari apresentam $2n=60+2$ cromossomos.

Tabela 1. Variação cariotípica das populações do rio Alambari e do rio Batalha.

Indivíduo	Rio	60	60+1	60+2	60+3	60+4	MI
12581	Alambari		1	16			0,03
12583	Alambari		3	16			0,08
12584	Alambari	2	2	21			0,12
12585	Alambari		6	10			0,19
12586	Alambari		5	13		1	0,18
12587	Alambari		4	16			0,1
12588	Alambari	1	7	14			0,20
12589	Alambari	6	5	33	10		0,26
12590	Alambari		1	7	10	10	0,22
12592	Alambari	1	5	23	5	3	0,24
12729	Alambari	1	1		6	10	0,36
12852	Alambari	6	5	7			0,72
Média							0,2 +- 0,18
12582	Batalha	7	4	9			0,8
12953	Batalha		10	1	30	2	0,18
12954	Batalha	35	6				0,85
12955	Batalha	14	1				0,93
12956	Batalha	16					-
12958	Batalha	2	8	3			0,38
13025	Batalha	26	3				0,89

13026	Batalha	4					-
13027	Batalha	15	7				0,68
13028	Batalha	10	1				0,9
13030	Batalha	12	1	2	1		0,81
13037	Batalha	4	15	6	1		0,46
13038	Batalha	9		4			0,69
13039	Batalha	11	5				0,69
Média							0,68+0,22

MI: Índice de instabilidade mitótica

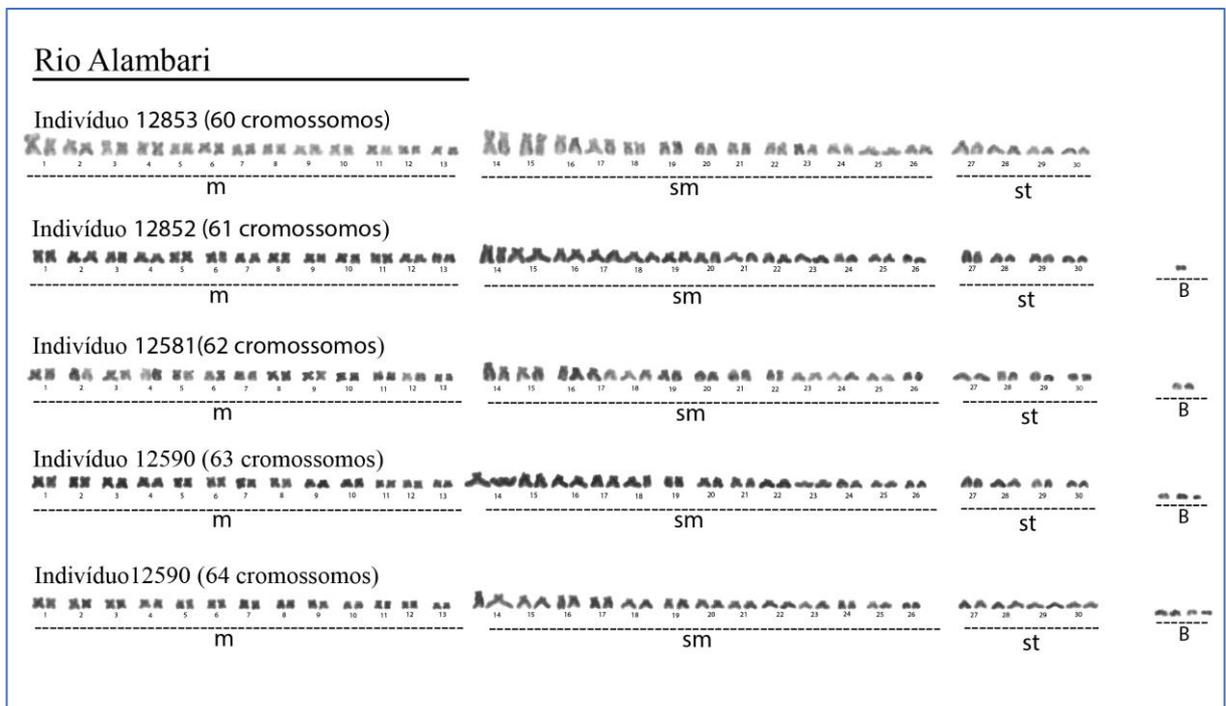


Figura 6. Comparação entre indivíduos do rio Alambari com diferentes números de cromossomos.

