

DINAÍZA ABADIA ROCHA REIS

**CONTRIBUIÇÕES DA GENÔMICA EM ESTUDOS EVOLUTIVOS NO COMPLEXO
DE ESPÉCIES CRÍPTICAS *Hypostomus ancistroides* (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Karine Frehner Kavalco

Coorientadores: Rubens Pasa

Jorge Abdala Dergam dos Santos

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R375c
2020
Reis, Dinaíza Abadia Rocha, 1992-
Contribuições da genômica em estudos evolutivos no
complexo de espécies crípticas *Hypostomus ancistroides*
(Siluriformes, Loricariidae) / Dinaíza Abadia Rocha Reis. –
Viçosa, MG, 2020.

110 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Karine Frehner Kavalco.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cascudo (Peixe). 2. DNA repetitivo. 3. Evolução.
4. Metilação. 5. Genoma mitocondrial. 6. DNA Satélite.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Doutorado em Ecologia. II. Título.

CDD 22 ed. 597.49

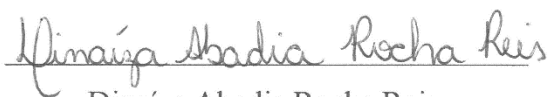
DINAÍZA ABADIA ROCHA REIS

**CONTRIBUIÇÕES DA GENÔMICA EM ESTUDOS EVOLUTIVOS NO COMPLEXO
DE ESPÉCIES CRÍPTICAS *Hypostomus ancistroides* (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

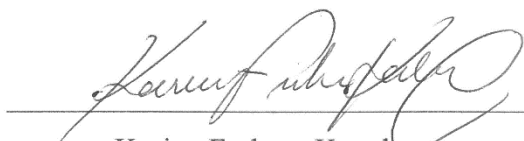
APROVADA: 27 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Dinaíza Abadia Rocha Reis

Autora



Karine Frehner Kavalso

Orientadora

Às pessoas que sempre estão ao meu lado e que sempre me apoiaram.

Aos meus pais, meus irmãos e meu noivo,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas foram essenciais para realização e conclusão desta tese. Seja pelo apoio científico, psicológico ou financiador. Gostaria de agradecer nominalmente algumas delas...

Agradeço aos meus pais, Nilma e José Maria, que sempre me apoiaram e incentivaram. São meus maiores exemplos de vida e só tenho a agradecer por todo amor e carinho sempre. Vocês são minha maior riqueza e sempre serei grata por tudo!

Aos meus irmãos, Alexsânia e Emerson, por todo esforço em me auxiliarem de diversas formas. Estiveram ao meu lado desde o início de minha vida acadêmica e sabem o quanto foram importantes na conclusão de mais este ciclo em minha vida! Não conseguiria da mesma forma sem a presença de vocês!

Ao meu noivo, Rafael, por todo cuidado, amor, carinho e paciência nestes anos. Você é o maior incentivador que tenho na vida, aquele que me acalma nos momentos difíceis, me anima nos momentos desesperadores e me reconhece nos momentos de vitória! Seu apoio foi fundamental para finalizar esta etapa e sempre ter forças para seguir em frente!

Aos meus avós, Maria, Darcy e Leny, pelo amor e preocupação sempre! Apesar de não compreenderem bem minha pesquisa, sempre se mostraram interessados em meu bem estar pessoal e profissional!

Aos meus sogros, Maria Abadia e João Batista, pelo carinho de sempre! Minha sogra é uma grande amiga que me transmite paz e alegria! Nossas conversas sempre me deixam mais animada e confiante!

Aos meus cunhados, Raniel, Renato e Juliana, pelo incentivo diário, pelas conversas enriquecedoras e pelos desabafos nos momentos difíceis!

À princesa da minha vida, Maria Emília, que me alegra sempre! Uma criança que me acalma, que me transmite luz e serenidade! Quem me dera morar mais perto pra te ver crescer e curtir muito mais sua infância, escutar todo dia “Eu te amo dindinha”! Obrigada por tudo, boneca!

À minha orientadora, Dra. Karine Kavalco, e ao meu coorientador, Dr. Rubens Pasa, por todos os ensinamentos ao longo destes quase 12 anos trabalhando juntos! Considero-os como grandes amigos! Não tenho palavras para agradecer por tudo que fizeram por mim nestes anos, em especial e por ser mais recente, os esforços que não mediram para que eu conseguisse realizar o estágio na Universidade de Leicester! Vocês sabem como foi incrível esta experiência em minha vida! Muita gratidão por terem me acolhido em sua casa, junto com sua família, e me permitirem partilhar do trabalho que realizavam.

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar. Em especial a três amigos e que são futuros padrinhos, Renan, Rosana e Snaydia. Certamente, fazer pesquisa ao lado de vocês é maravilhoso! Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado, seja na bancada do laboratório, seja discutindo dados de tese pela internet... Vocês sempre fizeram meus dias mais felizes!

Aos professores, Dr. Pat Heslop-Harrison e Dra. Trude Schwarzacher, por auxiliarem nossos trabalhos e me receberem na Universidade de Leicester. Aproveito para agradecer também aos demais discentes e docentes deste laboratório e ao técnico Ramesh, pela paciência e atenção comigo nos dias de estágio, facilitando de muitas formas minha estadia em Leicester.

Ao meu coorientador, Dr. Jorge Dergam, pelo apoio, disponibilidade científica e de equipamentos em nossos trabalhos.

Aos colegas que conheci no Beagle, que sempre foram muito prestativos: Manuela, Natália, Lorene, Késsia, Mariane, Marina, me auxiliando quando precisei realizar análises em Viçosa.

Ao Dr. Fabiano Menegidio, que me ensinou a admirar a Bioinformática e que nos auxiliou enormemente nas análises de dados.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar e por contribuírem de forma enriquecedora com nosso trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia por toda estrutura e suporte para realização dos trabalhos científicos. Agradeço também à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, na pessoa do Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes, e à diretoria do *Campus* de Rio Paranaíba, na pessoa do Dr. Renato Ruas, por auxiliarem na viabilização de meu estágio no exterior.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ecologia, Dr. Ricardo Campos, e à secretária Letícia Carvalho, por sempre me auxiliarem na resolução das inúmeras dúvidas e processos acadêmicos.

À Alexandra Elbakyan, por promover Ciência Livre com o SciHub, facilitando nosso acesso ao conhecimento científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aqueles que de alguma forma, contribuíram para que fosse possível a conclusão deste trabalho!

A todos vocês, deixo o meu mais sincero,

Muito obrigada!

“A História está repleta de pessoas que, como resultado do medo, ou por ignorância, ou por cobiça de poder, destruíram conhecimentos de imensurável valor que, em verdade, pertenciam a todos nós. Nós não devemos deixar isso acontecer de novo”

Carl Sagan

RESUMO

REIS, Dinaíza Abadia Rocha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Contribuições da genômica em estudos evolutivos no complexo de espécies crípticas *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae)**. Orientadora: Karine Frehner Kavalco. Coorientadores: Rubens Pasa e Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Os cascudos são peixes pertencentes à família Loricariidae que apresentam distribuição em toda região Neotropical. *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae: Hypostominae) é considerado um complexo de espécies crípticas, visto que diversos morfotipos já foram encontrados em diferentes bacias em toda sua área de distribuição, em especial na bacia do Alto rio Paraná. Este complexo de espécies possui representantes com variações relacionadas à morfologia e principalmente, à macroestrutura cariotípica. São observados polimorfismos quanto ao número diploide, fórmulas cariotípicas, localização de genes ribossomais e presença de sistemas cromossômicos sexuais. Uma população do rio Paranapanema, *Hypostomus* aff. *ancistroides*, apresenta características peculiares: número cromossômico reduzido, pequenas diferenças morfológicas, monofiletismo quando comparada às outras populações e ainda, a existência de um sistema cromossômico sexual simples único para o grupo, o que sugere tratar-se de um novo táxon. O objetivo deste trabalho foi investigar, sob uma abordagem evolutiva e utilizando ferramentas da genômica, as características que distinguem duas espécies do complexo de espécies crípticas “*Hypostomus ancistroides*” (*Hypostomus* aff. *ancistroides* e *Hypostomys ancistroides*). Os objetivos específicos foram identificar e comparar os genomas mitocondriais completos, os padrões de metilação de DNA e os satelitomas das duas espécies, assim como validar e identificar fisicamente os DNAs satélites encontrados. Os genomas mitocondriais apresentaram organização semelhante aos dados disponíveis para peixes e vertebrados, entretanto, a região D-loop em *H. ancistroides* é composta por 321 pb a mais que *H. aff. ancistroides*. Além disso, a topologia da árvore filogenética utilizando os 13 genes codificadores de proteínas mostra localização em ramos diferentes das duas espécies, refletindo a diferenciação entre elas. Foram observadas diferenças no número de sequências repetitivas entre os satelitomas, sendo muitas destas exclusivas de cada espécie. Na hibridação com satDNAs, alguns hibridaram nas duas espécies e outros apresentaram-se como espécie-específicos. Não foram encontrados sítios em nenhum dos cromossomos sexuais, provavelmente por serem compostos em grande parte por eucromatina. Quanto ao padrão de metilação do DNA, *H. ancistroides* apresentou relação entre regiões compostas por heterocromatina e metiladas. Já indivíduos de *H. aff. ancistroides*, demonstraram marcações

positivas por quase todos os cromossomos do complemento, com o macho apresentando padrão mais hipermetilado. Os cromossomos X e Y foram identificados como praticamente metilados, sugerindo inativação de genes. Com base em todos os dados apresentados, reforça-se que *H. aff ancistroides* é uma nova espécie do complexo, pois apresenta diferenças morfológicas, citogenéticas, moleculares, mitocondriais e genômicas em relação à *H. ancistroides*, sendo necessário ser formalmente descrita e nomeada como uma espécie taxonomicamente válida.

Palavras-chave: Cascudo. DNA repetitivo. Evolução. Metilação. Mitogenoma. Satelitoma.

ABSTRACT

REIS, Dinaíza Abadia Rocha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Contributions of genomics in evolutionary studies in the cryptic species complex *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae)**. Adviser: Karine Frehner Kavalco. Co-advisers: Rubens Pasa and Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Armoured catfishes are fish belonging to the Loricariidae family that are distributed throughout the Neotropical region. *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae: Hypostominae) is considered a complex of cryptic species, since several morphotypes have already been found in different basins throughout their range, especially in the Upper Paraná River basin. This species complex has representatives with variations related to morphology and mainly, to the karyotype macrostructure. Polymorphisms are observed in terms of diploid number, karyotype formulas, location of ribosomal genes and presence of sex chromosome systems. A population of the Paranapanema river, *Hypostomus* aff. *ancistroides*, has peculiar characteristics: reduced chromosome number, small morphological differences, monophyletism when compared to other populations, and the existence of a simple sexual chromosome system unique to the group, which suggests that it is a new taxon. The aim of this work was to investigate, under an evolutionary approach and using genomic tools, the characteristics that distinguish two species from the cryptic species complex “*Hypostomus ancistroides*” (*Hypostomus* aff. *ancistroides* and *Hypostomys ancistroides*). The specific objectives were to identify and compare the complete mitochondrial genomes, the DNA methylation patterns and the two species satellites, as well as to validate and physically identify the satellite DNAs found. The mitochondrial genomes showed an organization similar to the available data for fish and vertebrates, however, the D-loop region in *H. ancistroides* is made up of 321 bp more than *H. aff. ancistroides*. In addition, the topology of the phylogenetic tree using the 13 protein-coding genes shows location in different branches of the two species, reflecting the differentiation between them. Differences in the number of repetitive sequences were observed between satellitomas, many of which are unique to each species. In the hybridization with satDNAs, some hybridized in the two species and others presented themselves as species-specific. No sites were found on any of the sex chromosomes, probably because they are largely composed of euchromatin. As for the DNA methylation pattern, *H. ancistroides* showed a relationship between heterochromatin and methylation regions. *H. aff. ancistroides*, showed positive markings on almost all complement chromosomes, with the male showing a more hypermethylated pattern. The X and Y chromosomes were identified as practically methylated, suggesting inactivation of genes. Based

on all the data presented, it is reinforced that *H. aff ancistroides* is a new species of the complex, as it presents morphological, cytogenetic, molecular, mitochondrial and genomic differences in relation to *H. ancistroides*, being necessary to be formally described and named as a taxonomically valid species.

Keywords: Armoured catfish. Evolution. Methylation. Mitogenome. Repetitive DNA. Satelitome.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Objetivos	23
1.2 Referências	24
2 CHAPTER I – The complete mitochondrial genome of two species of armoured catfish, genus <i>Hypostomus</i> (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae)*.....	33
2.1 Introduction.....	35
2.2 Materials and Methods.....	36
2.2.1 <i>Specimen collection and DNA extraction.....</i>	36
2.2.3 <i>Phylogenetic analysis.....</i>	37
2.3 Results and Discussion.....	38
2.3.1 <i>Organization of mitochondrial genomes.....</i>	38
2.3.2 <i>Protein-Coding Genes (PCGs).....</i>	38
2.3.3 <i>Ribosomal and transfer RNA genes</i>	39
2.3.4 <i>Non-coding region.....</i>	40
2.3.5 <i>Phylogenetic analysis.....</i>	41
2.4 References.....	43
3 CAPÍTULO II – Satelitomas e cross-amplificação de satDNAs em duas espécies do complexo <i>Hypostomus ancistroides</i> (Siluriformes, Loricariidae)	47
3.1 Introdução	49
3.2 Material e Métodos	50
3.2.1 <i>Amostragem, preparações cromossômicas e extração de DNA</i>	50
3.2.2 <i>Obtenção, isolamento e amplificação de satDNAs</i>	51
3.2.3 <i>Marcação das sondas e Hibridação in situ Fluorescente.....</i>	52
3.3 Resultados e Discussão	53
3.3.1 <i>Descrição dos satelitomas nas duas espécies</i>	53

3.3.2 Hibridação de sequências de satDNA.....	54
3.4 Referências	63
4 CAPÍTULO III – Diferentes padrões de metilação de DNA em duas espécies do complexo <i>Hypostomus ancistroides</i> (Siluriformes, Loricariidae)	67
4.1 Introdução	69
4.2 Material e Métodos	70
4.2.1 Locais de coleta e amostragem	70
4.2.2 Preparações cromossômicas e técnicas citogenéticas.....	70
4.2.3 Imunocoloração de anti-5-metilcitosina (anti-5-MeC).....	71
4.3 Resultados.....	72
4.4 Discussão.....	74
4.5 Referências	78
5 CONCLUSÕES GERAIS	81
6 ANEXOS	82
6.1 ANEXO A/ATTACHMENT A	82
6.2 ATTACHMENT B.....	83
6.3 ANEXO C	85
6.4 ANEXO D	96
6.5 ANEXO E	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

O rio Paraná é formado pela confluência dos rios Paranaíba e Grande, sendo o principal curso d'água da bacia do Prata e o segundo maior em extensão na América do Sul (AGOSTINHO, JÚLIO Jr., 1999). São 3.809 km desde sua nascente, na Serra da Mata da Corda (MG), até desaguar no rio da Prata, na altura da foz do rio Uruguai (AGOSTINHO, JÚLIO Jr., 1999). É dividido em trechos, sendo o superior, alto e parte do médio localizados em território brasileiro (PAIVA FILHO, 1982).

A bacia do Alto rio Paraná (Figura 1) inclui toda a drenagem do rio Paraná à montante do Reservatório de Itaipu (BONETTO, 1986; BRITSKI, LANGEANI, 1988), abrangendo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás (SOUZA-FILHO, STEVAUX, 1997). Drena uma área de 891.000 km² (AGOSTINHO, JÚLIO Jr., 1999), onde são encontrados tributários de grande porte, como Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema (CASTRO *et al.*, 2003). Este sistema de drenagens possui o maior número de estudos em peixes de água doce no Brasil (AGOSTINHO *et al.*, 2007), apesar do conhecimento ainda ser insuficiente (VICENTIN *et al.*, 2019) em relação à diversidade ictiofaunística possivelmente existente.

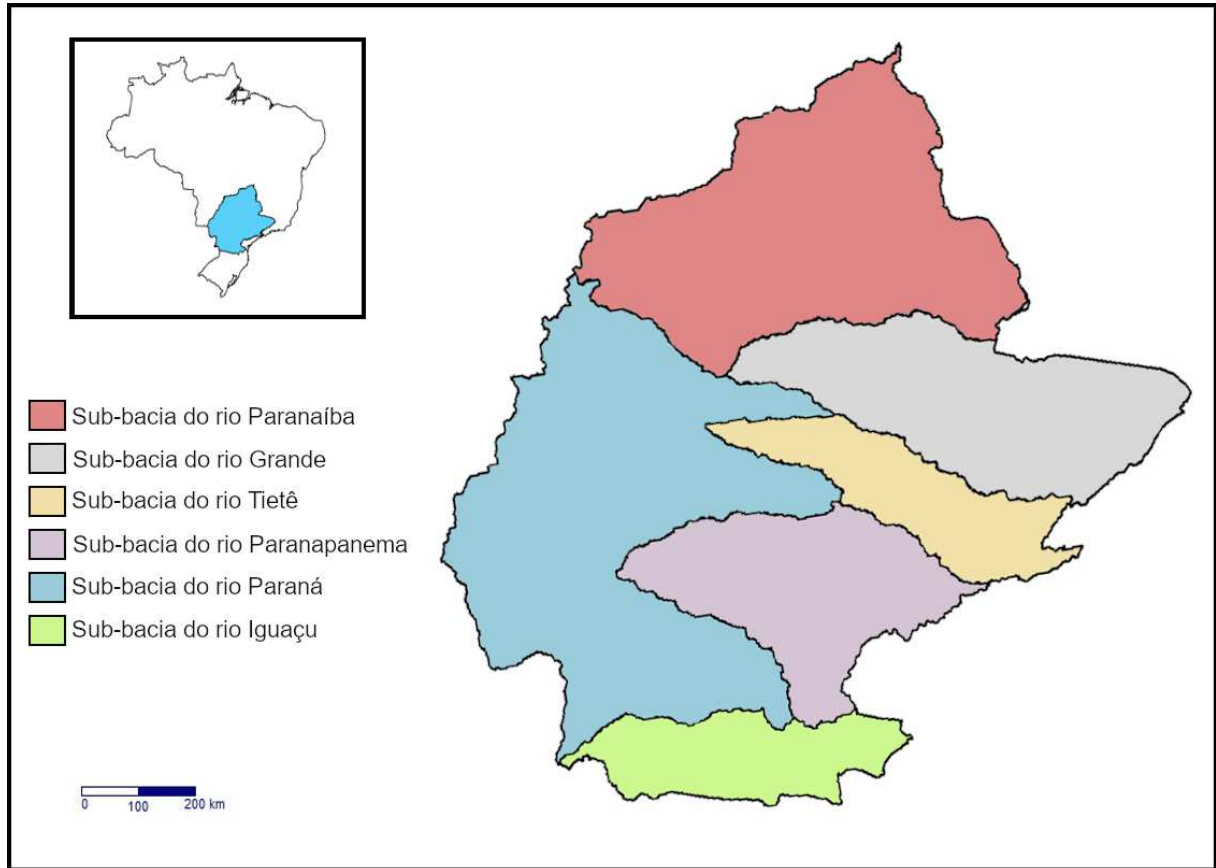
Segundo Ab'Saber (1998), esta bacia é considerada uma área complexa pelas atividades tectônicas ocorridas desde o Terciário. A configuração geológica atual é resultado de um soerguimento de terras que separou os rios das bacias costeiras, que drenam para o Oceano Atlântico, dos rios que correm para o interior do continente (OYAKAWA *et al.*, 2006). Além disso, existem muitos eventos de captura de cabeceiras, como descrito por Castro *et al.* (2003) para os rios Tietê e Paranaíba do Sul. Desta forma, a região do Alto rio Paraná é uma área com história complexa (LANGEANI *et al.*, 2007), onde é possível observar evidente endemismo de peixes (CASTRO *et al.*, 2005).