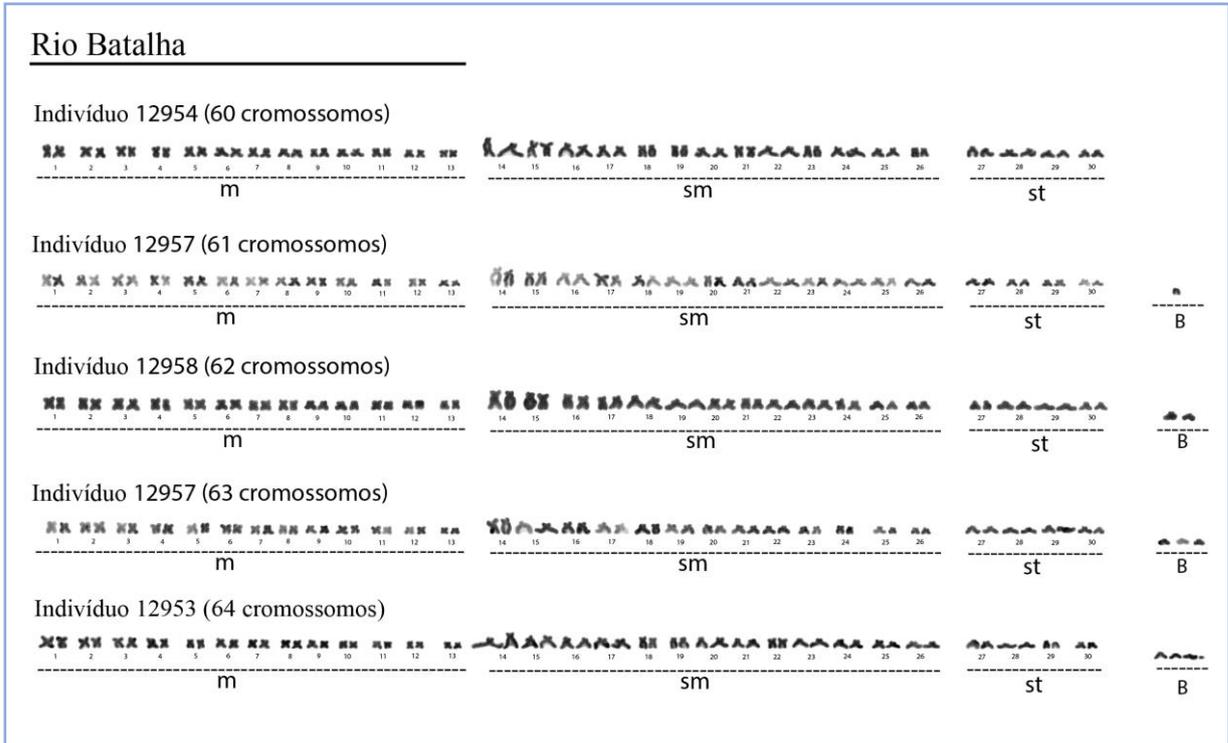


Figura 7. Comparação entre indivíduos do rio Batalha com diferentes números de cromossomos.

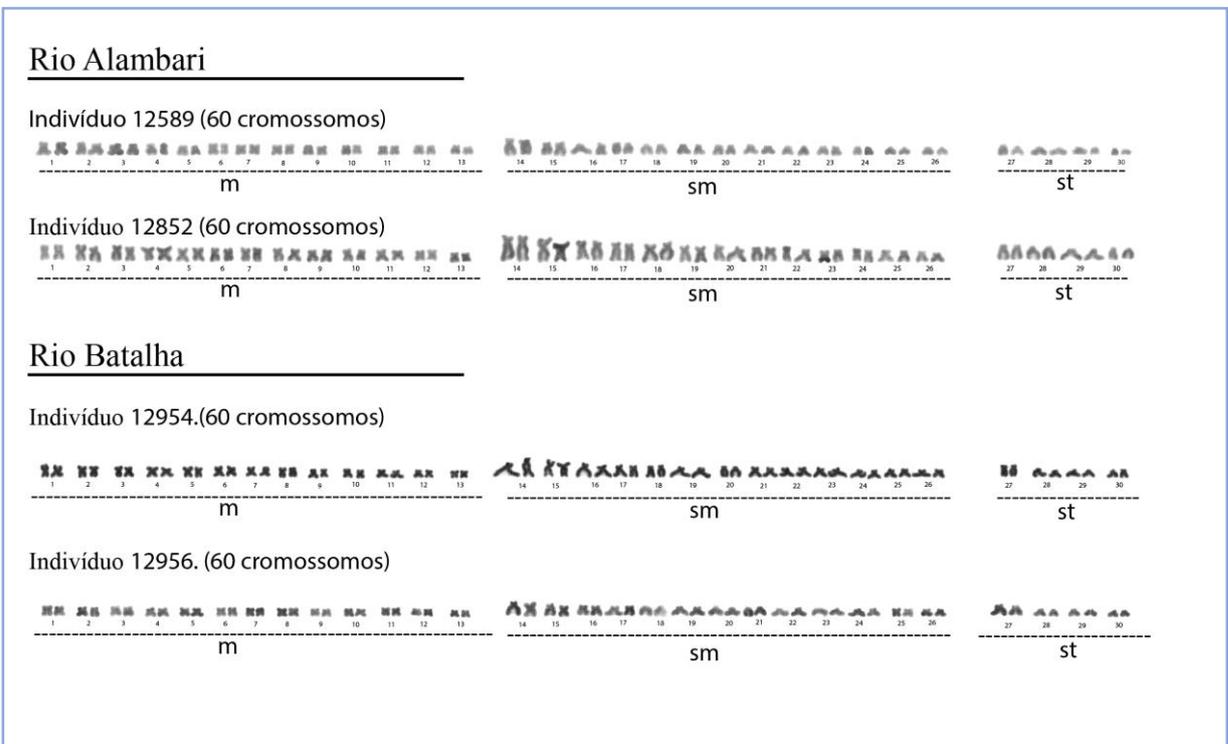


Figura 8. Comparação entre indivíduos $2n= 60$, do rio Alambari e do rio Batalha.

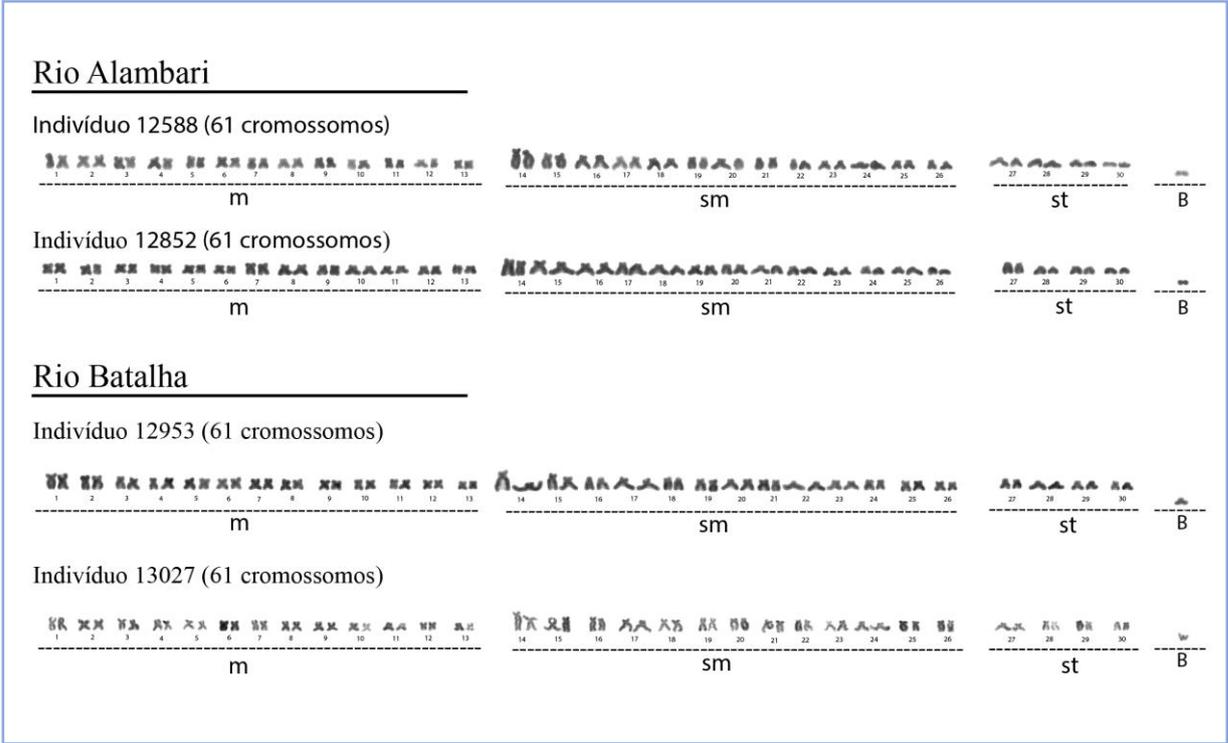


Figura 9. Comparação entre indivíduos $2n= 60 + 1$, do rio Alambari e do rio Batalha.

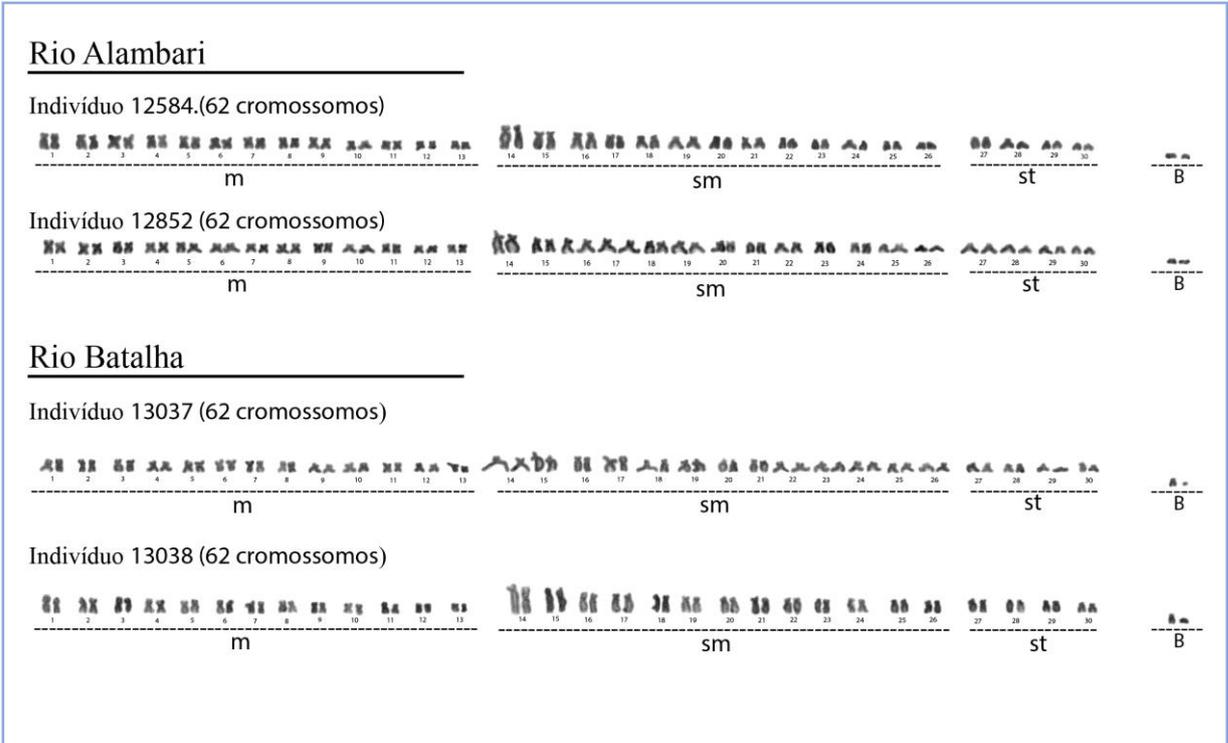


Figura 10: Comparação entre indivíduos $2n= 60 + 2$, do rio Alambari e do rio Batalha.