O grupo “peixes” apresenta grande diversidade, com 35.401 espécies válidas reconhecidas atualmente (FRICKE *et al.*, 2020a). O Brasil é beneficiado por possuir as maiores redes hidrográficas da região Neotropical (STEVAUX *et al.*, 1997), conhecida por ser a região com maior diversificação de ictiofauna de água doce do mundo (LOWE-MCCONNELL, 1999).

A diversidade da comunidade de peixes pode se modificar conforme os trechos de um rio devido processos históricos e evolutivos, resultantes de pressões seletivas para cada espécie (MARTIN-SMITH, 1998; MEADOR, GOLDESTEIN, 2003). Assim, a investigação de

populações naturais de cursos d'água auxilia no conhecimento biológico, ecológico e evolutivo dos organismos.

Figura 1: Bacia do Alto Rio Paraná dividida em suas sub-bacias.



Fonte: SUDERHSA (2007) – editado pela autora.

Loricariidae é a maior família da ordem Siluriformes e uma das maiores famílias de peixes do mundo (NELSON, 2006). Esta família é subdividida em subfamílias, onde está inserida Hypostominae com 483 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2020a) e seus representantes, conhecidos popularmente como cascudos, apresentam grande variação quanto à coloração e morfologia externa (OYAKAWA *et al.*, 2005). Estes peixes, normalmente restritos à água doce, permanecem entre pedras e galhos durante o dia, iniciando seu forrageamento com o pôr do sol (WEBER, 2003).

Do ponto de vista cariotípico, Hypostominae apresenta o maior número de estudos, com espécies que variam de 38 cromossomos (*Ancistrus* sp., ALVES *et al.*, 2003) a 84 cromossomos (*Hypostomus* sp. 2, CEREALI *et al.*, 2008). São reconhecidas cinco tribos monofiléticas pertencentes à esta subfamília: Corymbophanini, Rhinelepini, Pterygoplichthyini, Ancistrini e Hypostomini (ARMBRUSTER, 2004).

A tribo Hypostomini apresenta um único gênero, *Hypostomus* (REIS *et al.*, 2003), considerado o mais abundante gênero de cascudos nos rios brasileiros (BRITSKI, 1972). Estes animais alimentam-se de algas, sedimentos e detritos (HANH *et al.*, 2004), e possuem adaptações para aquisição e processamentos destes recursos, como a boca em forma de ventosa, os dentes raspadores e o longo intestino (DELARIVA, AGOSTINHO, 2001). Sua distribuição geográfica é ampla e apresentam comportamento pouco migratório, o que facilita a formação de populações isoladas (ALVES *et al.*, 2005; BICKFFORD *et al.*, 2007).

Hypostomus apresenta o maior número de espécies cariotipadas na subfamília Hypostominae, mas há inconsistências quanto ao menor número diploide encontrado. Muramoto *et al.* (1968) descreve *Hypostomus plecostomus* com 54 cromossomos, entretanto análises moleculares utilizando genes nucleares e mitocondriais (ROCHA-REIS *et al.*, submetido)¹ sugerem que esta espécie pode estar erroneamente identificada, visto que agrupou-se com o *outgroup*, *Pterygoplichthys* (tribo Pterygoplichthyni), e que há descrições de *H. prope plecostomus* e *H. cf. plecostomus* (ALVES *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015, respectivamente) com 68 cromossomos. Desta forma, o menor número diploide encontrado seria 64 cromossomos, em *H. faveolus* (BUENO *et al.*, 2013), *H. cochliodon* (BUENO *et al.*, 2013; RUBERT *et al.*, 2016), *H. aff. cochliodon* (BECKER *et al.*, 2014), entre outros *Hypostomus* spp. (ARTONI *et al.*, 1998; MILHOMEM *et al.*, 2010). Já o maior número diploide encontrado é 84 cromossomos, descrito para *Hypostomus perdido* por Cereali *et al.* (2008).

A ampla variação existente sugere que o gênero seja composto por alguns grupos monofiléticos (ALVES *et al.*, 2006; ARMBRUSTER, 2004; MONTOYA-BURGOS, 2003; MULLER, WEBER, 1992; ZAWADZKI *et al.*, 2004). Rocha-Reis *et al.* (submetido)¹ sugere a existência de pelo menos dois grupos monofiléticos em *Hypostomus*, baseados no número diploide: o primeiro, formado por espécies que apresentem 64-68 cromossomos, e o segundo, formado por 72-84 cromossomos, sendo os arranjos Robertsonianos (fissões cêntricas e inversões pericêntricas) os responsáveis por esta diversidade, já que desempenham importante papel na evolução destes loricariídeos (ARTONI, BERTOLLO, 1996).

¹ High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from the Paraná River basin, de autoria de Rocha-Reis, D. A.; Pasa, R.; Kavalco, K. F. Submetido ao jornal científico periódico Organims Diversity and Evolution.

***Hypostomus ancistroides*: um complexo de espécies**

Por definição, complexos de espécies crípticas são grupos de duas ou mais espécies classificadas como apenas uma (BICKFORD *et al.*, 2007). Para que seja um complexo, deve haver isolamento reprodutivo intraespecífico, seja pré-zigótico, como incompatibilidade gamética e/ou isolamento reprodutivo (MIYATAKE, SHIMIZU, 1999; LANDRY *et al.*, 2003), ou pós-zigótica, como inviabilidade do híbrido e/ou seleção sexual contra híbridos (NOOR *et al.*, 2001; ORR, 1995; PRESGRAVES *et al.*, 2003). Em peixes, são descritos vários casos de complexos de espécies, como em *Astyanax scabrippinis* (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO, 1991), *Hoplias malabaricus* (BERTOLLO *et al.*, 1986; DERGAM, BERTOLLO, 1990), *Eigenmannia* (MOYSÉS *et al.*, 2010), *Serrasalmus rhombeus* (NAKAYAMA *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006), *Synbranchus* (FORESTI *et al.*, 1992; UTSUNOMIA, 2013), entre outros.

Hypostomus ancistroides Ihering (1911) (Figura 2) são peixes herbívoros, encontrados em trechos de igarapés (CASATTI *et al.*, 2001) e que possuem distribuição natural na bacia do Alto rio Paraná, bacia do rio Tietê e bacia do rio Ribeira de Iguape (FRICKE *et al.*, 2020b). Segundo Weber (2003), na bacia do alto rio Paraná existem cerca de 25 espécies de *Hypostomus*, o que indica uma complexa história evolutiva deste gênero nesta região. Desta forma, *H. ancistroides* seria um complexo de espécies, pois diferentes morfotipos já foram encontrados em diferentes bacias de sua área de distribuição (HOLLANDA CARVALHO, 2011), incluindo a região do Alto rio Paraná.

Além das pequenas variações morfológicas encontradas, existem diversas variações cariotípicas entre as populações de *H. ancistroides*. O número diploide comumente encontrado é de 68 cromossomos, embora tenham sido descritas populações com 66 cromossomos (MAURUTTO *et al.*, 2012; ROCHA-REIS *et al.*, 2018). A variação nas fórmulas cariotípicas é extrema, pois nenhuma das 19 populações já descritas apresentam fórmulas semelhantes, cada população possui uma específica (ALVES *et al.*, 2006, 2012; ARTONI, BERTOLLO 1996; BUENO *et al.* 2012; ENDO *et al.* 2012; FERNANDES *et al.* 2012; KAVALCO *et al.*, submetido², LARA KAMEI *et al.*, 2017; MAURUTTO *et al.*, 2012; PANSONATO-ALVES *et al.* 2013; ROCHA-REIS *et al.*, 2018; RUBERT *et al.* 2011; TRALDI *et al.* 2013). Observa-se também polimorfismos relacionados à número e localização de Regiões Organizadoras de Nucléolo, de DNAs ribossômicos como rDNA 5S e 18S, e padrões de heterocromatina

² Chromosomal Radiation: a model to explain karyotypic diversity in cryptic species, de autoria de KAVALCO, K. F.; ROCHA-REIS, D. A.; BRANDÃO, K. O.; DERGAM, J. A.; PASA, R. Submetido ao jornal científico periódico Heredity.

constitutiva (ROCHA-REIS *et al.*, submetido)³. Ainda são descritos dois casos de sistemas cromossômicos sexuais, um do tipo ZZ/ZW em uma população do rio Ivaí (LARA KAMEI *et al.*, 2017) e um do tipo XX/XY em uma população de do rio Paranapanema (ROCHA-REIS *et al.*, 2018)

Figura 2: Exemplar de *Hypostomus ancistroides* (LIRP 2716, 55,2 cm de comprimento padrão).



Fonte: CASATTI *et al.* (2005).

Esta população do rio Paranapanema, coletada nas proximidades do município de São Miguel Arcanjo/SP, foi descrita citogeneticamente por Rocha-Reis *et al.* (2018) e é composta de indivíduos identificados como *Hypostomus* aff. *ancistroides*, por apresentarem algumas diferenças morfológicas em relação à *H. ancistroides*. Os exemplares possuem 66 cromossomos, em contrapartida aos 68 comumente observados; apresentam sistema cromossômico sexual tipo XX/XY único para a espécie; e ainda possuem estruturação bem diferenciada com dados moleculares quando comparada com as demais populações de *Hypostomus*. Todas essas características indicam uma nova espécie dentro do complexo “*ancistroides*” (ROCHA-REIS *et al.*, 2018).

Genômica

A era genômica iniciou-se com a conclusão do Projeto Genoma Humano, onde buscou-se sequenciar quase a totalidade do DNA humano (VENTER *et al.*, 2001). Neste projeto, foram obtidos cerca de 3,2 bilhões de pares de bases e aproximadamente 30.000 genes (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001). Com o

³ High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from the Paraná River basin, de autoria de Rocha-Reis, D. A.; Pasa, R.; Kavalco, K. F. Submetido ao jornal científico periódico Organims Diversity and Evolution.

grande volume de informações, havia necessidade de ferramentas computacionais mais especializadas que fossem capazes de armazenar, organizar e analisar a grande quantidade de dados, buscando-se auxílio na Bioinformática (SMITH, 1998).

Atualmente, através do sequenciamento de genomas completos dos organismos e de análises computacionais são possíveis diversas abordagens, como montagem e anotação de genomas (Whole Genome Shotgun – WGS), estudos de mRNA e miRNAs através de cDNA (RAN-Seq), identificação de regiões mutadas ou divergentes em relação à uma sequência de referência (Análise de Variantes), Metagenômica, Transcriptômica, Proteômica, e ainda, estudos em Citogenômica. Neste último campo, busca-se detectar alterações genômicas e cromossômicas através de técnicas, como por exemplo, Hibridação *in situ* Fluorescente.

Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

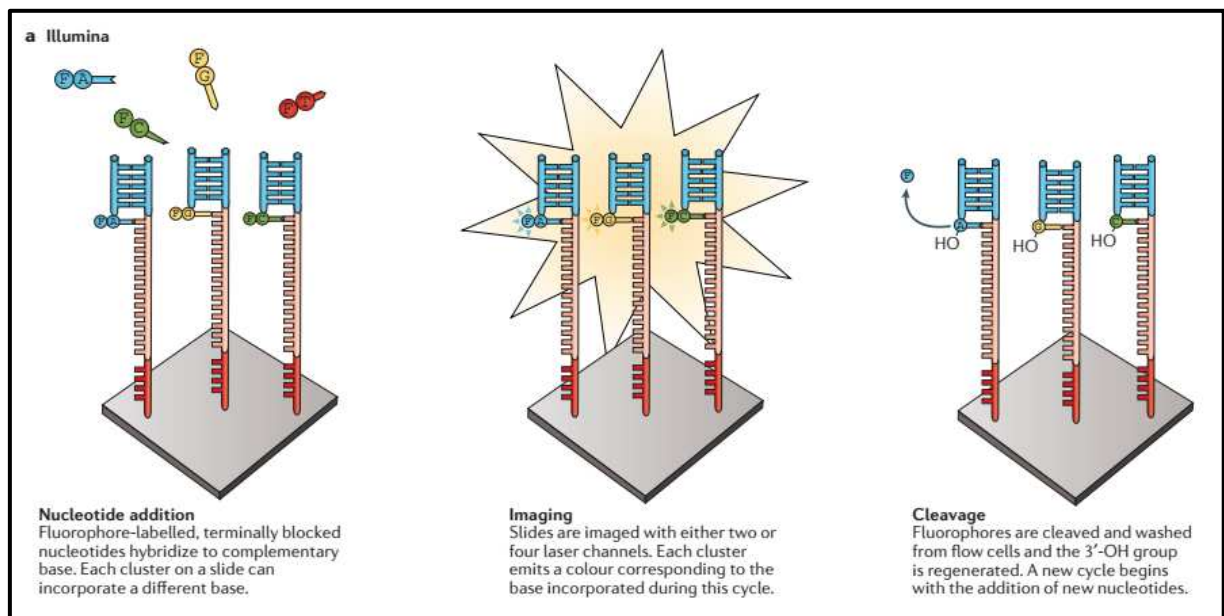
O Sequenciamento de Nova geração surgiu em meados dos anos 2000 pela necessidade de tecnologias alternativas e conjuntos de dados mais avançados para investigar questões biológicas mais complexas após o sequenciamento do genoma humano (GOODWIN *et al.*, 2016). A primeira plataforma de sequenciamento de alto rendimento produziu uma queda de 50.000 vezes no custo de sequenciamento do genoma, e por isso foi apelidado de Nova Geração (GOODWIN *et al.*, 2016).

Os sequenciamentos de leitura curta são divididos em duas categorias: aqueles que são feitos por ligação (Plataformas SOLiD, 454) e aqueles realizados por síntese (Plataformas Illumina, Ian Torrent). No sequenciamento por ligação, uma sequência sonda que está ligada a um fluoróforo irá hibridar com um fragmento de DNA, que serão ligados a um oligonucleotídeos adjacente para gerar imagens. A emissão de luz do fluoróforo que indicará a identidade das bases complementares às posições específicas dentro da sonda. Já no sequenciamento por síntese, é utilizada uma polimerase e o sinal emitido, seja por fluoróforos ou alterações na concentração iônica, identifica a incorporação da base na fita. Todas as abordagens incluem clivagem do DNA em fragmentos, ligação à adaptadores e amplificação, mas com estratégias diferentes (GOODWIN *et al.*, 2016; MARDIS, 2008; McCOMBIE *et al.*, 2019). O sequenciamento utilizando a plataforma Illumina (Figura 3) é o mais comumente utilizado. Este sistema de leituras curtas permite sequenciamento de “pequenas unidades de bancada de baixo rendimento a grandes instrumentos de ultra rendimento dedicados ao sequenciamento do genoma completo (WGS) a nível populacional” (GOODWIN *et al.*, 2016).

No Illumina, há o uso de uma estação de cluster microfluida onde os fragmentos de DNA são adicionados à superfície de uma célula de fluxo de vidro. Metodologicamente, este sistema

usa terminadores semelhantes àqueles do sequenciamento de Sanger, onde a extremidade 3'-OH da ribose é bloqueada. O fragmento de DNA é iniciado por uma sequência complementar a uma região adaptadora, que iniciará a ligação da polimerase. Em cada ciclo, quatro desoxiribonucleotídeos marcados diferentemente e com 3'-OH bloqueada são incorporados. Após a incorporação de um único desoxiribonucleotídeo que é complementar à cadeia alongada, é realizada a leitura onde identifica-se o nucleotídeo que foi incorporado em cada cluster da superfície. Após remoção do fluoróforo e do grupo de bloqueio, um novo ciclo pode se iniciar. No final de todo o processo, a sequência de cada cluster é calculada e passa por filtros de qualidade (GOODWIN *et al.*, 2016; MARDIS, 2008).

Figura 3: Sequenciamento por síntese utilizado pela Plataforma Illumina. Neste sistema, fluoróforos marcados com cores diferentes e com a extremidade 3'-OH bloqueada são adicionados na célula de fluxo, onde vão hibridar com a base complementar; em cada cluster pode ser incorporada uma base diferente (imagem à esquerda). A identificação das bases incorporadas é realizada através da leitura dos fluoróforos, possibilitada pela emissão de canais laser em cada cluster (imagem ao centro). Posteriormente, os fluoróforos são clivados e lavados da célula de fluxo, e desbloqueia-se a extremidade 3'-OH para iniciar um novo ciclo, onde serão adicionados novos nucleotídeos marcados (imagem à direita).



Fonte: GOODWIN *et al.* (2016).

Genoma mitocondrial

O genoma mitocondrial é uma molécula circular de cadeia dupla (BOORE, 1999). Em peixes, assim como em vertebrados, o tamanho varia de 16 a 20 kb de comprimento, e é formado por 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA, 12S e 16S, e uma região controle não codificante com sítios para iniciação de replicação e transcrição (SATOH *et al.*, 2016; TAANMAN, 1999).

A organização conservada deste genoma entre os vertebrados facilita o alinhamento e comparação entre as espécies, sendo usados em estudos de origem, evolução e relações entre os organismos (SACCONI *et al.*, 1999). Segundo Liu *et al.* (2019), diferenças nas estruturas de genomas mitocondriais podem refletir história evolutivas distintas em eucariotos, pois coevoluem de acordo com os organismos em que estão alojados (PENG *et al.*, 2006).

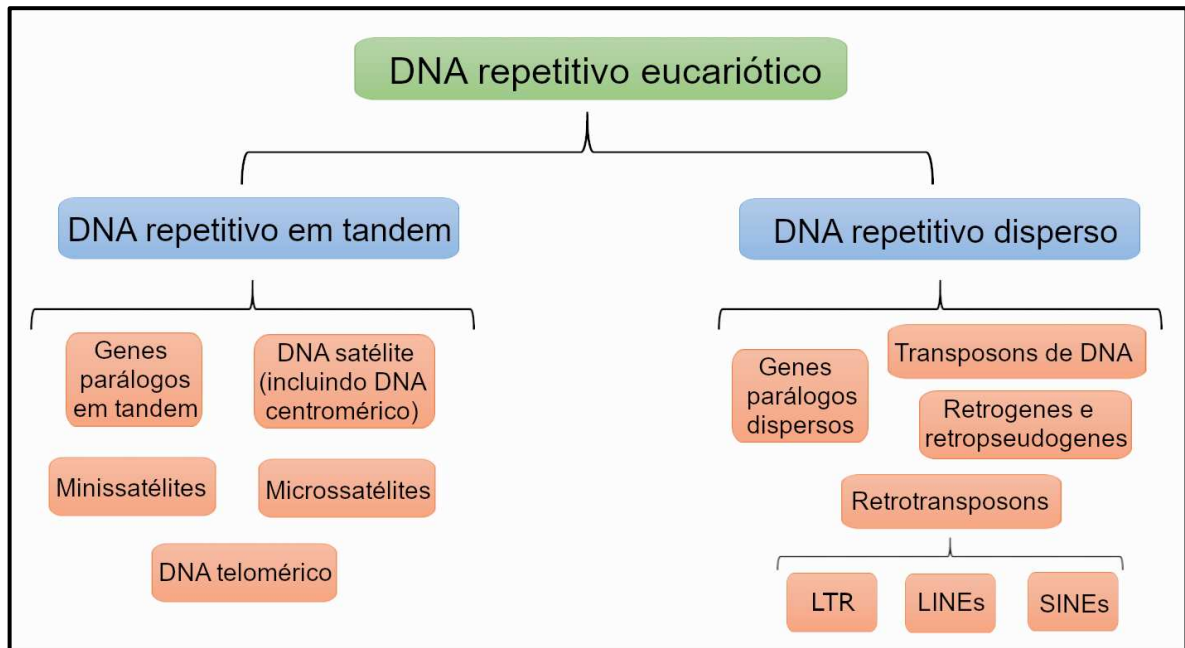
Apesar da diversidade de espécies presentes em Hypostominae, apenas duas espécies possuem o genoma mitocondrial completo sequenciado: *Hypostomus plecostomus* (LIU *et al.*, 2016) e *Hypostomus francisci* (PEREIRA *et al.*, 2019). Assim, a descrição de mitogenomas completos para diversos organismos torna-se necessária para que sejam possíveis comparações, buscando compreender as histórias evolutivas dos táxons.

DNA repetitivo

O DNA repetitivo eucariótico é dividido em duas principais classes: aqueles que estão organizados em tandem e aqueles que estão dispersos no genoma (Figura 4) (LÓPEZ-FLORES, GARRIDO-RAMOS, 2012). Na primeira classe, entre as repetições em tandem, existem os DNAs moderadamente repetitivos – RNAs ribossômicos, famílias de genes codificadores de proteínas, repetições teloméricas curtas –, e aqueles DNAs altamente repetitivos – DNAs microssatélites, minissatélites e satélites não codificantes, incluindo DNA centromérico. Já na segunda classe, entre os DNAs que estão dispersos no genoma, há retrogenes e retropseudogenes, famílias de genes compostas por membros dispersos (DNA moderadamente repetitivo), e elementos transponíveis (TEs). Estes elementos móveis, como transposons de DNA e retrotransposons, incluem repetições terminais longas (LTR) e elementos intercalados longos (LINEs) que são altamente repetitivos, e ainda, elementos intercalados curtos (SINEs), que são moderadamente repetitivos (LÓPEZ-FLORES, GARRIDO-RAMOS, 2012). O primeiro passo para análises de DNA repetitivo trata-se da identificação e classificação, realizadas por comparação com sequências de referências bem caracterizadas (JURKA *et al.*, 2005).

Figura 4: Classificação dos diferentes tipos de DNAs repetitivos em genomas eucarióticos.

De forma geral, as sequências repetitivas são divididas naquelas que estão dispostas em tandem ou naquelas que estão dispersas no genoma. Em cada classe, existem sequências altamente repetitivas (DNAs satélites, minissatélites, microssatélites, LTRs, LINEs) ou moderadamente repetitivas (famílias multigênicas em tandem - que incluem os RNAs ribossômicos -, sequências teloméricas curtas, SINEs).



LTR – Repetição Terminal Longa; LINEs – Elementos Intercalados Longos; SINEs – Elementos Intercalados Curtos.

Fonte: LÓPEZ-FLORES E GARRIDO-RAMOS (2012) – adaptado pela autora.

O termo DNA satélite (satDNA) tornou-se conhecido devido à aparência que estas sequências apresentaram após centrifugação em gradiente de densidade de alta velocidade do DNA. Como eram abundantes e possuíam conteúdo de bases diferente do restante do DNA, formaram-se bandas satélites, que foram extraídas e usadas em Híbridações *in situ* Fluorescente (FISH) para identificar suas localizações (BISCOTTI *et al.*, 2015; GALL, PARDUE, 1969; JOHN *et al.*, 1969).

Essa porção do genoma que não é codificante está localizada, na maioria das vezes, em regiões de heterocromatina, seja pericêntricas ou subteloméricas (BISTOTTI *et al.*, 2015; LÓPEZ-FLORES, GARRIDO-RAMOS, 2012), embora há casos de presença em regiões eucromáticas, como na mosca das frutas *Drosophila melanogaster* (KUHN *et al.*, 2012), no besouro castanho *Tribolium castaneum* (BRAJKOVIC *et al.*, 2012; PAVLEK *et al.*, 2015), no

gafanhoto migratório *Locusta migratoria*, (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016), no barbeiro *Triatoma infestans* (PITA *et al.*, 2017), entre outros.

Os satDNAs podem ser organizados em famílias, que apresentam variações quanto à sequência de bases, o tamanho do motivo de sequência que se repete, a abundância e sua localização no genoma (GARRIDO-RAMOS, 2017). Ainda segundo Garrido-Ramos (2017), existem algumas considerações acerca das distribuições destes conjuntos de satDNAs: diferentes famílias de satDNAs podem estar presentes em uma mesma espécie; espécies relacionadas podem compartilhar uma mesma biblioteca de satDNAs; espécies podem possuir famílias específicas de satDNA; e que os satDNAs podem representar ou nem sempre uma grande proporção do genoma.

Os dados sobre DNAs repetitivos em eucariotos são fragmentados, visto que na maioria das vezes são realizadas apenas subestimativas, onde a abundância total destas sequências nos genomas deve ser superior ao estimado (GARRIDO-RAMOS, 2017). Felizmente, com o Sequenciamento de Nova Geração é possível fazer abordagens mais concisas destes elementos repetitivos, estudando os satelitos. Este termo, proposto por Ruiz-Ruano *et al.* (2016) refere-se à toda coleção de diferentes famílias de satDNAs de um genoma, permitindo a análise comparativa intra e interespecífica, fornecendo informações sobre organização e evolução não apenas de satDNAs, mas também sobre questões cromossômicas.

Metilação do DNA

A epigenética é definida como mudanças hereditárias reversíveis na expressão gênica que ocorrem devido à alterações que não sejam na sequência primária do DNA (ESTELLER, 2008; SINGH *et al.*, 2013). Kaidery *et al.* (2013) define alguns mecanismos considerados epigenéticos, como metilação do DNA, modificação pós-transcricional das histonas (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação) e mecanismos baseados no RNA, como microRNA, RNA circular e RNA não codificante.

Em organismos eucariotos, a metilação de DNA é encontrada exclusivamente em resíduos de citosinas, tornando-se essencial no desenvolvimento embrionário de mamíferos como camundongos, que apresentam letalidade precoce com a ausência de DNA metiltransferases (DNMTs) (LI *et al.*, 1992; OKANO *et al.*, 1999). Os padrões de metilação encontrados são variáveis em eucariotos, onde são observados desde distribuição em mosaico, como em *Arabidopsis thaliana*, *Neurospora crassa*, *Apis mellifera* e *Ciona intestinalis*, até padrões considerados globais em vertebrados, como *Danio rerio*, *Xenopus laevis* e *Homo sapiens* (para revisão, SUZUKI, BIRD, 2008).

Em peixes, regiões metiladas nos genomas normalmente estão associadas à regiões de heterocromatina constitutiva, como descrito por Almeida-Toledo *et al.* (1998) e Schmid *et al.* (2015), sendo os padrões específicos de cada espécie (SCHMID *et al.*, 2015). Isso ocorre porque as regiões heterocromáticas são compostas por sequências de DNA repetitivo que diferem em quantidade, sequência e localização, onde é possível encontrar variações, visto que estas sequências não são submetidas à pressão seletiva (SCHMID *et al.*, 2015).

Bird e Wolffe (1999) destacam que a metilação de DNA em citosinas funciona, de forma geral, para manter o estado reprimido da cromatina, silenciando de maneira estável a atividade dos promotores, e assim, inibindo genes. Sendo um mediador do silenciamento transcrricional, a metilação possui potencial para modificar expressões gênicas que ocorrem durante o desenvolvimento dos organismos, variando significativamente de acordo como tipo de célula (SUZUKI, BIRD, 2008). Desta forma, para compreender qual a função das metilações no DNA, o primeiro passo é o conhecimento de sua distribuição no genoma das espécies (BIRD, 2002).

1.1 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi investigar, sob uma abordagem evolutiva, as características que distinguem duas espécies do complexo de espécies crípticas “*Hypostomus ancistroides*”, utilizando ferramentas da genômica e buscando possíveis variações entre as espécies que poderiam ser causa ou consequência das diferenças morfológicas, cariotípicas e moleculares encontradas entre *Hypostomus* aff. *ancistroides* e *Hypostomus ancistroides*.

Os objetivos específicos incluem a descrição e comparação dos genomas mitocondriais completos das duas espécies; a prospecção e descrição dos satelíomas de ambas, com posterior validação e localização física de DNAs satélites encontrados utilizando a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente; e por fim, a descrição dos padrões de metilação de DNA encontrados em cada uma dessas espécies do complexo.

1.2 Referências

- AB'SABER, N. A. Megageomorfologia do território brasileiro. *In*: CUNHA, S. B.; GUERRA, A. J. T. (eds.). **Geomorfologia do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertand Brasil, 1998. p. 71-106.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR., H. F. Peixes da bacia do Alto rio Paraná. *In*: LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-400.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007. 501 p.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; COUTINHO-BARBOSA, A. C.; FORESTI, F.; NIVELEAU, A.; DE ALMEIDA TOLEDO-FILHO, S. Localization of 5-methylcytosine in metaphase chromosomes of diploid and triploid pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 83, p. 21-24, 1998.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, p. 57-63, 2003.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; 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, p. 1-9, 2006.
- ALVES, A. L.; BORBA, R. S.; POZZOBON, A. P. B.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with discussion on the Ag-NOR evolution. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 315-321, 2012.
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 1-80, 2004.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v. 49, p. 81-90, 1996.
- ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, v. 63, p. 421-425, 1998.
- BECKER, Q. M. C.; CASTRO, R. J.; SILVA, A. M.; VIZZOTTO, P. C. Cytogenetic characterization of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) from tributaries of the Vermelho river, Upper Paraguayan river basin. **Biodiversidade**, v. 13, p. 2-13, 2014.

- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 153-159, 1986.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K.; MEIER, R.; WINKER, K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 148-155, 2007.
- BIRD, A.; WOLFFE, A. P. Methylation-induced repression - Belts, braces and chromatin. **Cell**, v. 99, p. 451-454, 1999.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, p. 6-21, 2002.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420, 2015.
- BONETTO, A. A. The Paraná river system. In: DAVIES, B. R.; WALKER, K. F. (eds.). **The ecology of river systems**. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1986. p. 541-555.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 1767-1780, 1999.
- BRAJKOVIĆ, J.; FELICIELLO, I.; BRUVO-MADARIĆ, B.; UGARKOVIĆ, D. Satellite DNA-like elements associated with genes within euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 2, p. 931-941, 2012.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo: Instituto de Pesca da Coordenadoria da Pesquisa de Recursos Naturais da Secretaria da Agricultura, 1972. p. 79-108.
- BRITSKI, H. A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*, sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, p. 409-417, 1988.
- BUENO, V.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 241-250, 2012.
- BUENO, V.; VENERE, P. C.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 103-112, 2013.
- CASATTI, L.; LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto rio Paraná, SP. **Biota Neotropica**, v. 1, p. 1-15, 2001.
- CASATTI, L.; ROCHA, F. C.; PEREIRA, D. C. Habitat use by two species of *Hypostomus* (Pisces, Loricariidae) in southeastern Brazilian streams. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 157-165, 2005.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; FERREIRA, K. M.; RIBEIRO, A. C.; BENINE, R. C.; DARDIS, G. Z. P.; MELO, A. L. A.; STOPIGLIA, R.; ABREU, T. X.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F. Z.; LIMA, F. C. T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. **Biota Neotropica** v. 3, p. 1-14, 2003.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; VARI, R. P.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; ABREU, T. X.; BENINE, R. C.; GIBRAN, F. Z.; RIBEIRO, A. C.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; PELIÇÃO, G. Z. P.; FERREIRA, K. M.; STOPIGLIA, R.; AKAMA, A. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary Rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 16, p. 193-214, 2005.

CEREALI, S.S.; POMINI, E.; ROSA, R.; ZAWADZKI, C. H.; FROEHLICH, O.; GIULIANO-CAETANO, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 583-591, 2008.

DELARIVA, R. L.; AGOSTINHO, A. A. Relationship between morphology and diets of six neotropical loricariids. **Journal of Fish Biology**, v. 58, p. 832-847, 2001.

DERGAM, J. A.; BERTOLLO, L. A. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 13, p. 755-766, 1990.

ENDO, K. S.; MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; PAIVA, L. R. S.; JÚLIO JÚNIOR, H. F. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum – Biological Sciences**, v. 34, p. 181-189, 2012.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1148-1159, 2008.

FERNANDES, C. A.; DAMÁSIO, J. F.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in species of family Loricariidae (Osteichthyes, Siluriformes) from Iguatemi river basin, Brazil. First cytogenetic report in *Farlowella amazonum* (Günther, 1864). **Caryologia**, v. 65, p. 276-280, 2012.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; TIEN, O. S. Cytogenetic studies of the genus *Synbranchus* (Pisces, Synbranchiformes, Synbranchidae). **Naturalia**, v. 17, p. 129-138, 1992.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Eschmeyer's Catalog of Fishes: species by Family/Subfamily**. 2020a. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em 22 jan 2020.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. 2020b. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso em 22 jan 2020.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 63, p. 378–383, 1969.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An evolving topic. **Genes**, v. 8, p. E230, 2017.

GOODWIN, S.; McPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 333-351, 2016.

HAHN, N. S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I. F. Trophic ecology of the fish assemblages. *In*: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (eds.). **The Upper Paraná river and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 247-269.

HOLLANDA CARVALHO, P. H. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

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

JOHN, H. A.; BIRNSTIEL, M. L.; JONES, K. W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature**, v. 223, p. 582-587, 1969.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 462–467, 2005.

KAIDERY, N. A.; TARANNUM, S.; THOMAS, B. Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities. **Neurotherapeutics**, v. 10, p. 698-708, 2013.

KUHN, G. S. C.; KÜTTLER, H.; MOREIRA-FILHO, O.; HESLOP-HARRISON, J. S. The 1.688 Repetitive DNA of *Drosophila*: Concerted Evolution at Different Genomic Scales and Association with Genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 7–11, 2012.

LANDRY, C.; GEYER, L. B.; ARAKAK, Y.; UEHARA, T.; PALUMBI, S. R. Recent speciation in the indowest Pacific: Rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. **Proceeding of the Royal Society**, v. 270, p. 1839–1847, 2003.

LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 75-78, 2007.

LARA KAMEI, M. C. D. S.; BAUMGÄRTNER, L.; PAIVA, S.; ZAWADZKI, C. H.; MARTINS-SANTOS, I. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. D. B. Chromosomal diversity of three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River

Basin, Brazil: a species complex in *Hypostomus ancistroides* reinforced by a ZZ/ZW sex chromosome system. **Zebrafish**, v. 14, p. 357-363, 2017.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, p. 915–926, 1992.

LIU, S.; ZHANG, J.; YAO, J.; LIU, Z. The complete mitochondrial genome of the armored catfish, *Hypostomus plecostomus* (Siluriformes: Loricariidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, p. 1908-1909, 2016.

LIU, Y.; WU, P. D.; ZHANG, D. Z.; ZHANG, H. B.; TANG, B. P.; LIU, Q. N.; DAI, L. S. Mitochondrial genome of the yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and insights into Bagridae phylogenetics. **Genomics**, v. 111, p. 1258-1265, 2019.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: GARRIDO-RAMOS, M. A. (ed.). **Repetitive DNA**. Basel: Karger Publishers, 2012. p. 1–28.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. 534 p.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, p. 133-141, 2008.

MARTIN-SMITH, K. M. Relationships between fishes and habitat in rainforest streams in Sabah, Malaysia. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 458-482, 1998.

MAURUTTO, F. A. M.; MANVAILER, L. F. S.; SCZEPANSKI, T. S.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**, v. 65, p. 340-346, 2012.

McCOMBIE, W. R.; MCPHERSON, J. D.; MARDIS, E. R. Next-generation sequencing technologies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, p. a036798, 2019.

MEADOR, M. R.; GOLDSTEIN, R. M. Assessing water quality at large geographic scales: relations among land use, water physicochemistry, riparian condition, and fish community structure. **Environmental Management**, v. 31, p. 504-517, 2003.

MILHOMEM, S.; CASTRO, R.; NAGAMACHI, C.; DE SOUZA, A.; FELDBERG, E.; PIECZARKA, J. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comparative Cytogenetics**, v. 4, p. 45-54, 2010.

MIYATAKE, T.; SHIMIZU, T. Genetic correlations between life-history and behavioral traits can cause reproductive isolation. **Evolution**, v. 53, p. 201-208, 1999.

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855-1867, 2003.

- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 331-357, 1991.
- MOYSÉS, C. B.; DANIEL-SILVA, M. F.; LOPES, C. E.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Cytotype-specific ISSR profiles and karyotypes in the Neotropical genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Genetica**, v. 138, p. 179-189, 2010.
- MULLER, S.; WEBER, C. Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 99, p. 747-754, 1992.
- MURAMOTO, J. I.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, v. 24, p. 59-66, 1968.
- NAKAYAMA, C.; JÉGU, M.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, v. 3, p. 866-869, 2001.
- NELSON, S. J. **Fishes of the world**. New York; John Wiley e Sons, 4rd edition, 2006. 624 p.
- NOOR, M. A. F.; GRAMS, K. L.; BERTUCCI, L. A.; REILAND, J. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 12084-12088, 2001.
- OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247-257, 1999.
- OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, M. O.; DUTRA, E. S.; ZAWADZKI, C. H.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 6625-6634, 2015.
- ORR, H. A. The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. **Genetics**, v. 139, p. 1805-1813, 1995.
- OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v. 921, p. 1-27, 2005.
- OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. **Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo**. São Paulo, BRA: Editora Neotrópica, 2006. 201 p.
- PAIVA FILHO, A. M. **Estudo sobre a ictiofauna do Canal dos Barreiros, Estuário de São Vicente, SP**. Tese (Livre Docência) - Instituto de Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1982.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; SERRANO, E. A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of

Hypostomus (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 477-489, 2013.

PAVLEK, M.; GELFAND, Y.; PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N. Genome wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. **DNA Research**, v. 22, p. 387-401, 2015.

PENG, Z. G.; WANG, J.; HE, S. P. The complete mitochondrial genome of the helmet catfish *Cranoglanis boudierius* (Siluriformes: Cranoglanididae) and the phylogeny of otophysan fishes, **Gene**, v. 376, p. 290-297, 2006.

PEREIRA, A. H.; FACCHIN, S.; OLIVEIRA DO CARMO, A.; NÚÑEZ RODRIGUEZ, D.; CARDOSO RESENDE, L.; KALAPOTHAKIS, Y.; FERREIRA PINTO, P. B. D.; ALVES, C. B. M.; ZAWADZKI, C. H.; KALAPOTHAKIS, E. Complete mitochondrial genome sequence of *Hypostomus francisci* (Siluriformes: Loricariidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, p. 155-157, 2019.