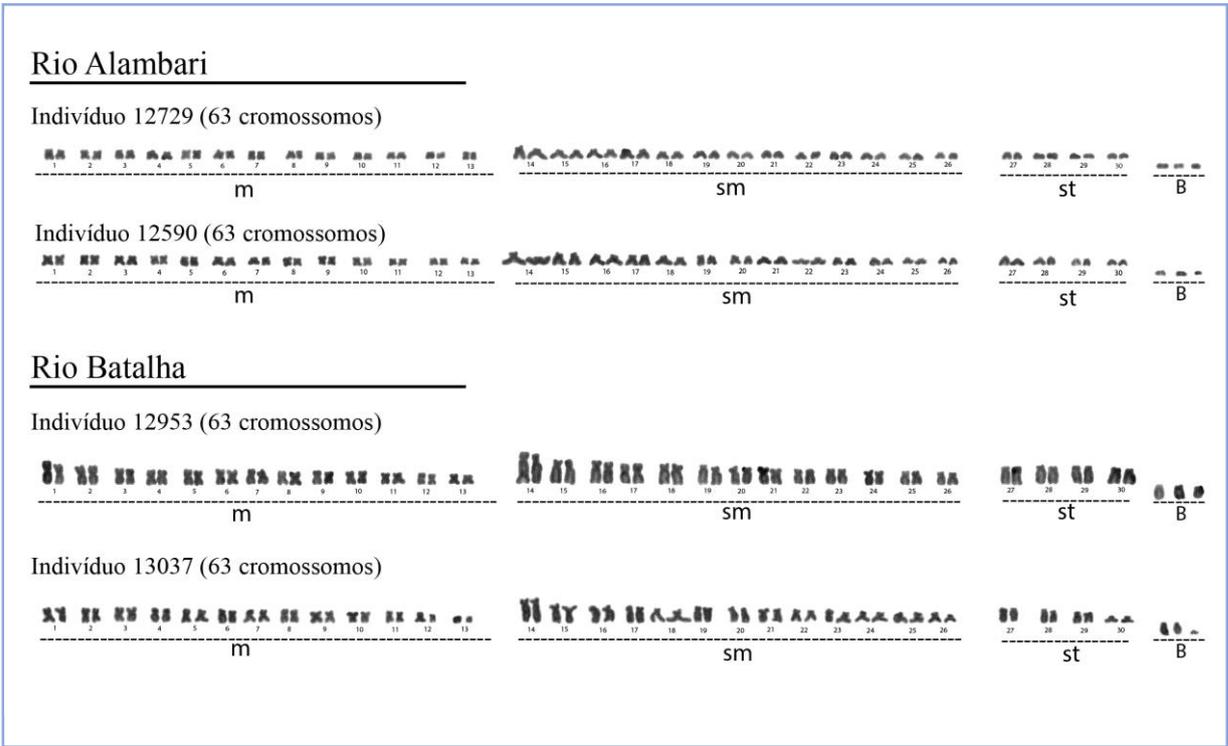


Figura 11: Comparação entre indivíduos $2n= 60 + 3$, do rio Alambari e do rio Batalha.

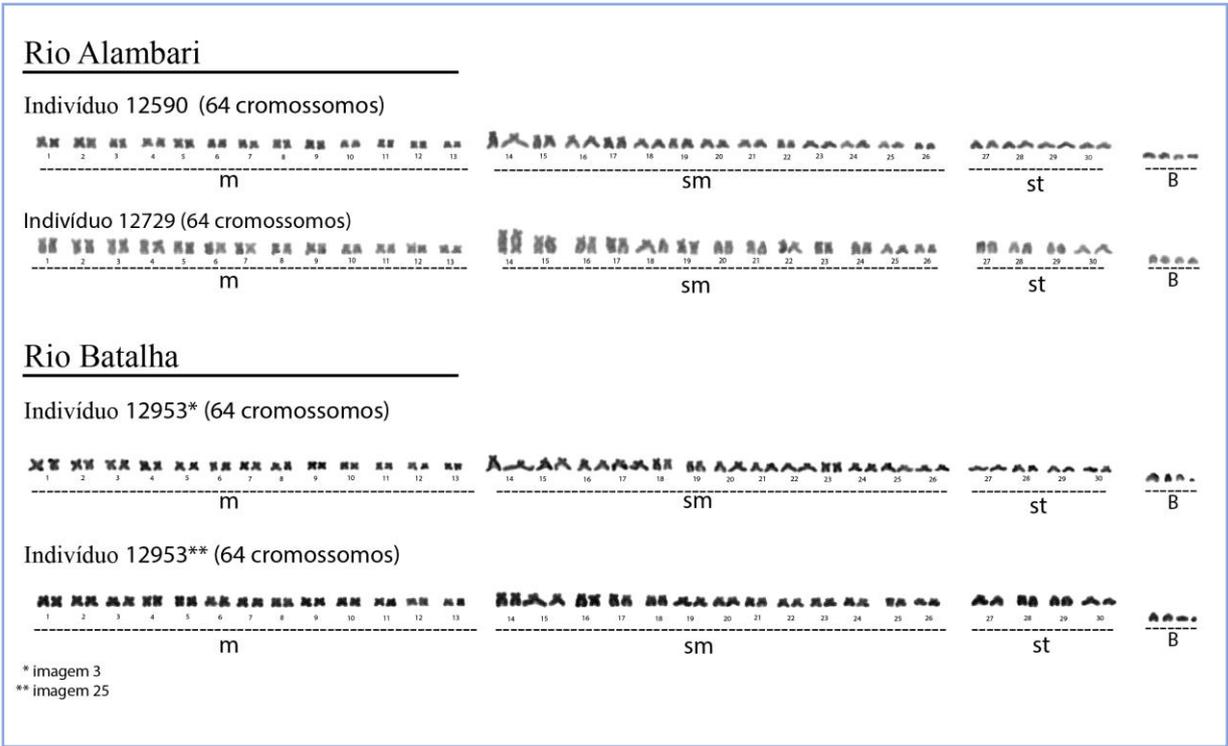


Figura 12: Comparação entre indivíduos $2n= 60 + 4$, do rio Alambari e do rio Batalha

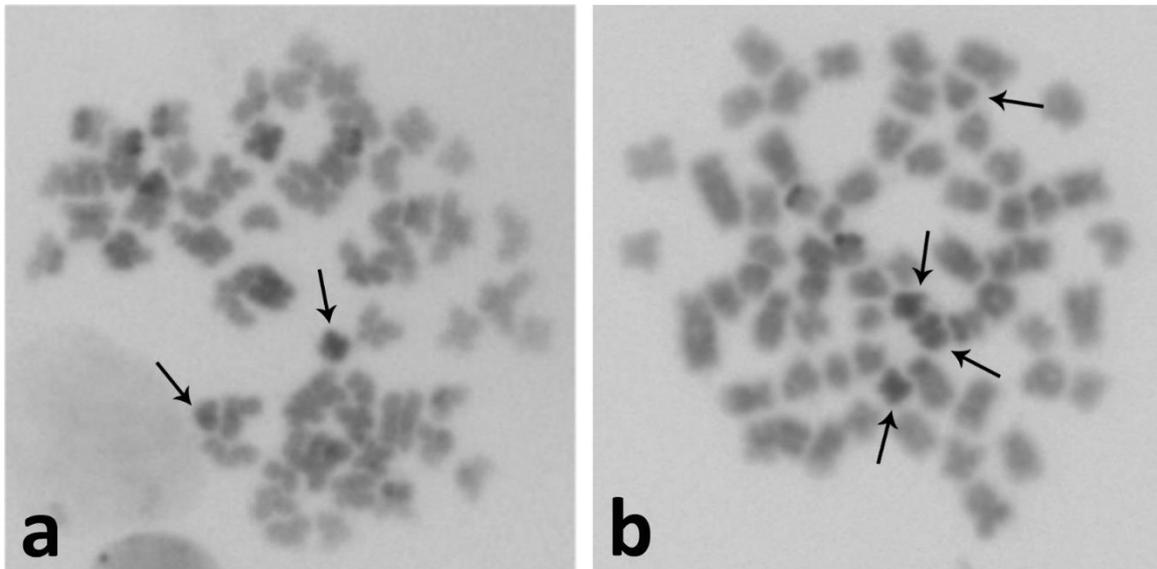


Figura 13: Metáfases de *C. aeneus* coletados no rio Batalha (a) e Alambari (b) após bandamento-C. As setas indicam os cromossomos B heterocromáticos.