PITA, S.; PANZERA, F.; MORA, P.; VELA, J.; CUADRADO, Á.; SÁNCHEZ, A.; PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. **PLoS ONE**, v. 12, p. e0181635, 2017.

PRESGRAVES, D. C.; BALAGOPALAN, L.; ABMAYR, S. M.; ORR, H. A. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. **Nature**, v. 423, p. 715-719, 2003.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre; Edipucrs, 2003. 729 p.

ROCHA-REIS, D. A.; de OLIVEIRA BRANDÃO, K.; de ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. The persevering cytotaxonomy: discovery of a unique XX/XY sex chromosome system in catfishes suggests the existence of a new, endemic and rare species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 156, p. 45-55, 2018.

RUBERT, M.; DA ROSA, R.; JEREP, F. C.; BERTOLLO, L. A.; GIULIANOCAETANO, L. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**, v. 5: p. 397–410, 2011.

RUBERT, M.; DA ROSA, R.; ZAWADZKI, C. H.; MARIOTTO, S.; MOREIRA-FILHO, O.; GIULIANO-CAETANO, L. Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): diversity analysis of the sites. **Zebrafish**, v. 13, p. 360-368, 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 – Nature**, v. 6, p. 28333, 2016.

SACCONE, C.; DE GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, p. 195-209, 1999.

SATOH, T. P.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; NISHIDA, M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMC Genomics**, v. 17, p. 719, 2016.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; YANO, C. F.; CIOFFI, M. B. Hypermethylated chromosome regions in nine fish species with heteromorphic sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 147, p. 169-178, 2015.

SINGH, V.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. DNA Metyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 13, p. 379-399, 2013.

SMITH, T. F. Functional genomics – bioinformatics is ready for the challenge. **Trends in Genetics**, v. 14, p. 291-293, 1998.

SOUZA FILHO, E. E.; STEVAUX, J. C. Geologia e geomorfologia do complexo rio Baía, Curutuba, Ivinheima. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (eds.). **A Planície de inundação do Alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: Eduem, 1997. p. 3-46.

STEVAUX, J. C.; SOUZA-FILHO, E. E.; JABUR, I. C. A história quaternária do rio Paraná em seu alto curso. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (eds.). **A Planície de inundação do Alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: Eduem, 1997. p. 47-72

SUDERHSA. Mapas das Bacias Hidrográficas do Paraná. 2007. Disponível em: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=80>. Acesso em 13 jan 2020.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 465-476, 2008.

TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1410, p. 103–123, 1999.

TEIXEIRA, A. S.; NAKAYAMA, C. M.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766) from Lake Catalão. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 498-502, 2006.

TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J. F.; LUI, R. L.; BARROS, A. V.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 463-471, 2013.

UTSUNOMIA, R. **Estrutura cromossômica e caracterização cariotípica no complexo de espécies *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchiformes, Synbranchidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2013.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p. 1304-1351, 2001.

VICENTIN, W.; FERREIRA, F. S.; SÚAREZ, Y. R. Ichthyofauna of lotic environments in the Ivinhema river basin, upper Paraná river, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 19, p. e20190735, 2019.

WEBER, C. Subfamily Hypostominae. *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (eds.). **Ccheck list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p 351-372.

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; PAIVA, S.; LARA-KAMEI, M. C. S. Allozyme differentiations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetica**, v. 121, p. 251–257, 2004.

2 CHAPTER I – The complete mitochondrial genome of two species of armoured catfish, genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae)*

Dinaíza Abadia Rocha-Reis, Rubens Pasa, Fabiano Bezerra Menegídio, John Seymour (Pat)
Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher, Karine Frehner Kavalco

ABSTRACT

Mitochondrial DNA can be very useful for phylogenetic studies, biological and genetic identification of populations. The genus *Hypostomus* is considered the dominant fish in Brazilian rivers and has a substantial morphological and genetic variety. Here we describe the mitochondrial genome of two *Hypostomus* species, *H. ancistroides* and *H. aff. ancistroides*. We also performed Bayesian inference to elucidate the phylogenetic positioning of these species, since the last is morphologically similar to *H. ancistroides*, but presents very distinct karyotype data, characterized by a lower chromosomal number and the presence of an XY sexual chromosomal system. The whole-genome sequencing was performed in a Novaseq 6000 by Illumina and for the assembly of the mitogenome we used Novoplast software. Bayesian inference was performed with the addition of four Hypostominae and one Hypoptopomatinae species as outgroup. The organization of both mitogenomes was similar to that reported for fish and metazoans, ranging from 16.5 to 16.8 kb, with 13 PCGs, 22 tRNAs and 2 rRNAs. We found size variation in the non-coding region (D-loop), which was responsible for the total size variation. We attributed this increase (321 bp) to possible sequence duplications in this region. The topology of the phylogenetic tree presents the grouping of Hypostominae representatives, but with *Pterygoplichthys* as the sister group of *H. 33lecostomus* and *H. ancistroides*, which may be due to sequence analogy or just sampling tendency. By contrast, the position of *H. aff. ancistroides* in a different branch than *H. ancistroides* reinforces the idea that they do not belong to the same taxon, but that it is actually a new species of the cryptic species complex “*ancistroides*”.

Keywords: Armoured catfish, Mitogenome, Upper Paraná River basin, WGS

* This paper will be submitted to the journal Genomics (ISSN 0888-7543)

CAPÍTULO I – Genomas mitocondriais completos de duas espécies de cascudos, gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae)

Dinaíza Abadia Rocha-Reis, Rubens Pasa, Fabiano Bezerra Menegídio, John Seymour (Pat)
Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher, Karine Frehner Kavalco

RESUMO

O DNA mitocondrial pode ser muito útil para estudos filogenéticos, identificação biológica e genética de populações. O gênero *Hypostomus* é considerado dominante em peixes nos rios brasileiros e possui uma grande variedade morfológica e genética. Aqui descrevemos o genoma mitocondrial de duas espécies de *Hypostomus*, *H. ancistroides* e *H. aff. ancistroides*. Além disso, realizamos Inferência Bayesiana para elucidar o posicionamento filogenético dessas espécies, uma vez que a última é morfológicamente semelhante a *H. ancistroides*, mas apresenta dados de cariótipo muito distintos, caracterizados por um número cromossômico mais baixo e pela presença de um sistema cromossômico sexual XY. O sequenciamento do genoma completo foi realizado no Novaseq 6000 da Illumina e para a montagem do mitogenoma foi utilizado o software Novoplast. A inferência Bayesiana foi realizada com a adição de quatro espécies de Hypostominae e uma de Hypoptopomatinae como outgroup. A organização de ambos os mitogenomas foi semelhante à relatada para peixes e metazoários, variando de 16,5 a 16,8 kb, com 13 PCGs, 22 tRNAs e 2 rRNAs. Encontramos variação de tamanho na região não codificadora (D-loop), responsável pela variação do tamanho total. Atribuímos esse aumento (321 pb) a possíveis duplicações de sequência nesta região. A topologia da árvore filogenética apresenta o agrupamento de representantes de Hypostominae, mas *Pterygoplichthys* como grupo irmão de *H. plecostomus* e *H. ancistroides*, o que pode ser devido à analogia da sequência ou apenas à tendência de amostragem. Por outro lado, a posição de *H. aff. ancistroides* em um ramo diferente de *H. ancistroides* reforça a idéia de que eles não pertencem ao mesmo táxon, mas que na verdade é uma nova espécie do complexo de espécies crípticas “*ancistroides*”.

Palavras chave: Bacia do Alto rio Paraná, Cascudo, Mitogenoma, WGS

2.1 Introduction

Hypostomus Lacépède (1803) represents the dominant genus of armoured catfish (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae) in Brazilian rivers (BRITSKI, 1972). These fish present a large interspecific variation in the pattern of body colour and external morphology (OYAKAWA *et al.*, 2005), which makes it difficult to identify some species. In addition, the various cytogenetic phenotypes, including different chromosomal numbers, karyotype formulas and location of ribosomal genes (ROCHA-REIS *et al.*, not yet published)⁴, intensify efforts in the search for more appropriate methodologies for species identification.

Hypostomus ancistroides Ihering (1911) shows a natural distribution in the hydrographic basins of the Tietê river, Ribeira de Iguape river and the Upper Paraná River (FRICKE *et al.*, 2020). The Upper Paraná River region is sheltered to about 25 species of the genus *Hypostomus* (WEBER, 2003), indicating a complex evolutionary history of this taxon in this hydrographic basin and evidencing the species complex of *H. ancistroides*, since different morphotypes are found in different basins of their distribution area.

A population belonging to this cryptic species complex and collected in the Paranapanema River basin, was named *Hypostomus* aff. *ancistroides* for presenting characteristics different from the other populations already described. The individuals, although it is morphologically similar to *H. ancistroides*, presents very distinct karyotype data, characterized by a lower chromosomal number and the presence of a neo-XY sexual chromosomal system (ROCHA-REIS *et al.*, 2018).

Often the delimitation of species within a complex is difficult, because populations may not change so much the morphology, but are usually reproductively isolated (LANE, 1997). Consequently, populations can be identified in different evolutionary units using methodologies that are not based only on morphological data (ROCHA-REIS *et al.*, 2018).

The mitochondrial genome (mtDNA) of vertebrates is a circular and closed molecule, with conserved gene content (BILLINGTON, HEBERT, 1991). It is 16-20 kb in length and consists of a light and a heavy chain where a non-coding control region and 37 genes are found: 13 protein-coding genes (PCGs), 22 RNA transfer genes (tRNAs) and two ribosomal RNA genes (rRNAs) (BERNT *et al.*, 2013; BOORE, 1999; TAANMAN, 1999). Features such as high evolutionary rate, low recombination and maternal inheritance make mtDNA an effective molecular marker and useful tool for biological identification studies, phylogenetic analyses

⁴ High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from the Paraná River basin, authored by Rocha-Reis, D. A.; Pasa, R.; Kavalco, K. F. Submitted to the scientific journal *Organisms Diversity and Evolution*.

and population genetics (CACCONE *et al.*, 2004; HARRISON, 1989; HIRASE *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2012).

In this paper, we describe the complete mitochondrial genome of two *Hypostomus* species: *H. ancistroides*, belonging to the Tietê river basin, and *H. aff. ancistroides*, collected in the Paranapanema River Basin. In addition, we seek to elucidate the phylogenetic positioning of these species based on their mitogenomas, in order to corroborate the literature data that suggest they are different evolutionary units. In spite of being very large and diverse, this is only the third and fourth mitogenomes described to this genus.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Specimen collection and DNA extraction

Hypostomus ancistroides specimens were collected from the Tietê river basin, near the municipality of Conchas, São Paulo state, Brazil (22°59'57.84" S; 48°0'16.09" O) – ATTACHMENT A. *Hypostomus aff. ancistroides* was collected from a stream near the municipality of São Miguel Arcanjo, State of São Paulo, Brazil (23°54'44.58" S; 47°57'40.50" O) – ATTACHMENT A. Tissue and DNA samples from individuals are deposited in the Tissue, Cell Suspension and DNA Bank of the Laboratory of Ecological and Evolutionary Genetics at the Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba. All technical standards for euthanizing animals were in accordance with the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) from Brazil.

Total genomic DNA was extracted from liver and heart samples according to the instructions of Invitrogen's DNA extraction and purification kit. The samples were monitored on a 1% agarose gel, with subsequent measurement of DNA quality and concentration by spectrophotometry, using NanoDrop 2000, and by fluorometry, using Qubit.

2.2.2 Sequence assembly and sequence analysis

The Whole Genome Sequencing was performed by Novaseq 6000 (Illumina, San Diego, CA) at Novogene company, UK. For the assembly *de novo* of the mitogenome, Novoplast 3.7 (DIERCKXSENS *et al.*, 2017; <https://github.com/ndierckx/NOVOPlasty>) was used with 2x150 raw reads and three distinct kmers (19, 21 and 23). Subsequently, the consensus sequence was mapped against the complete mitochondrial genome of *Hypostomus plecostomus* available on GenBank (NC_025584.1), using Bowtie2 software (LANGMEAD, SALZBERG, 2012) with all standard parameters – default.

The mitochondrial sequences obtained were noted in MitoAnnotator (IWASAKI *et al.*, 2013) present in MitoFish. The analyzes as a base composition were performed with Fasta Statistics 1.0.1 (SEEMANN, GLADMAN, unpublished), available at The Galaxy Project (<https://usegalaxy.org/>) (AFGAN *et al.*, 2018). The complete mitochondrial genomes of the two species are available from GenBank with accessions MT066232 for *Hypostomus ancistroides* and MT081402 for *Hypostomus aff. ancistroides*.

2.2.3 Phylogenetic analysis

The phylogenetic positions of *H. ancistroides* and *H. aff. ancistroides* were determined by comparison with four Hypostominae species and *Hypoptopoma incognitum* (MOREIRA *et al.*, 2015) as outgroup (Table 1). The complete mitogenome sequences were aligned with ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994), implemented in the MEGA 7.0.21 software (KUMAR *et al.*, 2018) with all standard parameters – default.

Table 1: Species used in Bayesian inference for phylogenetic reconstruction

Species	ID	Reference
<i>Hypostomus francisci</i> (Hypostomini, Hypostominae, Loricariidae)	Personal communication	Pereira <i>et al.</i> (2019)
<i>Hypostomus plecostomus</i> (Hypostomini, Hypostominae, Loricariidae)	NC025584	Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i> (Pterygoplichtini, Hypostominae, Loricariidae)	NC015747 (identical to AP012021)	Nakatani <i>et al.</i> (2011)
<i>Hypoptopoma incognitum</i> (Hypoptopomatinae, Loricariidae)	NC028072	Moreira <i>et al.</i> (2015)

Bayesian inference was performed using the MRBAYES 3.2.7 software (RONQUIST *et al.*, 2012), with the concatenation of the 13 protein-coding genes. For each gene, an independent search for the best nucleotide replacement model was performed using PartitionFinder 2.1.1 software (LANFEAR *et al.*, 2016), according to the Bayesian Information Criterion (BIC). After 10 million MCMC simulations, chain size per 1,000 generations was evaluated using

Tracer 1.7 (RAMBAUT *et al.*, 2018) to checked chain convergence. The first 25% of the trees were discarded as burn-in. Tree visualization was performed using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and image editing with Inkscape (<https://www.inkscape.org>).

2.3 Results and Discussion

2.3.1 Organization of mitochondrial genomes

The organization of the mitogenomes of the two species was very similar to the other ostariophysian fish (SATOY *et al.*, 2016), and consequently to other *Hypostomus* already described: 13 PCGs, 22 tRNA genes, two rRNA genes, and a control region (D-loop) (Figure 1A and 1B). However, we found different sizes for the two mitochondrial genomes: *H. ancistroides* presented 16826 bp, while *H. aff. ancistroides* is 16505 bp (Figure 1, ATTACHMENT B).

The base composition of the mitochondrial genome of *H. ancistroides* was estimated as 31.7% A, 26.6% C, 14.6% G and 26.9% T. For *H. aff. ancistroides* was found 31.5% A, 26.5% C, 14.7% G and 27.1% T. In both mitogenomes, most genes are located in the heavy chain, with only eight tRNAs and a protein-coding gene found in the light chain (Figure 1, ATTACHMENT B).

2.3.2 Protein-Coding Genes (PCGs)

Both mitogenomes described were the same size for PCGs, although they may have varied the start and end position within the genome (ATTACHMENT B). Thirteen protein-coding genes have been identified: ATP6 (683 bp), ATP8 (168 bp), COI (1551 bp), COII (691 bp), COIII (784 bp), Cytb (1138 bp), ND1 (975 bp), ND2 (1045 bp), ND3 (349 bp), ND4 (1381 bp), ND4L (297 bp), ND5 (1827 bp) and ND6 (522 bp), representing about de 70% of the mitogenomes.

There were overlapping coding between ATP8 and ATP6, ND4L and ND4, ND5 and ND6. Except for COI that starts with GTG, the other protein-coding genes use the ATG codon for initiation. The stop codons were identified as TAA (for ATP8, ND4L, ATP6, ND1, COI, and ND5), TAG (for ND6) and incomplete T-stop (for ND3, COII, COIII, ND2, Cytb and ND4). Except for ND6, all other protein-coding genes were found in the heavy chain (ATTACHMENT B).

Twenty-two tRNAs were found in both mitogenomes, with sizes ranging from 67 to 75 bp. There was a single tRNA size difference between the two species: tRNA^{Lys} has 74 bp in *H. ancistroides* and 73 bp in *H. aff. ancistroides*. Only eight tRNAs are located in light chain: tRNA^{Gln}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Pro} (Table 2). Some tRNAs had atypical codons such as tRNA^{Leu} (UAA), tRNA^{Ser} (UGA), tRNA^{Ser} (GCU) and tRNA^{Leu} (UAG).

2.3.4 Non-coding region

We found differences in the size of the non-coding region: *H. ancistroides* presented 1186 bp D-loop; whereas this same region in *H. aff. ancistroides* is 865 bp (Figure 1C, ATTACHMENT B). This variation of base pairs is responsible for the large overall size difference of mitochondrial genomes, where the parameters for total and D-loop size of *H. aff. ancistroides* is more similar to data available in the literature for *Hypostomus*.

An explanation for this difference would be the use of the recirculated circular DNA retrieval methodology between the individual DNA sequencing reads. Other methodologies were tested (SOAPdenovo2, MIRA, MITObin - data not shown), although the NovoPlasty was considered more satisfactory (DIERCKXSENS *et al.*, 2017; GAN *et al.*, 2019; SCHMIDT, MCDOUGALL, 2019; YANG *et al.*, 2019), with high accuracy and genome coverage (DIERCKXSENS *et al.*, 2017). Thus, we believe that the actual sizes of the non-coding regions are as shown.

The simplest biological factor for this difference between the two species may be due to duplication of fragments within the non-coding region. Moretiz and Brown (1986) found mtDNA from different sized lizards, where 4.8 kb exceeded were due to tandem duplications of a region that included regulatory sequences in addition to tRNA and rRNA genes.

The fact that the D-loop is considered the main non-coding region of the mitochondrial genome, which regulates replication and transcription processes, makes this region more variable and with faster evolution rates (CLAYTON, 1991; SHADEL, CLAYTON, 1997), makes it an important interest for the phylogeny of organisms, especially of nearby taxa/groups. Thus, a directed approach with D-loop sequences may provide insights into the difference in these sequences sizes, as well as a useful system for investigating the molecular and evolutionary biology of animal mtDNA.

2.3.5 Phylogenetic analysis

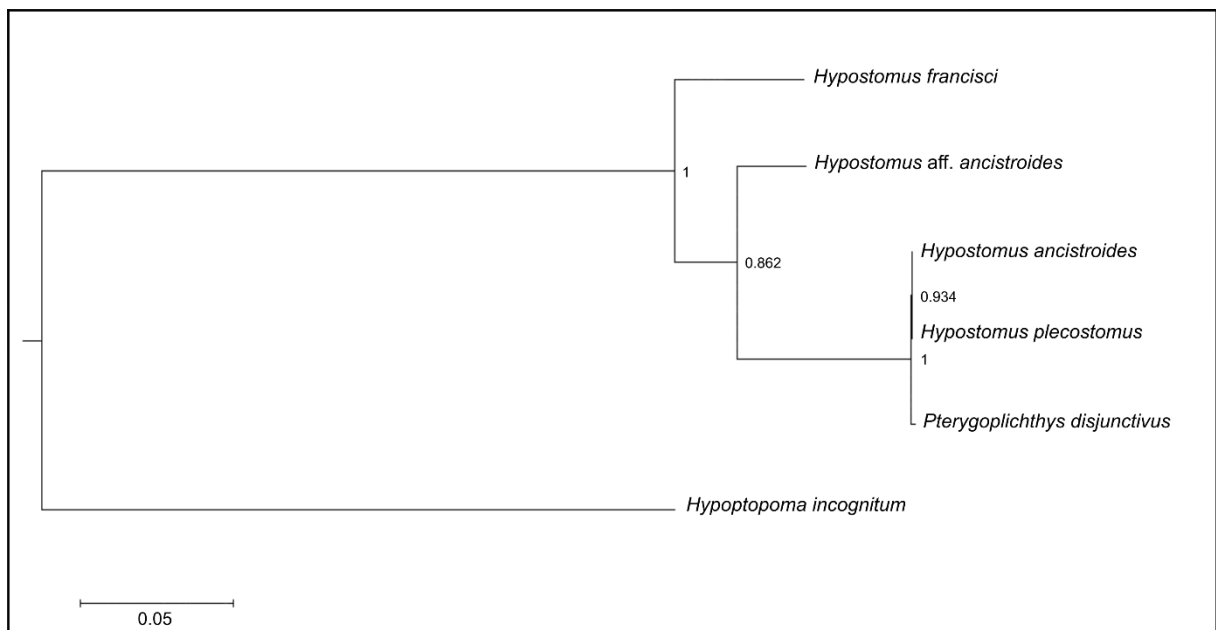
The tree topology obtained by Bayesian inference (Figure 2) shows the grouping of representatives of the Hypostominae subfamily, with *Hypostomus* and *Pterygoplichthys* in one same clade and *Hypoptopoma* (Hypoptopomatinae subfamily) as an external group.

The interesting fact of this results is that *P. disjunctivus* appeared as the sister group of *H. plecostomus* and *H. ancistroides*, closer to these species than the other two individuals of the same genus, *H. francisci* and *H. aff. ancistroides* (Figure 2).

This proximity of *P. disjunctivus* can be interpreted as a sequence analogy, in which genes evolved in the two tribes in a convergent mode, culminating in similar sequences in the two species but which in fact do not reflect ancestry; or because of the small sampling of *Pterygoplichthys*, since only one individual of this genus was incorporated in the analysis.

However, another hypothesis would be the existence of introgression of mitochondrial genes. In fish, cases of species of the same genus have already been observed in which there is hybridization and introgression of genes, as is the case of *Tridentiger obscurus* and *Tridentiger brevipinis* (MUKAI *et al.*, 1997), *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (PRADO *et al.*, 2012), and still in the genus mentioned above, *Pterygoplichthys disjunctivus* and *Pterigoplichthys pardalis* (JUMAWAN *et al.*, 2011).

Figure 2: Bayesian phylogenetic tree for *Hypostomus* mitogenomes using *Hypoptopoma incognitum* as outgroup. Numbers at each node represent the posterior probability.



The hybridization resulting in introgression or the incorporation of foreign genes from one species into another may explain discrepancy between characters, whether morphological, from allozymes, mtDNA or nuclear DNA (DOWLING, DeMARAIS, 1993). In Perciforme *Lepidiolamprologus*, Schelly *et al.* (2006) found agreement between morphological and nuclear data, but at odds with results obtained from mtDNA, suggesting introgression of genes. Armbruster (2004) using morphological data proposed hypotheses for the classification of Loricariidae, where *Hypostomus* and *Pterigoplichthys* appear in separate clades; Lujan *et al.* (2015), based on nuclear and mitochondrial genes, discusses possible phylogenetic relationships between the Hypostomini and Ancistrini tribes, but *Pterigoplichthys* remains in a separate clade from the rest of the *Hypostomus*. Thus, we interpret the position of *Pterigoplichthys* in Figure 2 as a possible introgression of genes.

Despite the aforementioned difference in the size of the D-loop sequences, the phylogenetic reconstruction was built with the absence of this region, and even so, it resulted in positioning in different clades between *H. ancistroides* and *H. aff. ancistroides* (Figure 2). This scenario demonstrates the separation between the two species and reinforces the hypothesis that *H. aff. ancistroides* is a new species of the complex (ROCHA-REIS *et al.*, 2018), based on morphological, cytogenetic, gene and mitochondrial differences and need to be formally described and named as a taxonomically valid species.

2.4 References

- AFGAN, E.; BAKER, D.; BATUT, B.; VAN DER BEEK, M.; BOUVIER, D.; CECH, M.; CHILTON, J.; CLEMENTS, D.; CORAOR, N.; GRÜNING, B. A.; GUERLER, A.; HILLMAN-JACKSON, J.; HILTERMANN, S.; JALILI, V.; RASCHE, H.; SORANZO, N.; GOECKS, J.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; BLANKENBERG, D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nuclei Acids Research**, v. 46, p. W537-W544, 2018.
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 1-80, 2004.
- BERNT, M.; BLEIDORN, C.; BRABAND, A.; DAMBACH, J.; DONATH, A.; FRITZSCH, G.; GOLOMBEK, A.; HADRYN, H.; JÜHLING, F.; MEUSEMANN, K.; MIDDENDORF, M.; MISOF, B.; PERSEKE, M.; PODSIADLOWSKI, L.; VON REUMONT, B.; SCHIERWATER, B.; SHLEGEL, M.; SCHRÖDL, M.; SIMON, S.; STADLER, P. F.; STÖGER, I.; STRUCK, T.H. A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, p. 352-364, 2013.
- BILLINGTON, N.; HEBERT, P. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, p. 80-94, 1991.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 1767-1780, 1999.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo: Instituto de Pesca da Coordenadoria da Pesquisa de Recursos Naturais da Secretaria da Agricultura, 1972. p. 79-108.
- CACCONE, A.; GENTILE, G.; BURNS, C. E.; SEZZI, E.; BERGMAN, W.; RUELLE, M.; SALTONSTALL, K.; POWELL, J. R. Extreme difference in rate of mitochondria land nuclear DNA evolution in a large of ectotherm Galápagos tortoises **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 794-798, 2004.
- CLAYTON, D. A. Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription, **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 107-111, 1991.
- DIERCKXSENS, N.; MARDULYN, P.; SMITS, G. NOVOPlasty: *de novo* assembly of organelle genomes from whole genome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. e18, 2017.
- DOWLING, T. E.; DeMARAIS, B. D. Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. **Nature**, v. 362, v. 444-446, 1993.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. 2020. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso em 22 jan 2020.
- GAN, H. M.; SYAHADAH, M. Y. N. I.; VILASRI, V.; NURUL AIMI, M. J. T.; TAN, M. P. Four whole mitogenome sequences of yellowtail stargazers (*Uranoscopus cognatus* cantor

1849) from East Peninsular Malaysia and West Coast of Thailand. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, p. 256-258, 2019.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in populations and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 6-11, 1989.

HIRASE, S.; TAKESHIMA, H.; NISHIDA, M.; IWASAKI, W. Parallel mitogenome sequencing alleviates random rooting effect in phylogeography. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, p. 1267-1278, 2016.

INOUE, J. G.; MIYA, M.; TSUKAMOTO, K.; NISHIDA, M. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*. **Fisheries Science**, v. 66, p. 924-932, 2000.

IWASAKI, W.; FUKUNAGA, T.; ISAGOZAWA, R. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2531-2540, 2013.

JUMAWAN, J. C.; VALLEJO, B. M.; HERRERA, A. A.; BUERANO, C. C.; FONTANILLA, I. K. C. DNA barcodes of the suckermouth sailfin catfish *Pterigoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae) in the Marikina river system, Philippines: Molecular perspective of an invasive alien fish species. **Philippine Science Letters**, v. 4, p. 103-113, 2011.

KUMAR, S. STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LANE, R. The species concept in blood-sucking vectors of human diseases. *In*: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. (eds.). **Species, the Units of Biodiversity**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 273-289.

LANFEAR, R.; FRANDBSEN, P. B.; WRIGHT, A. M.; SENFELD, T.; CALCOTT, B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetics analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 772-773, 2016.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, p. 357-359, 2012.

LIU, S.; ZHANG, J.; YAO, J.; LIU, Z. The complete mitochondrial genome of the armored catfish, *Hypostomus plecostomus* (Siluriformes: Loricariidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, p. 1908-1909, 2016.

LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W.; LOVEJOY, N. R.; LÓPES-FERNÁNDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, p. 269-288, 2015.

MA, C.; YANG, P.; JIANG, F.; CHAPUIS, M. P.; SHALI, Y.; SWORD, G. A.; KANG, L. E. Mitochondrial genomes reveal the global phylogeography and dispersal routes of the migratory locust. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 4344-4358, 2012.

MOREIRA, D. A.; MAGALHÃES, M. G. P.; ANDRADE, P. C. C.; FURTADO, C.; VAL, A. L.; PARENTE, T. E. An RNA-based approach to sequence the mitogenome of *Hypoptopoma incognitum* (Siluriformes: Loricariidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, p. 3784-3786, 2015.

MORETIZ, C.; BROWN, W. M. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizards mitochondrial DNA. **Science**, v. 233, p. 1425-1427, 1986.

MUKAI, T.; NARUSE, K.; SATO, T.; SHIMA, A.; MORISAWA, M. Multiregional introgressions inferred from the mitochondrial DNA phylogeny of a hybridizing species complex of gobiid fishes, genus *Tridentiger*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 1258-1265, 1997.

NAKATANI, M.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; SAITOH, K.; NISHIDA, M. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeian origin and Mesozoic radiation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 177, 2011.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v. 921, p. 1-27, 2005.

PEREIRA, A. H.; FACCHIN, S.; OLIVEIRA DO CARMO, A.; NÚÑEZ RODRIGUEZ, D.; CARDOSO RESENDE, L.; KALAPOTHAKIS, Y.; FERREIRA PINTO, P. B. D.; ALVES, C. B. M.; ZAWADZKI, C. H.; KALAPOTHAKIS, E. Complete mitochondrial genome sequence of *Hypostomus francisci* (Siluriformes: Loricariidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, p. 155-157, 2019.

PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. **Fisheries Research**, v. 125, p. 300-305, 2012.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, p. 901-904, 2018.

ROCHA-REIS, D. A.; de OLIVEIRA BRANDÃO, K.; de ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. The persevering cytotaxonomy: discovery of a unique XX/XY sex chromosome system in catfishes suggests the existence of a new, endemic and rare species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 156, p. 45-55, 2018.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

- SATOH, T. P.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; NISHIDA, M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMC Genomics**, v. 17, p. 719, 2016.
- SCHELLY, R.; SALZBURGER, W.; KOBLMÜLLER, S.; DUFTNER, N.; STURMBAUER, C. Phylogenetic relationships of the lamprologine cichlid genus *Lepidolamprologus* (Teleostei: Perciformes) based on mitochondrial and nuclear sequences, sugaring introgressive hybridization. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, p. 426-438, 2006.
- SCHMIDT, D. J.; MCDUGALL, C. Complete mitogenomes of five ecologically diverse Australian freshwater fishes. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, p. 191-193, 2019.
- SEEMANN, T.; GLADMAN, S. Fasta Statistics: Display summary statistics for a fasta file. Unpublished 2012. <https://github.com/galaxyproject/tools-iuc>
- SHADEL, G. S.; CLAYTON, D. A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates, **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 409–435, 1997.
- TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1410, p. 103–123, 1999.
- 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, p. 4673-4680, 1994.
- WEBER, C. Subfamily Hypostominae. *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (eds.). **Ccheck list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p 351-372.
- YANG, T.; MENG, W.; XUHUI, W.; GAO, T.; LIU, Y. The Complete Mitochondrial Genome of Endemic Freshwater Sculpin *Cottus dzungaricus* (Scorpaeniformes: Cottidae) Revealed by High-Throughput NGS: Genome Structure and Its Phylogenetic Relationships. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 20, p. 29-37, 2019.

3 CAPÍTULO II – Satelitomas e cross-amplificação de satDNAs em duas espécies do complexo *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae)

Dinaíza Abadia Rocha-Reis, Rubens Pasa, Fabiano Bezerra Menegídio, John Seymour (Pat)
Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher, Karine Frehner Kavalco

RESUMO

Eucariotos possuem diversas cópias de sequências repetitivas no genoma. Dentre elas, os satDNAs abrangem sequências altamente variáveis e dispersas, e organizam-se em famílias que variam quanto ao tipo de sequências, a abundância, o tamanho e a localização nos genomas. O gênero *Hypostomus* é o mais representativo dentre os cascudos de distribuição sul americana e apresenta expressiva variação cariotípica. O objetivo deste trabalho foi prospectar o satelitoma e determinar seu mapeamento físico no genoma de duas espécies crípticas de *Hypostomus* – *H. aff. ancistroides* e *H. ancistroides*, com e sem sistema cromossômico sexual XX/XY. Após sequenciamento do genoma total de ambas as espécies, os satDNAs foram isolados utilizando softwares específicos, amplificados e hibridados *in situ* em preparações cromossômicas de indivíduos machos de fêmeas. Os satelitomas apresentaram diferenças em relação ao número de sequências repetitivas encontradas, além de muitas sequências exclusivas para cada espécie e que não apresentavam similaridades com nenhum acesso depositado previamente em bancos de dados. Um total de onze satDNAs foram resgatados pela análise. Quatro não hibridaram em nenhum indivíduo, mostrando padrão disperso. Três deles (Sat02Han, Sat19Han e Sat27Han) hibridaram em cromossomos das duas espécies, apesar de apresentarem fenótipos variáveis em número de sítios. Dois satDNAs, Sat03Han e Sat03HanXY hibridaram apenas nos cromossomos da espécie a partir da qual foram isolados. Um padrão oposto foi verificado para Sat10HanXY e Sat21Han, hibridando apenas nos cromossomos da espécie da qual não foram isolados. Não foram encontradas hibridações de satDNAs nos cromossomos sexuais X e Y analisados, visto que são compostos quase inteiramente por eucromatina. Apesar do número crescente de estudos que abordam sequências repetitivas em peixes, ainda não é possível estabelecer tendências com precisão, destacando-se o fato de que satDNAs são sequências altamente dinâmicas e muitas delas comportam-se como espécie-específicas.

Palavras-chave: Citogenômica, DNA repetitivo, DNA satélite, Hibridação *in situ* Fluorescente

CHAPTER II – Satellitomes and cross-amplification of satDNAs in two species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Siluriformes, Loricariidae)

Dinaíza Abadia Rocha-Reis, Rubens Pasa, Fabiano Bezerra Menegídio, John Seymour (Pat)
Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher, Karine Frehner Kavalco

ABSTRACT

Eukaryotes have several copies of repetitive sequences in the genome. Among them, satDNAs encompass highly variable and dispersed sequences, and are organized into families that vary in the type of sequences, abundance, size and location in the genomes. The genus *Hypostomus* is the most representative among the South American armoured catfishes and has an expressive karyotype variation. The objective of this work was to prospect the satellite and determine its physical mapping in the genome of two cryptic species of *Hypostomus* - *H. aff. ancistroides* and *H. ancistroides*, with and without XX/XY sexual chromosome system. After sequencing the total genome of both species, satDNAs were isolated using specific software, amplified and hybridized *in situ* in chromosomal preparations from male to female individuals. The satellitomas showed differences in relation to the number of repetitive sequences found, in addition to many sequences exclusive to each species and that did not present similarities with any access previously deposited in the database. A total of eleven satDNAs were rescued by the analysis. Four of them did not hybridize to any individual, showing a dispersed pattern. Three of them (Sat02Han, Sat19Han and Sat27Han) hybridized on chromosomes of the two species, despite having variable phenotypes in number of sites. Two satDNAs, Sat03Han and Sat03HanXY hybridized only on the chromosomes of the species from which they were isolated. An opposite pattern was verified for Sat10HanXY and Sat21Han, hybridizing only to the chromosomes of the species from which they were not isolated. No hybridization of satDNAs was found in the sex X and Y chromosomes analyzed, since they are composed almost entirely by euchromatin. Despite the growing number of studies that address repetitive sequences in fish, it is still not possible to establish trends with precision, highlighting the fact that satDNAs are highly dynamic sequences and many behave as species-specific.

Keywords: Cytogenomics, Fluorescent *in situ* Hybridization, repetitive DNA, satellite DNA

3.1 Introdução

Na subfamília Hypostominae (Loricariidae, Siluriformes), o gênero *Hypostomus* é o mais representativo em termos de abundância de cascudos em rios brasileiros (BRITSKI, 1972) e de estudos citogenéticos. Baseado em descrições cariotípicas, são mais de 25 espécies distribuídas em cerca de 120 populações, onde é observado grande número de polimorfismos relacionados a números diploides, padrões de bandamentos cromossômicos, número e localização de genes ribossômicos, entre outros (ROCHA-REIS *et al.*, submetido)⁵.

Hypostomus ancistroides é considerado um complexo de espécies pela presença de diferentes morfotipos distribuídos em toda sua área de distribuição (HOLLANDA CARVALHO, 2011). Além da diferença morfológica, são relatadas variações desde números cromossômicos e fórmulas cariotípicas, até presença de sistemas sexuais (ALVES *et al.* 2006, 2012; ARTONI E BERTOLLO 1996; BUENO *et al.* 2012; ENDO *et al.* 2012; FERNANDES *et al.* 2012; LARA-KAMEI *et al.* 2017; MAURUTTO *et al.* 2012; PANSONATO-ALVES *et al.* 2013; ROCHA-REIS *et al.* 2018; RUBERT *et al.* 2011; TRALDI *et al.* 2013).

Dados de uma população de *H. aff. ancistroides* proveniente de São Miguel Arcanjo/SP (ROCHA-REIS *et al.*, 2018) evidenciam a existência de uma nova espécie do complexo, pois além das pequenas diferenças morfológicas, são encontrados alguns fenótipos contrastantes: natureza monofilética desta população, número cromossômico reduzido ($2n = 66$ em contrapartida aos 68 cromossomos comumente descritos) e a existência do único sistema cromossômico sexual tipo XX/XY para o gênero.

Os genomas nucleares de eucariotos são compostos por um alto número de cópias de sequências repetitivas de DNA, como elementos transponíveis (TEs), famílias multigênicas (rDNA, histonas) e DNAs satélites (CAMACHO *et al.*, 2015; CHARLESWORTH *et al.*, 1994; CHOO *et al.*, 1989; JOHN, MIKLOS, 1979; JURKA *et al.* 2005).

O termo DNA satélite (satDNA) abrange uma gama de sequências repetitivas em tandem que são altamente variáveis e dispersas nos genomas eucarióticos. As famílias de satDNA variam quanto à sequência de nucleotídeos, sua abundância, o tamanho da unidade repetitiva e sua localização (GARRIDO-RAMOS, 2017).

Sequências de satDNA podem variar entre indivíduos de uma população e entre espécies, tornando-se importante o estudo destas sequências para identificar e entender melhor as

⁵ High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from the Paraná River basin, de autoria de Rocha-Reis, D. A.; Pasa, R.; Kavalco, K. F. Submetido ao jornal científico periódico *Organisms Diversity and Evolution*.

diferentes famílias repetitivas que constituem um genoma, e como elas podem estar envolvidas em processos evolutivos que moldam genomas (NOVÁK *et al.*, 2010, 2013).