A hibridação *in situ* fluorescente utilizando as sondas de 5S rDNA demonstrou um padrão de conservação entre as duas populações analisadas, com clusters no braço curto de apenas um par de cromossomos subtelocêntricos tanto para indivíduos do Rio Batalha quanto para indivíduos do Rio Alambari (Figura 14).

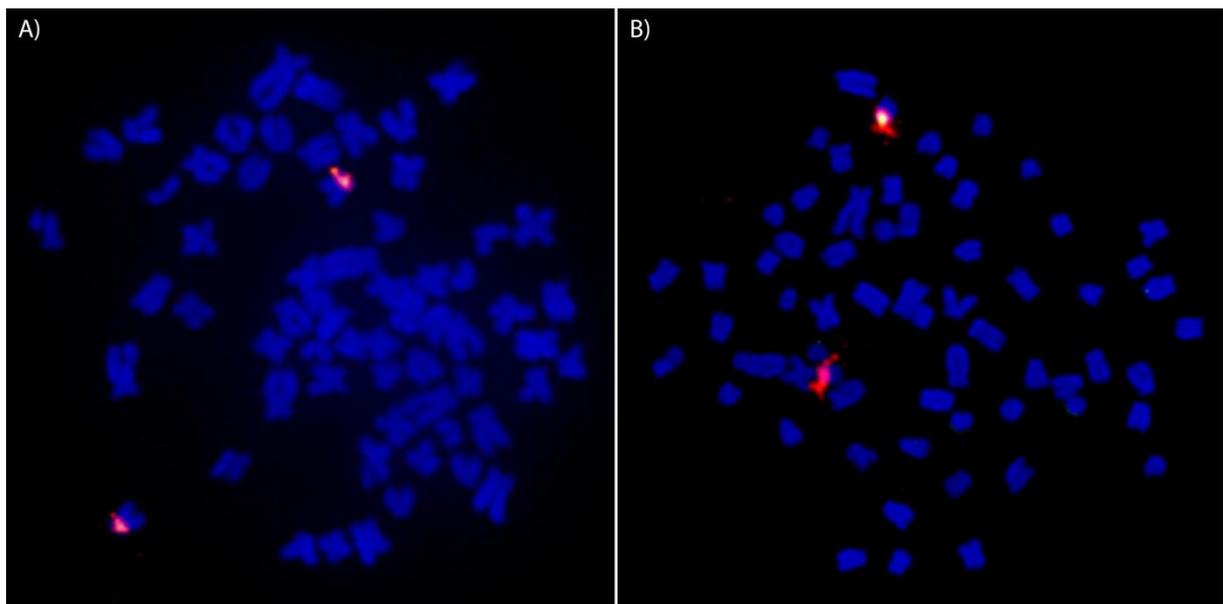


FIGURA 14. Metáfases mitóticas de *C. aeneus* após FISH com sonda de DNAr 5S. Em (A), exemplar coletado no rio Batalha; em (B), exemplar coletado no rio Alambari

4.2- Análises Bioinformáticas

Para cada indivíduo foram realizadas três iterações no software TAREAN, até que mais nenhum satDNA tenha sido caracterizado, totalizando 60 DNAs satélites para a espécie *C. aeneus*. Três destes (CaeSat03, CaeSat58 e CaeSat59), apresentando uma variante de cada, caracterizadas durante o processo no TAREAN. No total, foram caracterizadas 11 superfamílias entre os DNAs satélites da análise, com duas delas formadas por mais de um par, sendo estas a Superfamília 6 e 7, possuindo 4 e 5 satDNAs, respectivamente, em cada uma. Quanto ao conteúdo A+T, o valor mínimo foi de 32,4 % e o valor máximo de 70,8%, possuindo uma média de 59,8517 %, ocorrendo tendência a satélites ricos em conteúdo A+T.

Em relação ao tamanho os monômeros caracterizados (RUL, “repeat unit lengths”) a mediana apresentada foi de 163 pares de bases, apresentando um foco para uma grande quantidade de DNAs satélites complexos (monômero superior a 100 pares de bases) no catálogo da espécie *C. aeneus*, tendo o menor monômero com 14bp e o maior com 2939bp (Tabela 2).

Na análise de abundância dos satDNAs, é possível denotar a predominância de algumas destas sequências nas diferentes bacias ao realizar uma razão entre a abundância destas diferentes populações, resultando em um caso de satDNA mais predominante na população do Rio Batalha (CaeSat04-185) e 12 casos de satDNA mais predominantes na população do Rio Alambari, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 2: Características dos 60 DNAs satélites de *C. aeneus* (SF= Superfamília; RUL = “repeat unit length”; A+T (%) = porcentagem de conteúdo AT do monômero).

S.F	satDNA	RUL	A+T(%)	Abundância Alambari	Abundância Batalha	Kimura-2-Divergence
	CaeSat01-37	37	64,9	0,03294774	0,040602169	4,55
7	CaeSat02-598	598	55,9	0,016686261	0,014704438	21,775
	CaeSat03-147	147	53,1	0,010686792	0,004890217	12,625
3	CaeSat04-185	185	70,8	0,009447637	0,027384721	7,455
10	CaeSat05-1197	1197	53,1	0,003909985	0,006927043	5,975
8	CaeSat06-1690	1690	62,7	0,00325136	0,003509402	10,53
10	CaeSat07-147	147	60,5	0,002300484	0,004890217	9,485
	CaeSat08-119	119	44,5	0,002008187	0,000213896	8,425
2	CaeSat09-98	98	69,4	0,001912811	0,002055786	8,835
	CaeSat10-1431	1431	42,8	0,00163622	0,0012282	14,245
11	CaeSat11-71	71	32,4	0,001623766	0,00053614	5,905