Com o advento de novas tecnologias, como Sequenciamento de Nova Geração (NGS), e desenvolvimento de novas ferramentas computacionais, torna-se mais acessível o estudo de satDNAs. Aliando estas novas metodologias à citogenética molecular (mais precisamente Hibridação *in situ* Fluorescente), é possível observar a distribuição de diversas classes de sequências repetitivas no genoma. Como mencionado por Biscotti *et al.* (2015), a abordagem cromossômica é muito importante e vital para compreender a distribuição e evolução de repetições no genoma, mostrando a “origem, modo evolutivo e função” destas sequências. Estes autores ainda destacam que a citogenética molecular comparativa pode possibilitar a “compreensão da natureza e comportamento desse importante componente genômico”.

Desta forma, uma abordagem integrativa entre citogenética molecular e genômica pode auxiliar no entendimento acerca da organização dos genomas das espécies e permite buscar novas hipóteses que ajudem na delimitação mais precisa dentro de complexos de espécies. Além disso, a comparação entre duas espécies, uma portanto um neo sistema cromossômico sexual, permite a busca de evidências sobre a origem e evolução destes elementos no genoma. O objetivo deste trabalho foi descrever os satelitos presentes em duas espécies de *Hypostomus*, *Hypostomus ancistroides* e *Hypostomus* aff. *ancistroides*, e analisar quais os fenótipos de satDNAs encontrados nas duas espécies e em outras populações do complexo de espécies *H. ancistroides* por meio da Hibridação *in situ* Fluorescente.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Amostragem, preparações cromossômicas e extração de DNA

Indivíduos de cinco populações de cascudos foram coletados na bacia do Alto rio Paraná, no estado de São Paulo, Brasil. A Tabela 1 mostra informações sobre número de indivíduos, pontos de coleta (ver também ANEXO A) e coordenadas geográficas. Todos os procedimentos de amostragem e eutanásia dos animais foram executados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil. As amostras retiradas dos indivíduos fazem parte do Banco de Tecido, Suspensão Celular e DNA do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo) da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba e receberam número individual de voucher.

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada de acordo com Gold *et al.* (1990), com algumas modificações (para mais informações, ver ANEXO C). A extração de DNA foi realizada a partir de fígado e coração dos indivíduos, utilizando kit apropriado (PureLink™

Genomic DNA Kit) e seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). Após checagem da qualidade do DNA em gel de agarose 1%, Nanodrop e Qubit, as amostras foram enviadas para serviço terceirizado de sequenciamento.

Tabela 1: Detalhes da localização dos pontos de coleta e dos indivíduos utilizados no estudo.

Espécie	Município	Coordenadas geográficas		Exemplares coletados		
				M	F	Total
<i>H. aff. ancistroides</i>	São Miguel Arcanjo	23°54'14.30"S	47°55'46.75"O	11	16	27
	Araras	22°22'59.64"S	47°25'49.50"O	7	9	16
	Botucatu	22°52'29.15"S	48°22'27.50"O	4	5	9
<i>H. ancistroides</i>	Indaiatuba	23°05'39.12"S	47°15'38.16"O	6	4	10
	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	2	3	5

3.2.2 Obtenção, isolamento e amplificação de satDNAs

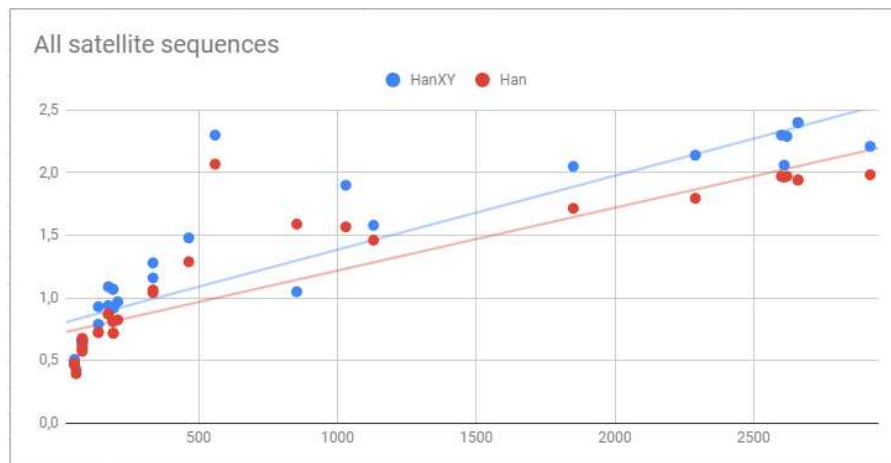
Foram sequenciados dois indivíduos machos, um *H. aff. ancistroides* (São Miguel Arcanjo) e um *H. ancistroides* (Conchas/SP – 23°00'03.00"S; 48°00'00.00"O). O sequenciamento foi tipo Whole Genome Sequencing (WGS) realizado por Novaseq 6000 (Illumina, San Diego, CA) pela companhia Novogene, UK. Após o recebimento dos dados brutos, as análises foram realizadas na plataforma The Galaxy Project (<https://usegalaxy.org/>) (AFGAN *et al.*, 2018). As avaliações de qualidade das reads foram realizadas com a ferramenta FastQC 0.72 (ANDREWS, 2010), enquanto a retirada dos adaptadores e filtragem foram feitas com Trimmomatic 0.36.5 (BOLGER *et al.*, 2014).

Para identificação de seqüências de satDNA nos dados, foram utilizados os softwares RepeatExplorer 1.0.0 (NOVÁK *et al.*, 2013) seguida de Tandem Repeat Analyser (Tarean) 1.0.0 (NOVÁK *et al.*, 2017). Os DNAs satélites encontrados foram comparados utilizando ferramentas como Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) e banco de dados como Dfam (HUBLEY *et al.* 2016).

Posteriormente, foram identificados aqueles que eram exclusivos de cada espécie e realizou-se uma regressão linear entre o tamanho do fragmento dos satDNAs, em pares de bases, e a cobertura que cada satDNA possuía no genoma completo (Figura 1). Isto auxiliou na escolha dos DNAs satélites para serem amplificados, visto que uma maior cobertura no genoma, pode refletir em maiores probabilidades de serem identificados via hibridação fluorescente.

O próximo passo foi desenhar primers para amplificação dos satDNAs escolhidos, utilizando Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Todos os primers foram desenhados de forma que apresentassem mesma temperatura de melting, ajustada para 59°C. Para cada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas 2,5 uL de 10x Buffer com Mg²⁺, 1 uL de dNTP (10mM), 1 uL de cada primer (10mM), 80 ng de DNA e 0,2 uL de Taq Polimerase (BioTaq). O programa para amplificação consiste em um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30s, 59°C por 30s, e 72°C por 1min30s, e uma extensão final de 72°C por 5 mim. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e caso houvesse amplificação, quantificamos as amostras utilizando NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

Figura 1: Regressão linear entre o tamanho do fragmento de satDNA (em pb) – X, por suas respectivas coberturas no genoma – Y. Em azul, satDNA isolados em *H. aff. ancistroides*; em vermelho aqueles isolados em *H. ancistroides*.



3.2.3 Marcação das sondas e Hibridação in situ Fluorescente

Foram utilizadas marcação direta e indireta nas sondas de satDNA. Aquelas de forma indireta foram marcadas com kit BioPrime Array CGH Genomic Labelling System (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante, com algumas modificações (ANEXO C), utilizando biotin-11-dUTP ou digoxigenin-11-dUTP. As marcações diretas foram realizadas com Texas Red (Sulforhodamine 101 Acid Chloride), de acordo com o protocolo mencionado acima, e com Cyanine5 (Cy5) ou 6-Carboxyfluorescein (6 FAM), estas últimas realizadas por serviço terceirizado (ThermoFisher). A correspondência de cada satDNA com o fluorocromo que foi marcado está descrita na Tabela 2. A purificação das sondas procedeu de acordo com protocolo do kit de marcação.

A Double-FISH foi realizada conforme Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000) (ANEXO C), com Alexa 647-Streptavidin como anticorpo para Biotin, e FITC-anti-digoxigenin como anticorpo para Digoxigenin. As lâminas foram montadas para visualização com Antifade e DAPI. As análises foram realizadas em Fotomicroscópio Monocromático Olympus BX53, presente no Beagle – Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa; e no Fotomicroscópio de Fluorescência Nikon Eclipse Ti, pertencente ao Cento de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI – ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as imagens foram visualizadas e editadas utilizando os softwares Image J 1.52a (SCHNEIDER *et al.*, 2012) e GIMP 2.10.12 (GNU Image Manipulation Program – www.gimp.org).

Tabela 2: SatDNAs e fluorocromos utilizados no estudo

Sonda	Marcação direta		Marcação Indireta	
	Fluorocromo	Fluorocromo	Fluorocromo	Anticorpo
Sat03HanXY			Biotin	Alexa 647-Streptavidin
Sat10HanXY			Biotin	Alexa 647-Streptavidin
Sat01Han	Cy5			
Sat02Han	6 FAM			
Sat03Han			Biotin	Alexa 647-Streptavidin
Sat04Han			Digoxigenin	FITC-anti-digoxigenin
Sat07Han			Biotin	Alexa 647-Streptavidin
Sat19Han	6 FAM			
Sat20Han			Biotin	Alexa 647-Streptavidin
Sat21Han	Cy5			
Sat27Han	Texas red			

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Descrição dos satelitomas nas duas espécies

Foram encontrados 38 satélites putativos e dois Long Terminal Repeats (LTR) em *H. ancistroides*, dentre os quais 36 foram considerados sequências de satDNAs: um era região repetitiva de rDNA 5S; dois eram sequências de tRNA (tRNA-Phe e tRNA-Glu) e um era snRNA (gene/pseudogene snRNA – U2 e U5). Em *H. aff. ancistroides*, foram identificados 18 satélites putativos e um elemento LTR, dos quais 18 eram sequências de DNA satélite e um combinou com sequências repetitivas de rDNA 5S. Os DNAs repetitivos variaram de 17 a 2660

pb em *H. ancistroides* e de 17 a 2920 pb em *H. aff. ancistroides*. Os dados relacionados aos nomes das sequências repetitivas, tipo de sequências, tamanhos, proporção genômica, e homologia de sequência estão sumarizados no ANEXO D, e as sequências de cada satélite descritas no ANEXO E.

Dois DNAs repetitivos eram compartilhados entre as duas espécies: rDNA5S-1190_Han e rDNA5S-1190_HanXY eram a mesma sequência, correspondente ao gene do DNA ribossômico 5S em Vertebrata; enquanto Sat05-2660_Han e Sat01-2920_HanXY foram compatíveis com sequências de retrotransposons (R2 e Penélope) encontrados em *Danio rerio*. Entre as sequências satélites exclusivas nas espécies que possuíam algum tipo de similaridade de sequências com bancos de dados, foram encontradas doze em *H. ancistroides* e três em *H. aff. ancistroides*. Já sequências exclusivas, mas que não apresentavam similaridade, 26 foram obtidas de *H. ancistroides* e 14 a partir do genoma de *H. aff. ancistroides* (Tabela 3).

Dados de satelitomas, assim como de genomas completos em *Hypostomus*, são ausentes na literatura. Em táxons próximos evolutivamente de Loricariidae, tem-se dados de “draft genome” apenas para *Ictalurus punctatus* (JIANG *et al.*, 2013), número ínfimo comparado à diversidade de espécies em Siluriformes. Para sequências repetitivas, a maioria dos trabalhos aborda localização física de rDNA 18S e rDNA 5S, mas são poucos os trabalhos que analisam sequências diferentes, como genes de histona H3, elementos transponíveis como *Rex1* e sequências teloméricas (PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013). Desta forma, as descrições aqui apresentadas tratam-se dos dois primeiros satelitomas para espécies de *Hypostomus*.

As diferenças entre os dois conjuntos de DNAs satélites nas duas espécies são evidentes, pois apenas duas sequências foram compartilhadas em contraste com o grande número de exclusivas (Tabela 3). Isso demonstra como *H. aff. ancistroides* é geneticamente diferente de *H. ancistroides*, e que tais características vão muito além de dados morfológicos, cariotípicos e moleculares (ROCHA-REIS *et al.*, 2018), mas estão presentes no genoma nuclear e mitocondrial (para mais detalhes, consultar capítulo anterior).

3.3.2 Hibridação de sequências de satDNA

Todos os indivíduos de *H. aff. ancistroides* apresentaram 66 cromossomos, como descrito em Rocha-Reis *et al.* (2018) e todos os indivíduos de *H. ancistroides* foram cariotipados com $2n = 68$ (KAVALCO *et al.*, submetido)⁶.

⁶ Chromosomal Radiation: a model to explain karyotypic diversity in cryptic species, de autoria de KAVALCO, K. F.; ROCHA-REIS, D. A.; BRANDÃO, K. O.; DERGAM, J. A.; PASA, R. Submetido ao jornal científico periódico Heredity.

Dentre os satDNAs que foram testados via PCR, três não amplificaram mesmo após testes subsequentes: Sat06_HanXY, Sat07_HanXY, e Sat18_HanXY. Da mesma forma, quatro satDNAs não hibridaram nos cromossomos de nenhuma espécie após a FISH: Sat01Han, Sat04Han, Sat07Han e Sat20Han. Como não foi possível a hibridação, estas quatro sequências repetitivas não puderam ser validadas como satélites de fato, podendo constituir artefatos ou falsos DNAs satélites.

Tabela 3: Resumo das sequências repetitivas encontradas para cada espécie analisada, identificando sequências compartilhadas, exclusivas que apresentam similaridade com bancos de dados e exclusivas sem similaridade.

Sequências repetitivas	<i>Hypostomus ancistroides</i>		<i>Hypostomus aff. ancistroides</i>	
Compartilhadas	rDNA5S_Han	Sat05_Han	rDNA5S_HanXY	Sat01_HanXY
	Sat04_Han	Sat23_Han		
	Sat08_Han	Sat25_Han		
Exclusivas com similaridade	Sat09_Han	Sat27_Han	Sat03_HanXY	Sat18_HanXY
	Sat13_Han	Sat29_Han	Sat09_HanXY	
	tRNA_Han	tRNA_Han		
	snRNA_Han	Sat38_Han		
Exclusivas não similares	Sat01_Han	Sat19_Han		
	Sat02_Han	Sat20_Han		
	Sat03_Han	Sat21_Han		
	Sat06_Han	Sat22_Han	Sat02_HanXY	Sat11_HanXY
	Sat07_Han	Sat24_Han	Sat04_HanXY	Sat12_HanXY
	Sat10_Han	Sat26_Han	Sat05_HanXY	Sat13_HanXY
	Sat11_Han	Sat30_Han	Sat06_HanXY	Sat14_HanXY
	Sat12_Han	Sat31_Han	Sat07_HanXY	Sat15_HanXY
	Sat14_Han	Sat32_Han	Sat08_HanXY	Sat16_HanXY
	Sat15_Han	Sat33_Han	Sat10_HanXY	Sat17_HanXY
	Sat16_Han	Sat35_Han		
	Sat17_Han	Sat36_Han		
	Sat18_Han	Sat37_Han		

SatDNAs presentes nos genomas, mas não detectáveis em FISHs já foram observados em *Scophthalmus maximus* por TABOADA *et al.* (2018). Segundo estes autores, essa discrepância pode estar relacionada às limitações da técnica, uma vez que as hibridações podem não detectar as unidades repetitivas que estão em baixo número de cópias, impossibilitando o pareamento das sondas como DNA alvo, ou mesmo degenerando as sequências nos pontos de fusão durante o procedimento.

Em contrapartida, foram observados satDNAs que hibridaram nas duas espécies: Sat02Han, Sat19Han e Sat27Han. A princípio, acredita-se que essas sequências repetitivas sejam mais conservadas ou que as unidades repetitivas estejam em grande número, permitindo a hibridação de muitas unidades. Apesar disso, os fenótipos encontrados variaram entre espécies, entre populações e até no mesmo indivíduo (Figura 2).

Para o Sat02Han, em *H. aff. ancistroides* foram identificados quatro sítios em cromossomos de indivíduos de ambos os sexos, sempre com um par mais evidente e um par mais sutilmente marcado (Figura 2 – A e B). Todas as marcações estão em cromossomos do tipo *st/a* e são subteloméricas. No macho, ainda observou-se um cromossomo quase totalmente marcado (Figura 2A – seta), conseqüentemente com quase toda sua composição repleta de sequências repetitivas. Indivíduos de *H. ancistroides* de Araras e Botucatu apresentaram hibridação com esse satDNA, mas de forma peculiar. Na fêmea de Araras (Figura 2C), identifica-se quatro sítios, assim como mencionado para a espécie anterior, com marcações em um par de forma conspícua e outra bem mais sutil. No macho de Botucatu, três fenótipos possíveis para este DNA repetitivo foram observados (Figura 2 – D, E, F): três, cinco e seis sítios, respectivamente.

Hibridações com Sat19Han também apresentaram variações. Machos de *H. aff. ancistroides* apresentaram apenas dois sítios marcados, em cromossomos acrocêntricos, na região subtelomérica (Figura 3A), enquanto fêmeas variaram entre dois e cinco sítios (Figura 3 – B e C, respectivamente), sempre com um par bem evidente. Machos de *H. ancistroides* provenientes de Indaiatuba não mostraram hibridação com este satDNA, mas em fêmeas desta população observamos três sítios, onde um cromossomo sempre demonstrava marcação bem evidente (Figura 3D).

Os fenótipos para Sat27Han também foram variados. Cromossomos de machos de *H. aff. ancistroides* não hibridaram, mas cromossomos das fêmeas apresentaram apenas um sítio, localizado no maior acrocêntrico do complemento cromossômico em região centromérica (Figura 3E). Machos não demonstraram hibridação, mas fêmeas de *H. ancistroides*

provenientes de Araras apresentaram dois sítios, localizados também no maior acrocêntrico e em outro menor, também deste tipo cromossômico, ambos em região centromérica (Figura 3F).

Figura 2: FISH em metáfases de duas espécies de *Hypostomus* utilizando o Sat02Han como sonda. Machos (A) e fêmeas (B) de *H. aff. ancistroides* exibiram quatro sítios. Um cromossomos do macho demonstrou-se quase completamente formado por esta sequência (A - seta). Fêmeas de *H. ancistroides* provenientes de Araras (C) mostraram também a presença de quatro sítios. Machos de *H. ancistroides* de Botucatu exibiram três fenótipos: três (D), cinco (E) e seis (F) sítios. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (azul). Cabeças de setas indicam os sítios nos cromossomos.

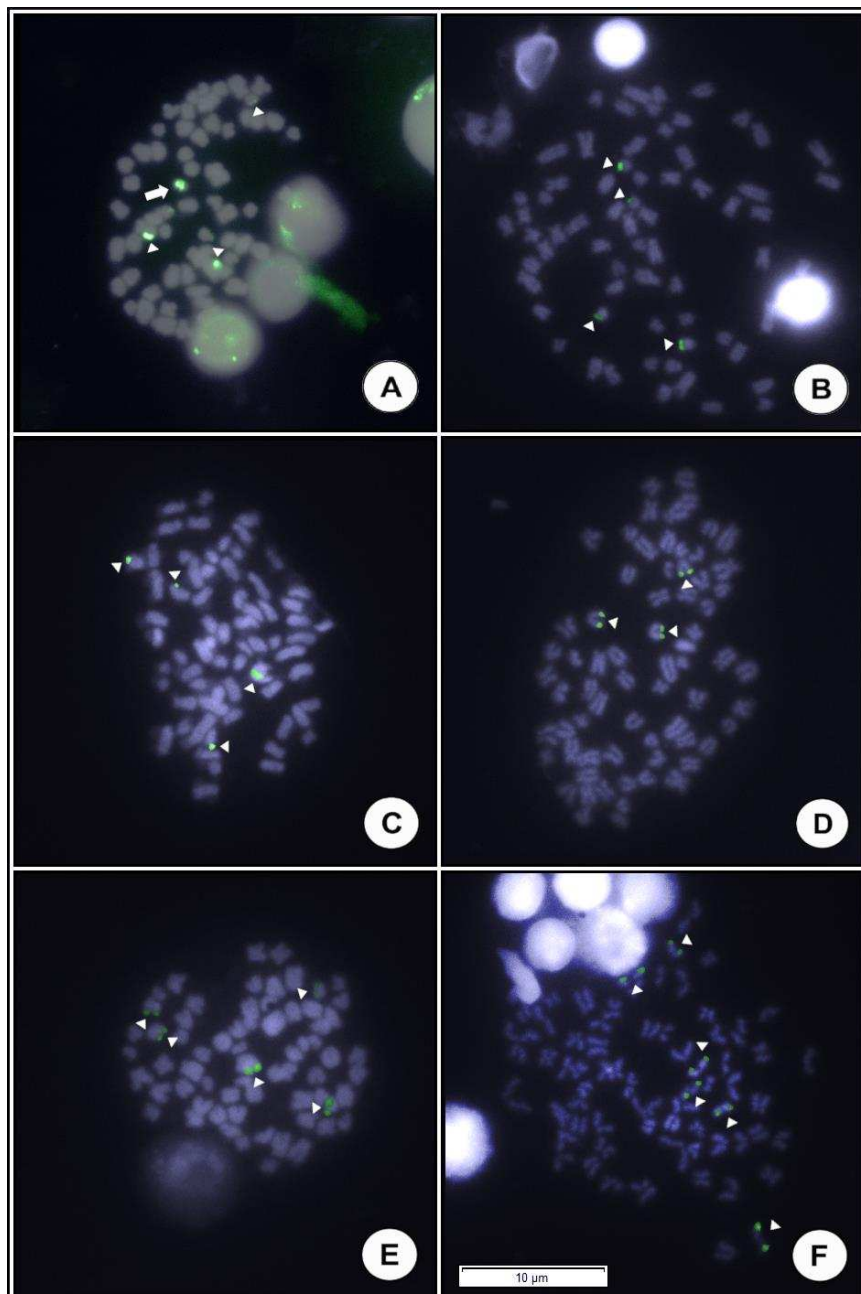
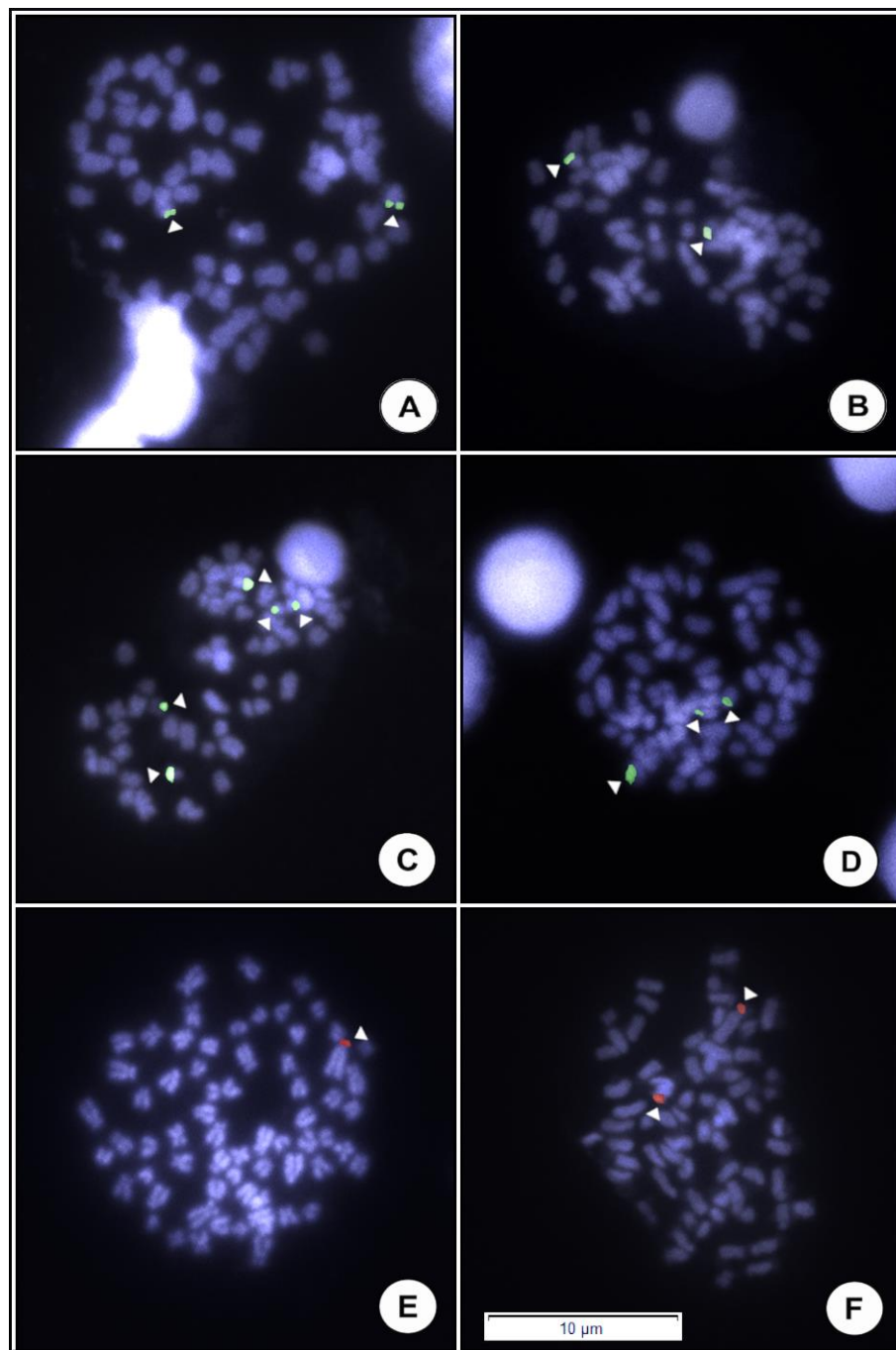


Figura 3: Metáfases de duas espécies de *Hypostomus* após técnica de FISH utilizando satDNAs como sondas. Machos (A) de *H. aff. ancistroides* apresentaram dois sítios de Sat19Han (marcações em verde), enquanto fêmeas variaram entre dois (B) e cinco (C) sítios para este satélite. Machos de *H. ancistroides* não apresentaram hibridação, mas fêmeas revelaram um fenótipo com três sítios (D). Com Sat27Han (marcações em vermelho), machos de nenhuma das espécies hibridaram, mas fêmeas de *H. aff. ancistroides* apresentaram uma marcação (E), enquanto fêmeas de *H. ancistroides* apresentaram dois sítios (F). Os cromossomos foram contrastados com DAPI (azul). Cabeças de setas indicam os sítios nos cromossomos.



A hibridação destes três satDNAs nas duas espécies reflete o que propõe a “Hipótese de Bibliotecas” (FRY, SALSER, 1977). Segundo ela, grupos de organismos relacionados compartilham uma biblioteca comum de sequências satélites que podem ser amplificadas em genomas distintos de forma independente. Porém, mesmo presentes em espécies relacionadas, satDNAs são sequências altamente dinâmicas e estão suscetíveis à mudanças bruscas que podem mudar sua distribuição e abundância (PLOHL *et al.*, 2012), incluindo não apenas níveis diferenciais de amplificação, mas também afetando a distribuição cromossômica. Utsunomia *et al.* (2017) trabalharam com bibliotecas de satDNAs na família Characidae e encontraram padrões parecidos, com amplificações diferenciais de alguns satDNAs em diferentes espécies de *Astyanax*, *Hyphessobrycon* e *Moenkhausia*.

Apenas fêmeas hibridaram com Sat27Han e apenas fêmeas de *H. ancistroides* mostraram sítios positivos para Sat19Han. Diferenças entre fenótipos com marcadores citogenéticos entre os sexos podem ser eventuais casos de sistemas cromossômicos sexuais putativos, entretanto, pelo baixo número de indivíduos analisados, ainda não há evidências suficientes para se afirmar tal fato. Novas hibridações são necessárias, aumentando o número de amostras para que seja possível explicar com maior clareza este padrão.

Apesar destes três satDNAs estarem presentes nas duas espécies, foram encontrados dois casos interessantes com os demais satélites analisados. Sat03Han não apresentou sinal em nenhum indivíduo de *H. aff. ancistroides* (Figura 4A), mas apresentou marcações em *H. ancistroides* em praticamente todos os cromossomos, quase sempre na região centromérica (Figura 4B). Já o Sat03HanXY hibridou apenas em *H. aff. ancistroides*, apresentando apenas um par de cromossomos marcados (Figura 4C), enquanto que *H. ancistroides* teve sinal negativo (Figura 4D).

Regiões pericentroméricas e subterminais são geralmente ricas em heterocromatinas – sequências repetitivas de DNA que são caracterizadas pela repetição de monômeros relativamente longos (LONG, DAWID, 1980; SINGER, 1982; SOUTHER, 1984) –, assim pode-se ter associação de heterocromatinas e sequências de satDNA. Como Sat03Han está predominantemente localizado nas regiões centroméricas de indivíduos de *H. ancistroides*, acredita-se que faça parte da composição geral da heterocromatina que permeia os centrômeros naturais para esta espécie, mas que são diferentes dos que seriam observados em *H. aff. ancistroides*. Desta forma, tem-se a hibridação diferencial.

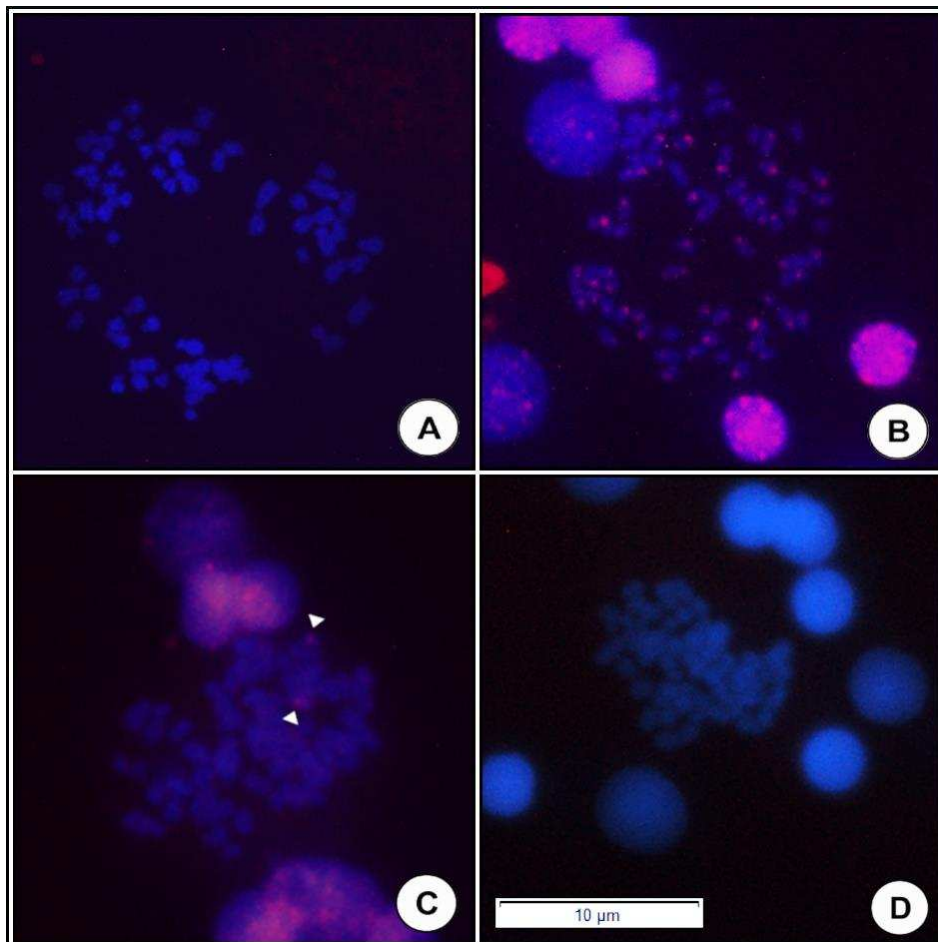
O fato de hibridarem apenas nas espécies em que foram isolados demonstra a especificidade que pode existir para tais sequências. Apesar de serem isolados de espécies

próximas, cada família de satDNA pode seguir um caminho evolutivo independente em cada espécie, tornando-se assim sequências repetitivas consideradas espécie-específicas.

O caso inverso também foi observado, onde dois satDNAs não hibridaram na espécie em que foram isoladas, mas apresentaram sinais positivos na outra espécie. Sat10HanXY mostrou-se negativo em *H. aff. ancistroides* (Figura 5A), mas apresentou dois sítios conspícuos em indivíduos de *H. ancistroides* (Figura 5B). Em contrapartida, Sat21Han hibridou apenas em *H. aff. ancistroides* (Figuras 5C), onde é possível visualizar quatro sítios conspícuos e quatro mais sutis, e nenhum sinal em *H. ancistroides* (Figura 5D).

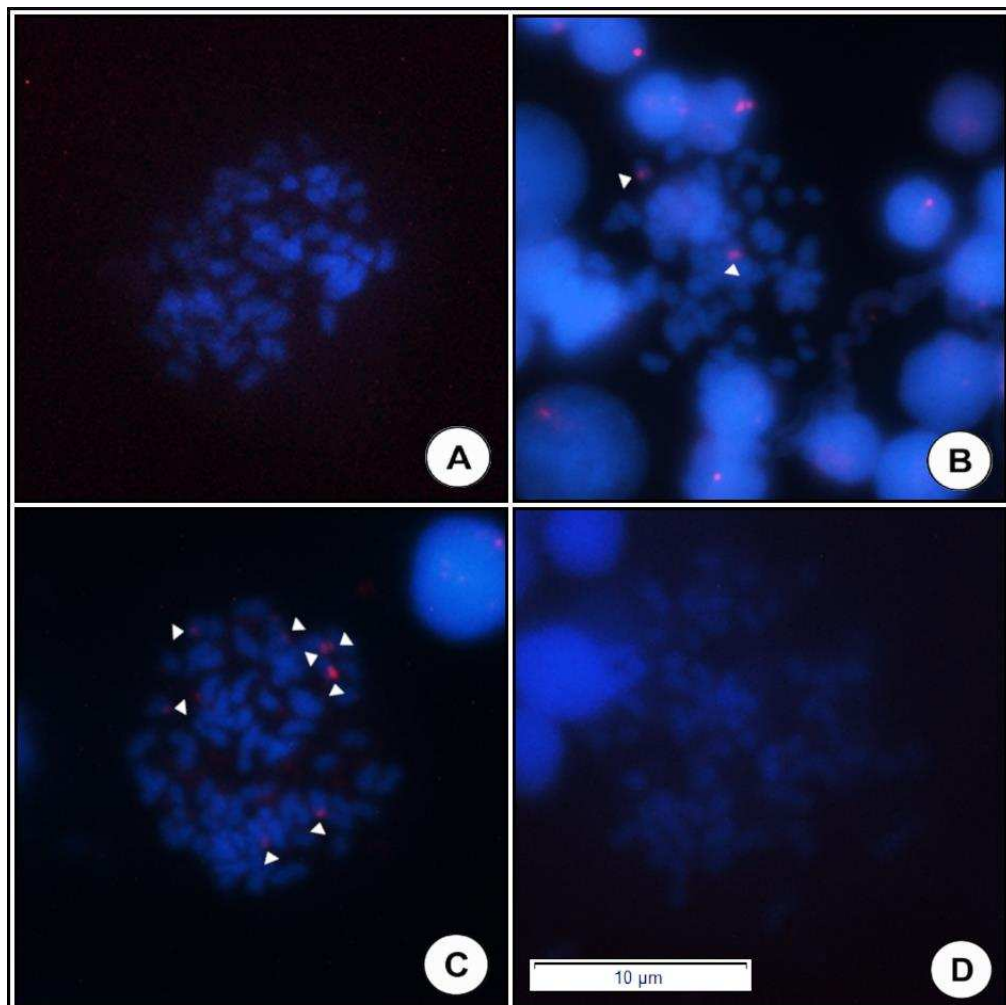
Figura 4: Fenótipos encontrados em cromossomos de duas espécies de *Hypostomus* após Hibridação *in situ* Fluorescente, utilizando sondas de DNA satélite (marcações em rosa). *H. aff. ancistroides* não apresentou hibridação (A) com Sat03Han, enquanto *H. ancistroides* (B) demonstrou sítios em quase todos os cromossomos na região centromérica. Com Sat03HanXY, *H. aff. ancistroides* exibiu um par de cromossomos marcados (C) e *H. ancistroides* não hibridou (D). Os cromossomos foram contrastados com DAPI (azul).

Cabeças de setas indicam os sítios nos cromossomos.



Esta discrepância na localização de Sat10HanXY e Sat21Han demonstra a diversidade que pode existir entre as famílias de DNA repetitivos. Garrido-Ramos (2017) destaca como podem apresentar padrões variados, visto que há mudanças quanto à localização, abundância, sequência de nucleotídeos e também, quando ao tamanho da unidade repetitiva. Desta forma, apesar de estarem presentes e serem abundantes no genoma das espécies em que foram isolados, estes satDNAs podem estar distribuídos de maneira muito dispersa, sendo pequeno o comprimento da unidade que se repete, tornando-os indetectáveis pela técnica de hibridação.

Figura 5: Metáfases de duas espécies de *Hypostomus* após técnica de FISH. Os DNAs satélites utilizados como sondas hibridaram de forma diferencial (marcações em rosa). Sat10HanXY não hibridou (A) em indivíduos de *H. aff. ancistroides*, mas apresentou dois sítios em *H. ancistroides*. Já com Sat21Han, *H. aff. ancistroides* apresentou diversos sítios (C), alguns conspícuos e outros sutis, enquanto *H. ancistroides* não exibiu marcações positivas (D). Os cromossomos foram contrastados com DAPI (azul). Cabeças de setas indicam os sítios nos cromossomos.