	CaeSat12-157	157	58,6	0,001114989	0,001208555	10,655
1	CaeSat13-2939	2939	67,7	0,000969476	0,001348096	1,79
7	CaeSat14-1335	1335	61	0,000933909	0,001211707	7,125
11	CaeSat15-109	109	39,4	0,000796168	0,000191094	7,59
	CaeSat16-84	84	59,5	0,000723374	0,000636976	17,355
2	CaeSat17-88	88	68,2	0,000702472	0,000596885	8,74
	CaeSat18-164	164	61	0,00059265	0,000496616	5,855
	CaeSat19-133	133	66,2	0,00058975	0,001001916	11,405
	CaeSat20-627	627	60,3	0,000574238	0,000457984	10
6	CaeSat21-734	734	61,4	0,000566335	0,000613217	8,195
7	CaeSat22-1499	1499	63,3	0,000540712	0,000449952	6,125
8	CaeSat23-749	749	68,8	0,000484929	0,000553408	8,065
	CaeSat24-176	176	67	0,000460543	0,000417737	7,815
7	CaeSat25-679	679	54,5	0,000456031	0,000399323	14,33
4	CaeSat26-14	14	64,3	0,000362359	0,00003002	4,435
3	CaeSat27-184	184	65,8	0,000342684	0,00030197	9,64
	CaeSat28-30	30	56,7	0,000300146	0,000142801	15,665
6	CaeSat29-1261	1261	64,6	0,000263641	0,000262762	2,84
	CaeSat30-190	190	58,4	0,000250065	0,000294736	9,23
5	CaeSat31-38	38	60,5	0,000249624	0,000145749	19,545
5	CaeSat32-19	19	57,9	0,000244611	0,000140571	12,725
	CaeSat33-77	77	64,9	0,000239577	0,000196096	9,84
	CaeSat34-46	46	60,9	0,000237016	0,000195591	1,98
	CaeSat35-552	552	66,8	0,000212521	0,000130556	5,905
	CaeSat36-155	155	63,9	0,000209699	0,000054249	21,52
	CaeSat37-158	158	53,8	0,00019884	0,000160395	6,665
9	CaeSat38-519	519	57,8	0,000189402	0,000108947	3,13
	CaeSat39-152	152	64,5	0,000187514	0,000169692	4,805
	CaeSat40-28	28	60,7	0,000181649	0,000002815	13,49
	CaeSat41-169	169	68	0,000176566	0,000157264	6,18
	CaeSat42-31	31	58,1	0,000172074	0,00011254	4,235
6	CaeSat43-1413	1413	63,2	0,00016601	0,00015737	3,69
	CaeSat44-416	416	62,7	0,000162684	0,000195817	5,955
	CaeSat45-155	155	51,6	0,000160276	0,000122625	5,7
9	CaeSat46-397	397	57,7	0,000144198	0,000084054	2,52
	CaeSat47-47	47	61,7	0,000143906	0,000042952	4,59
	CaeSat48-182	182	60,4	0,000136576	0,000081955	5,6
	CaeSat49-41	41	70,7	0,000126282	0,000128924	5,045
7	CaeSat50-162	162	53,1	0,000117468	0,00013467	6,735
	CaeSat51-360	360	57,5	0,000109704	0,000137073	6,29
	CaeSat52-165	165	65,5	0,000097456	0,000095851	9,6
	CaeSat53-51	51	56,9	0,000096923	0,000062632	10,515
1	CaeSat54-508	508	70,5	0,000094714	0,000129749	2,11

6	CaeSat55-281	281	58,4	0,000094495	0,000098979	2,92
	CaeSat56-48	48	58,3	0,000083321	0,000085993	2,355
4	CaeSat57-26	26	57,7	0,000078162	0,000003874	8,355
	CaeSat58-169	169	50,9	0,000063481	0,000042414	4,39
	CaeSat59-368	368	64,1	0,000062454	0,000028161	6,68
	CaeSat60-72	72	55,6	0,00005367	0,000020499	13,94

Tabela 3. satDNAs com abundância diferencial em relação as duas populações do estudo.

DNA Satélite	Razão Abundância Alambari/Abundância Batalha
CaeSat40-28	64,52895204
CaeSat57-26	20,17604543
CaeSat26-14	12,07058628
CaeSat08-119	9,388614093
CaeSat15-109	4,166368384
CaeSat36-155	3,865490608
CaeSat47-47	3,350391134
CaeSat11-71	3,028623121
CaeSat60-72	2,618176496
CaeSat59-368	2,217747949
CaeSat03-147	2,18534106
CaeSat28-30	2,101848026
CaeSat04-185	0,34499665

5. DISCUSSÃO

Estudos citogenéticos envolvendo o gênero *Corydoras* são escassos, a despeito da sua enorme riqueza de espécies, i.e., dentre as 180 espécies válidas atualmente, apenas 15 tiveram o seu cariótipo caracterizado (Oliveira et al. 1993; Shimabukuro-Dias et al. 2004; Takagui et al. 2014; Barbosa et al. 2017). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram dados citogenéticos descritos anteriormente para *C. aeneus* coletados na bacia do rio Tietê (Oliveira et al. 1988), sendo que ambas as populações analisadas aqui exibiram um número diploide padrão de $2n=60$, com fórmulas cariotípica semelhantes ($13m+13sm+4st$). Nesse sentido, embora ambas as populações estejam isoladas por um longo período, seus cariótipos-base se

mantiveram estáveis ao longo da história. Entretanto, no nível interespecífico, nota-se uma variação citogenética significativa neste gênero, com números cromossômicos que chegam a variar na ordem de dezenas de cromossomos (Oliveira et al. 1988, 1992, 1993; Shimabukuro-Dias et al. 2004; Artoni et al. 2006; Takagui et al. 2014; Rocha et al. 2016; Barbosa et al. 2017).

Alterações cromossômicas numéricas e estruturais são comumente detectadas entre espécies/populações isoladas reprodutivamente. Considerando as bacias hidrográficas amostradas no presente trabalho, diversos níveis de variação cariotípica já foram relatados e incluem alterações cromossômicas numéricas entre populações de uma mesma espécie, como é o caso de *Synbranchus marmoratus* (Utsunomia et al. 2014), ou de espécies distintas como *Gymnotus sylvius* e *G. inaequilabiatus* (Scacchetti et al. 2011). Além disso, diferenças na microestrutura cariotípica também são comumente relatadas, como em populações de *Characidium gomesi*, que apresentam variações na posição das regiões organizadoras de nucléolo (Pansonato-Alves et al. 2011). No entanto, em *C. aeneus*, não houve mudanças significativas no que se refere à estrutura cariotípica dos cromossomos A entre as populações analisadas, bem como ao número e posição dos clusters de DNAr 5S.

Embora os cariótipos no gênero *Corydoras* sejam bastante diversificados, o que se observa para os sítios de DNAr 5S é uma conservação de número de clusters deste gene. Nesse sentido, dentre as 6 espécies analisadas para esta característica, todas, incluindo *C. aeneus* (analisada aqui), apresentam um único par cromossômico portando DNAr 5S (Rocha et al. 2016; Barbosa et al. 2017). Por outro lado, a posição cromossômica não parece conservada. Enquanto na maioria das espécies, os clusters estão localizados em regiões pericentroméricas, em *C. lacrimostigmata* e *C. carlae* os clusters estão mais próximos à região telomérica. Considerando que os números diploides variam bastante entre as espécies e, conseqüentemente, vários cromossomos estão envolvidos em rearranjos quando as espécies são comparadas, não é possível dizer que os clusters de DNAr 5S se mantiveram no mesmo cromossomo.

A ocorrência de variação cromossômica intraindividual já foi relatada em *C. aeneus* por Oliveira et al. (1988), sendo explicada pela ocorrência de: i) cromossomos supranumerários mitoticamente instáveis e/ou; ii) rearranjo Robertsoniano. Em nossa análise, não detectamos a ocorrência deste rearranjo, sendo que os cromossomos adicionais ao número diploide padrão de $2n=60$ foram caracterizados como cromossomos B mitoticamente instáveis. Neste contexto, é relevante destacar que estes elementos são encontrados em ambas as populações, mas em frequências distintas e exibindo índices de instabilidade mitótica também divergentes. Assim, os cromossomos B são mais abundantes na população do rio Alambari, mas apresentam um

índice de instabilidade mitótica menor do que comparados aos elementos supranumerários encontrados na população do rio Batalha.

Uma vez que cromossomos B se originam, entram em um ciclo de vida e passam por diferentes estágios até a sua eliminação (Camacho et al. 2000). Nesse sentido, no longo prazo, se estabelece uma *Arms race* (corrida armamentista) entre o genoma hospedeiro e os cromossomos B, resultando em processos de evolução independente destes elementos em populações isoladas. Considerando que a instabilidade mitótica é um dos mecanismos de acúmulo de cromossomos B em populações naturais (Nur 1969; Jones 1991), enquanto a estabilização pode indicar a neutralização destes elementos (Cavallaro et al. 2000), nós sugerimos que os ciclos de vida dos cromossomos B de ambas as populações de *C. aeneus* estão em momentos distintos.

Pela sua natureza de não recombinar com cromossomos A, os cromossomos supranumerários estão submetidos à eventos moleculares de deterioração genética, como acúmulo de heterocromatina e DNAs repetitivos, bem como degeneração gênica (Houben 2017). Nesse sentido, a detecção de satDNAs diferencialmente acumulados no genoma de um indivíduo portador de cromossomos B deve estar relacionada à clusterização deste tipo de sequência nos cromossomos B da espécie. Este tipo de abordagem vem sendo aplicado com sucesso para a caracterização do conteúdo de repetições em tandem de cromossomos B de diferentes espécies (Utsunomia et al. 2016; Ruiz-Ruano et al. 2017; Silva et al. 2017; Milani et al. 2018). Nesse sentido, o desenho de *primers* e FISH para a localização destes satDNAs podem ajudar a caracterizar o conteúdo genômico dos cromossomos B de *C. aeneus*, bem como propor hipóteses sobre a origem e evolução destes elementos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação possuiu como objetivo central caracterizar e comparar cariótipos de duas populações de *C. aeneus* de bacias hidrográficas distintas (Paranapanema e Tietê), atentando-se a presença de cromossomos extras, ou supranumerários, variações cariotípicas entre as bacias e os dados registrados na literatura, relacionando-as com o conjunto de DNAs satélites dessas populações. Analisados um total de 26 indivíduos (12 do rio Alambari, e 14 do rio Batalha), foi observada variação nos cariótipos de ambas as populações, com ocorrência de cromossomos B, entretanto, a frequência ocorrida em cada população se demonstrou divergente. Outra divergência encontrada foi em relação a instabilidade mitótica, que teve seu M.I. (índice

de instabilidade mitótica) maior na população do rio Batalha, apesar da maior abundância de cromossomos B ter sido observada na população do rio Alambari. Nossas análises também verificaram que *C. aeneus*, apresenta um único par cromossômico portando DNAr 5S, presente na região pericentromérica, estando de acordo com dados encontrados para outras espécies já analisadas.

Estudos com *C. aeneus* são considerados escassos, e apesar de completar mais de três décadas sem estudos citogenéticos ou moleculares, nossos resultados corroboram com os dados relatados pela literatura até então. A abundância de sequência de satDNA também se demonstrou distinta entre as duas populações, tendo sequências especificamente mais abundantes na população do Rio Batalha e outras sequências mais abundantes na população do Rio Alambari. Com isso, para o futuro, pretende-se realizar o desenho de *primers* e FISH com essas sequências específicas, o que pode auxiliar na caracterização do conteúdo genômico dos cromossomos B de *C. aeneus*, concedendo assim uma compreensão genética maior da espécie.

7. REFERÊNCIAS

- Artoni, R. F., Terêncio, M. L., Vicari, M. R., Matiello, M. C. A., Cestari, M. M., Bertollo, L. A. C.. Cytogenetics of two sympatric *Corydoras* species (pisces, siluriformes, challichthyidae) of Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1, p. 29-41, 2006.
- Barbosa, P.; Pucci, M. B.; Nogaroto, V.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F.; Vicari, M. R. Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 01, 2017.
- Bizerril, C.R.S.F.; Bidegain Primo, P. Inland water fish in the state of Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: **FEMAR-SEMADS**, p. 417, 2001.
- Bolger, A. M., Marc, L.; Bjoern, U. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**. v30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- Bruton, M. Alternative life-history strategies of catfishes. **Aquatic Living Resources**, v 9, p. 35-41, 1996.
- Britto, M. R.. Philogenia of the subfamily Corydoradinae Hedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v 153, p. 119-154, 2003.

- Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. B-Chromosome Evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 355, p.163–178, 2000.
- Cavallaro, Z. I., Bertollo, L. A., Perfectti, F., Camacho, J. P. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 8, p. 627–634, 2000.
- Ferraris, Carl J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1-628, 2007.
- Fricke, R. **Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. 2022. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>) . Electronic version accessed 06 december 2022.
- Foresti F, Almeida Toledo L, F, Toledo F° S, A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 31, n. 3, p. 137–144, 1981.
- Graça, W.J., Pavanelli, C.S. Paper. Fish from the flood planicie of the upper Parana River and adjacent areas. Maringá: **EDUEM**, p. 241, 2007.
- Hoedeman, J.J. Notes on the Ichthyology of Surinam (Dutch Guiana). The Catfish genera *Hoplosternum* and *Callichthys*, with key to the genera and groups of the family Callichthyidae. **Beaufortia**, v. 1, n. 12, p. 1–12, 1952.
- Houben A. B Chromosomes –A Matter of Chromosome Drive. **Front. Plant Sci**. v. 8, p. 210, 2017.
- Jin, Y., Liu, S., Yuan, Z., Yang, Y., Tan, S., Liu, Z. Catfish genomic studies: progress and perspectives. **Genomics in Aquaculture**. p. 73-104, 2016.
- Jones, R. N. B-chromosome drive. **American Naturalist**, v. 137, n. 3, p. 430-442, 1991.
- Lacépède, B. G. E. Natural history of fish. Paris, t. 5, p. 803, 1803.
- Malabarba, L. R., & Malabarba, M. C. Phylogeny and classification of Neotropical fish. **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**, p. 1–19, 2020.
- Milani, D., Ramos, É., Loreto, V., Martí, D. A., Cardoso, A. L., de Moraes, K. C. M., Martins, C., Cabral-de-Mello, D. C. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2017.
- Nelson, J., Grande, T., Wilson, M. Fishes of the World, Fifth Edition. p. 1- 707, 2016.

- Novák, P., Ávila Robledillo, L., Koblížková, A., Vrbová, I., Neumann, P., Macas, J. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, p. 111-e111, 2017.
- Nur, U. Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. **Chromosoma**, v. 27, p. 1-19, 1969.
- Oliveira, C., Toledo, L. F. A., Foresti, F., Toledo F°, S. A. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, v. 41, n. 3-4, p. 227-236, 1988.
- Oliveira, C.; Almeida Toledo, L. F.; Toledo Filho, S. A. Comparative cytogenetic analysis of three cytotypes of *corydoras nattereri* (pisces, siluriformes, callichthyidae). **Cytologia**, v. 55, n. 1, p. 21-, 1990.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F., Mori, L., Toledo-Filho, S. A. Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Journal of Fish Biology**, v. 40, n. 3, p. 419-431, 1992.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Mori, L.; Toledo-Filho, S. A. Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). **Caryologia**, v. 46, n. 2-3, p. 171-188, 1993.
- Pansonato-Alves J.C., Vicari MR, Oliveira C, Foresti F. Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **Journal of Fish Biology**, v.78, n. 1, p. 183–194, 2011a.
- 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.
- Reis, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 24, n. 2, p. 105-168, 1998.
- Rocha, R. H., Baumgätner, L., Paiz, L. M., Margarido, V. P., Fernandes, C. A., Gubiani, É. A..An uncommon co-localization of rDNA 5S with major rDNA clusters in Callichthyidae (Siluriformes): A report case in *Corydoras carlae* Nijssen & Isbrücker, 1983. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 4, p. 603, 2016.

- Ruiz-Ruano, F. J.; López-León, M. D.; Cabrero, J.; Camacho, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.
- Ruiz-Ruano, F. J., Cabrero, J., López-León, M. D., & Camacho, J. P. M. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, p. 487-500, 2017.
- Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Oliveira C, Foresti F. Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 3, p. 223–235, 2011.
- Scheel, J.J., Simonsen, V., Gyldenholm, A.O. The Karyotypes and some Electrophoretic Patterns of Fourteen Species of the Genus *Corydoras*. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.10, p. 144-152, 1972.
- Schmieder, R.; Edwards, R. Quality Control and Preprocessing of Metagenomic Datasets. **Bioinformatics**, v. 27, p. 863-864, 2011.
- Shimabukuro-Dias, C. K., Oliveira, C., Reis, R. E., Foresti, F. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 152-163, 2004.
- Silva, D. M. D. A., Utsunomia, R., Ruiz-Ruano, F. J., Daniel, S. N., Porto-Foresti, F., Hashimoto, D. T., Foresti, F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- Smit, A. F. A., Hubley, R.; Green, P. 1996–2010. RepeatMasker Open-3.0, 2017.
- Takagui FH, Venturelli NB, Dias AL, Swarça AC, Vicari MR, Fenocchio AS, Giuliano-Caetano L. The importance of pericentric inversions in the karyotypic diversification of the species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 300-305, 2014.
- Tencatt, L., Lima, F., Britto, M. R. Deconstructing an octogenarian misconception reveals the true *Corydoras arcuatus* Elwin 1938 (Siluriformes: Callichthyidae) and a new *Corydoras* species from the Amazon basin. **Journal of Fish Biology**, v. 95, n. 2, p. 453–471, 2019.

- Tencatt, L., Dos Santos, S. A., Evers, H. G., Britto, M. R. *Corydoras fulleri* (Siluriformes: Callichthyidae), a new species of catfish from the Rio Madeira basin, Peru. **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 2, p. 614-628, 2021.
- Utsunomia, R., Pansonato-Alves, J. C., Scacchetti, P. C., Oliveira, C., Foresti, F. Scattered organization of the histone multigene family and transposable elements in *Synbranchus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 30-36, 2014.
- Utsunomia, R., Silva, D. M. Z. D. A., Ruiz-Ruano, F. J., Araya-Jaime, C., Pansonato-Alves, J. C., Scacchetti, P. C., Foresti, F. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PloS One**, v. 11, p. e0150573, 2016.