Não foram encontrados sítios específicos nem sinais de hibridação dos satDNAs analisados nos cromossomos sexuais de *H. aff. ancistroides*. Embora em peixes o surgimento destes cromossomos esteja relacionado com sua heterocromatinização (CIOFFI *et al.*, 2012), e que isto, por sua vez, estaria associado com a presença de DNAs repetitivos, na espécie analisada eles são quase inteiramente eucromáticos (ROCHA-REIS *et al.*, 2018). Como esta espécie é a única do complexo “*ancistroides*” que apresenta este sistema sexual até o momento, acredita-se que aliado ao fato de sua quase completa eucromatinização, a origem e diferenciação recentes dos cromossomos X e Y possam ser responsáveis pela ausência de satDNAs ou pela dificuldade de detecção. Na planta *Silene latifolia*, mesmo com análise de alto rendimento para DNAs repetitivos, Macas *et al.* (2011) encontraram baixa divergência na composição repetitiva entre os cromossomos sexuais, relacionando isso à sua origem recente. Desta forma, o acúmulo de satDNAs estaria ocorrendo em um estágio inicial da evolução dos cromossomos sexuais de *S. latifolia* (HOBZA *et al.*, 2006), e que a presença de repetitivos como microssatélites em vez de satDNAs, sugere que a disseminação desta classe de repetitivos antecede mudanças estruturais que ocorrem durante a evolução do cromossomo Y (KUBAT *et al.*, 2008). A investigação da presença de microssatélites nos cromossomos X e Y de *H. aff. ancistroides* poderia então, auxiliar na compreensão dos processos que permeiam a evolução dos cromossomos sexuais nesta espécie.

SatDNAs são consideradas sequências dinâmicas que podem sofrer mudanças rápidas e ser geralmente específicas para cada gênero ou espécie (GARRIDO-RAMOS *et al.*, 1999; de la HERRÁN *et al.*, 2001; LANFREDI *et al.*, 2001; LECLERC *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2006; ROBLES *et al.*, 2004). Toda essa especificidade de sequências ainda não permite que sejam traçadas tendências evolutivas bem embasadas para sequências repetitivas em peixes. Mas sem dúvida, a abordagem integrada de genômica e citogenética molecular pode auxiliar e muito em futuros trabalhos, mesmo com algumas limitações da técnica em detectar pequenas unidades repetitivas. Todos os satDNAs encontrados e validados, bem como os satelitomas completos das duas espécies representam grandes contribuições nos estudos citogenômicos para o gênero *Hypostomus*. Isso abre caminhos para comparações mais robustas e auxilia na busca para o entendimento da estrutura e funcionamento dos genomas de loricariídeos.

Agradecimentos

Os recursos computacionais para análise dos DNAs repetitivos foram fornecidos pelo projeto ELIXIR-CZ (LM2015047), parte da infraestrutura internacional do ELIXIR.

3.4 Referências

- AFGAN, E.; BAKER, D.; BATUT, B.; VAN DER BEEK, M.; BOUVIER, D.; CECH, M.; CHILTON, J.; CLEMENTS, D.; CORAOR, N.; GRÜNING, B. A.; GUERLER, A.; HILLMAN-JACKSON, J.; HILTERMANN, S.; JALILI, V.; RASCHE, H.; SORANZO, N.; GOECKS, J.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; BLANKENBERG, D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nuclei Acids Research**, v. 46, p. W537-W544, 2018.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; 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, p. 1-9, 2006.
- ALVES, A. L.; BORBA, R. S.; POZZOBON, A. P. B.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with discussion on the Ag-NOR evolution. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 315-321, 2012.
- ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v. 49, p. 81-90, 1996.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420, 2015.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114-2120, 2014.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. *In: Poluição e Piscicultura*. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo: Instituto de Pesca da Coordenadoria da Pesquisa de Recursos Naturais da Secretaria da Agricultura, 1972. p. 79-108.
- BUENO, V.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 241-250, 2012.
- CAMACHO, J. P. M.; RUIZ-RUANO, F., J.; MARTÍN-BLÁZQUEZ, R.; LÓPEZZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; LORITE, P. CABRAL DE MELLO, D. C.; BAKKALI, M. A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs. **Chromosoma**, v. 124, p. 263-275, 2015.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CHOO, K. H.; VISSSEL, B.; EARLE, E. Evolution of a-satellite DNA on human acrocentric chromosomes. **Genomics**, v. 5, p. 332-344, 1989.

CIOFFI, M. B.; MOREIRA FILHO-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BERTOLLO, L. A. C. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 80, p. 2125-2139, 2012.

ENDO, K. S.; MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; PAIVA, L. R. S.; JÚLIO JÚNIOR, H. F. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum – Biological Sciences**, v. 34, p. 181-189, 2012.

FERNANDES, C. A.; DAMÁSIO, J. F.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in species of family Loricariidae (Osteichthyes, Siluriformes) from Iguatemi river basin, Brazil. First cytogenetic report in *Farlowella amazonum* (Günther, 1864). **Caryologia**, v. 65, p. 276-280, 2012.

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS-a satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**, v. 12, p. 1069–1084, 1977.

GARRIDO-RAMOS, M. A.; DE LA HERRÁN, R.; JAMILÉNA, M.; LOZANO, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M. Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, p. 200–204, 1999.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An evolving topic. **Genes**, v. 8, p. E230, 2017.

GOLD, J. R.; LI, C.; SHIPLEY, N.; POWERS, P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, v. 37, p. 563-575, 1990.

de la HERRÁN, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUI REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. **Heredity**, v. 87, p. 691-697, 2001.

HOBZA, R.; LENGEROVA, M.; SVOBODA, J.; KUBEKOVA, H.; KEJNOVSKY, E.; VYSKOT, B. An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. **Chromosoma**, v. 115, p. 376–382, 2006.

HOLLANDA CARVALHO, P. H. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

HUBLEY, R.; FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R.; JONES, T. A.; BAO, W.; SMIT, A. F. A.; WHEELER, T. J. The Dfam database of repetitive DNA families. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. D81-D89, 2016.

JIANG, Y.; GAO, X.; LIU, S.; ZHANG, Y.; LIU, H.; SUN, F.; BAO, L.; WALDBIESER, G.; LIU, Z. Whole genome comparative analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with four model fish species. **BMC Genomics**, v. 14, p. 780, 2013.

- JOHN, B.; MIKLOS, G. L. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. **International Review of Cytology**, v. 58, p. 1-114, 1979.
- JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 462–467, 2005.
- KUBAT, Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, p. 350–356, 2008.
- LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; de la HERRÁN, R.; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M.; FONTANA, F. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. **Chromosome Research**, v. 9, p. 47–52, 2001.
- LARA KAMEI, M. C. D. S.; BAUMGÄRTNER, L.; PAIVA, S.; ZAWADZKI, C. H.; MARTINS-SANTOS, I. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. D. B. Chromosomal diversity of three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: a species complex in *Hypostomus ancistroides* reinforced by a ZZ/ZW sex chromosome system. **Zebrafish**, v. 14, p. 357-363, 2017.
- LECLERC, G. M.; HAN, K.; LECLERC, G. J.; ELY, B. Characterization of a highly repetitive sequence conserved among the North American Morone species. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 122–130, 1999.
- LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p.727–764, 1980.
- MACAS, J.; KEJNOVSKÝ, E.; NEUMANN, P.; NOVÁK, P.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; VYSKOT, B. Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model dioecious plant *Silene latifolia*. **PLoS ONE**, v. 6, p. e27335, 2011.
- MARTINS, C.; FERREIRA, I. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI, P. M. Jr. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, p. 133–141, 2006.
- MAURUTTO, F. A. M.; MANVAILER, L. F. S.; SCZEPANSKI, T. S.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**, v. 65, p. 340-346, 2012.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 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**, v. 29, p. 792-793, 2013.

- NOVÁK, P.; ROBLDILLO, L. A.; KOBLÍZKOVÁ, A.; VRBOVÁ, I.; NEUMANN, P.; MACAS, J. TAREAN: a computacional tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. e111, 2017.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; SERRANO, E. A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 477-489, 2013.
- PLOHL, M.; MEŠTROVIC, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. *In*: GARRIDO-RAMOS, M. A. (ed.). **Repetitive DNA**. Basel: Karger Publishers, 2012. p. 126–152.
- ROBLES, F.; de la HERRÁN, R.; LUDWIG, A.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. **Gene**, v. 338, p. 133–142, 2004.
- ROCHA-REIS, D. A.; de OLIVEIRA BRANDÃO, K.; de ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. The persevering cytogenomics: discovery of a unique XX/XY sex chromosome system in catfishes suggests the existence of a new, endemic and rare species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 156, p. 45-55, 2018.
- RUBERT, M.; DA ROSA, R.; JEREP, F. C.; BERTOLLO, L. A.; GIULIANOCAETANO, L. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**, v. 5: p. 397–410, 2011.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to IMAGEJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical *in situ* hybridization**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 203 p.
- SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**, v. 76, p. 67–112, 1982.
- SOUTHERN, E. M. DNA sequences and chromosome structure. **Journal of Cell Science Supplement**, v. 1, p. 31–41, 1984.
- TABOADA, X.; REY, M.; BOUZA, C.; VIÑAS, A. Cytogenomic analysis of several repetitive DNA elements in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Gene**, v. 644, p. 4-12, 2018.
- TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J. F.; LUI, R. L.; BARROS, A. V.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 463-471, 2013.
- UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; SILVA, D. M. Z. A.; SERRANO, E. A.; ROSA, I. F.; SCUDELER, P. E. S.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. A glimpse into the satellite DNA library in Characidae fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 103, 2017.

4 CAPÍTULO III – Diferentes padrões de metilação de DNA em duas espécies do complexo *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae)

Dinaíza Abadia Rocha-Reis, Karina de Olivera Brandão, Rubens Pasa, John Seymour (Pat)
Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher, Karine Frehner Kavalco

RESUMO

Em eucariotos, a metilação do DNA ocorre exclusivamente em resíduos de citosina e apresenta padrões diferentes entre espécies animais, que variam de pequenos mosaicos à metilação global. Normalmente, porções metiladas são coincidentes com regiões repetitivas, como àquelas ricas em heterocromatinas, e acredita-se que estejam relacionadas com o silenciamento de genes adjacentes. O objetivo deste trabalho foi identificar os padrões de metilação existentes em duas espécies de cascudos do complexo de espécies crípticas *Hypostomus ancistroides*, todos provenientes na bacia do Alto rio Paraná. A detecção de regiões metiladas foi realizada usando imunocoloração com anticorpo monoclonal anti-5-metilcitosina. Indivíduos de *H. ancistroides* apresentaram um padrão correspondente entre metilações e regiões de heterocromatina. Entretanto, indivíduos de *H. aff. ancistroides* apresentaram em quase todos os cromossomos do complemento marcações positivas. Houve diferenças entre machos e fêmeas, com o macho apresentando o complemento cromossômico hipermetilado e as fêmeas com marcações em menor quantidade, onde são observados cromossomos com pouca metilação ou com apenas regiões centroméricas ou subterminais metiladas. Os cromossomos sexuais X e Y desta população foram identificados como quase completamente metilados, o que sugere a inativação de genes, embora mostrem-se pouco ou totalmente eucromáticos em bandamentos C. Apesar da existência de estudos que identifiquem a localização de regiões metiladas nos genomas, a sua influência e como ocorre sua interação nos cariótipos ainda não são bem conhecidas em peixes. As variações existentes podem refletir em diferenças no papel que desempenham nas histórias evolutivas de cada grupo e precisam ser investigadas.

Palavras-chave: Anti-5-MeC, Heterocromatina, Sistema Cromossômico Sexual.

**CHAPTER III – Different patterns of DNA methylation in two species of the complex
Hypostomus ancistroides (Siluriformes, Loricariidae)**

Dinaíza Abadia Rocha-Reis, Karina de Olivera Brandão, Rubens Pasa, John Seymour (Pat)
Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher, Karine Frehner Kavalco

ABSTRACT

In eukaryotes, the methylation of DNA it occurs exclusively in cytosine residues and presents different patterns between animal species, ranging from small mosaics to global methylation. Usually, methylated portions are coincident with repetitive regions, such as those rich in heterochromatin, and are believed to be related to the silencing of adjacent genes. The objective of this work was to identify the methylation patterns existing in two species of armoured catfish of the cryptic species complex *Hypostomus ancistroides*, all from the Upper Paraná River basin. The detection of methylated regions was performed using immunostaining with a monoclonal anti-5-methylcytosine antibody. *H. ancistroides* individuals showed a corresponding pattern between methylations and heterochromatin regions. However, individuals of *H. aff. ancistroides* showed positive markings in almost all chromosomes. There were differences between males and females, with the male presenting the hypermethylated chromosome complement and the females with lesser markings, where chromosomes with little methylation or with only methylated centromeric or subterminal regions were observed. The sex chromosomes X and Y of this population have been identified as almost completely methylated, which suggests the inactivation of genes, although they show little or totally euchromatic in C banding. Despite the existence of studies that identify the location of methylated regions in genomes, their influence and how their interaction occurs in karyotypes are still not well known in fish. These variations may reflect differences in the role they play in the evolutionary histories and need to be investigated.

Key words: Anti-5-MeC, Heterochromatin, Sexual Chromosome System.

4.1 Introdução

Complexos de espécies crípticas são grupos de duas ou mais espécies que podem ser classificadas como somente uma (BICKFORD *et al.*, 2007), visto que a morfologia dos organismos é muito semelhante. Entretanto, características genéticas podem não estar em concordância com tais dados. *Hypostomus ancistroides* é considerada um complexo de espécies, pois são encontrados diversos morfotipos nas bacias hidrográficas que abrangem sua área de distribuição (HOLLANDA CARVALHO, 2011). Apesar da morfologia semelhante dos indivíduos, há variação de número diploide e cada população descrita na literatura apresenta uma fórmula cariotípica própria (ROCHA-REIS *et al.*, submetido)⁷.

Rocha-Reis *et al.* (2018) descrevem uma população coletada no rio Paranapanema (município de São Miguel Arcanjo, estado de São Paulo) que apresenta características únicas: diminuição do número cromossômico, padrões cariotípicos e estruturação molecular diferenciada das demais populações, e ainda, um sistema sexual simples XX/XY único para a espécie. Ainda de acordo com esses autores, esta seria uma unidade evolutiva diferente de todo o restante das populações do complexo “*Hypostomus ancistroides*”, e que precisa de mais estudos para compreender o surgimento desse sistema neo-XY.

Em eucariotos, a metilação do DNA é encontrada exclusivamente em resíduos de citosina (LI *et al.*, 1992), e para entender sua função no genoma é preciso conhecimento de sua distribuição (BIRD, 2002). Em animais, os padrões encontrados são bastante variáveis, principalmente entre invertebrados e vertebrados. Em *Caenorhabditis elegans*, são indetectáveis citosinas marcadas e DNA metiltransferase convencional (BIRD, 2002). Em *Drosophila melanogaster*, encontram-se baixos níveis de metilação e genes semelhantes àqueles que codificam metiltransferases de DNA (GOWHER *et al.*, 2000; LYKO *et al.*, 2000). No outro extremo, existem os vertebrados que possuem um padrão conhecido como global, onde a metilação está distribuída em grande parte do genoma (BIRD, 2002).

Acredita-se que a metilação do DNA seja um mecanismo de controle de expressão gênica (BASHKEEL *et al.*, 2019; CEDAR, 1988; IRVINE *et al.*, 2002; KASS *et al.*, 1997; WAGNER *et al.*, 2014), permitindo maior ou menor expressão de determinados genes. Em mamíferos, foi encontrada grande relação entre sequências metiladas e silenciamento de genes (EDEN, CEDAR, 1994; GREENBERG, BOURC’HIS, 2019; MOORE *et al.*, 2013; YODER *et al.*,

⁷ High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from the Paraná River basin, de autoria de Rocha-Reis, D. A.; Pasa, R.; Kavalco, K. F. Submetido ao jornal científico periódico *Organisms Diversity and Evolution*.

1997; WEBER *et al.*, 2007). Também estão normalmente associadas a regiões de heterocromatina, como em lampréias do mar (*Petromyzon marinus*), que apresentaram maior metilação em heterocromatinas ricas em GC em linhagem germinativa e em menor nível em cromossomos somáticos (COVELO-SOTO *et al.*, 2014). Já em plantas como *Arabidopsis thaliana*, transposons e elementos repetitivos estão sujeitos à metilação direcionada como forma de defesa do genoma (SUZUKI, BIRD, 2008). Desta forma, como metilações são comuns em sequências repetitivas e cromossomos sexuais estão normalmente envolvidos com acumulação de heterocromatina (CIOFFI *et al.*, 2012), espera-se que cromossomos heteromórficos entre os sexos apresentem um padrão metilado.

O objetivo deste trabalho foi identificar os padrões de metilação em duas espécies de peixes do complexo *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae) e avaliar as possíveis diferenças existentes entre as espécies e indivíduos. Para tal, o padrão de metilação foi comparado entre indivíduos machos e fêmeas de espécies com ausência (*Hypostomus ancistroides*) e presença (*Hypostomus* aff. *ancistroides*) de sistema cromossômico sexual simples XX/XY.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Locais de coleta e amostragem

Espécimes de *Hypostomus* aff. *ancistroides* e *Hypostomus ancistroides* foram coletados na bacia do Alto rio Paraná (Tabela 1, ANEXO A). Os procedimentos de captura e eutanásia foram realizados em concordância com as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil. Todos os exemplares e seus materiais biológicos retirados fazem parte do Banco de Tecido, Suspensão Celular e DNA do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo) da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba e possuem número de voucher. Os indivíduos utilizados na análise possuíam mesma idade, foram mantidos nas mesmas condições fisiológicas e processados sob circunstâncias idênticas, visando minimizar qualquer variação relacionada à maturação, meio externo ou manuseio do material.

4.2.2 Preparações cromossômicas e técnicas citogenéticas

Para as análises citogenéticas, cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior dos exemplares de acordo com Gold *et al.* (1990), com algumas modificações. A detecção da heterocromatina constitutiva foi realizada segundo Sumner (1982), também com algumas modificações (ANEXO C).

As metáfases foram analisadas e fotografadas com microscópio óptico Olympus BX 41 com auxílio do software QCapture Pro 6.0. As imagens foram editadas utilizando os softwares GIMP 2.10.12 (GNU Image Manipulation Program – www.gimp.org) e Photoshop 9.0 e os tipos cromossômicos foram estabelecidos segundo a razão dos braços conforme Levan *et al.* (1964).

Tabela 1: Detalhes da localização dos pontos de coleta e dos indivíduos utilizados.

Espécie	Município	Coordenadas geográficas		Bacia hidrográfica
<i>H. aff. ancistroides</i>	São Miguel Arcanjo	23°54'14.30"S	47°55'46.75"O	Paranapanema
	Araras	22°22'59.64"S	47°25'49.50"O	Tietê
<i>H. ancistroides</i>	Botucatu	22°52'29.15"S	48°22'27.50"O	Tietê
	Indaiatuba	23°05'39.12"S	47°15'38.16"O	Tietê
	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Grande

4.2.3 Imunocoloração de anti-5-metilcitosina (anti-5-MeC)

Os padrões de metilação de DNA em metáfases cromossômicas foram detectados utilizando anticorpo monoclonal anti-5-metilcitosina mAb (162 33 D3) Calbiochem. A imunocoloração foi realizada segundo protocolo descrito por Borowska *et al.* (2011), com modificações. Os materiais foram fixados em solução de metanol/ácido acético (3:1) por 30 minutos em temperatura ambiente, com posterior desidratação em etanol 100% por 5 minutos. As lâminas foram fixadas em solução de formaldeído (1% formaldeído/1xPBS/MgCl₂ 50mM) por 10 minutos e novamente desidratadas em série alcoólica com etanol 70%, 80% e 100% por dois minutos cada. A desnaturação ocorreu com solução de 40% formamida por 3 minutos a 75°C em câmara de hibridação, seguida de quatro lavagens em 2xSSC. O tampão de bloqueio era composto por 0,5% BSA diluído em 1xKPBS com 0,5% de Tween-20, e foi incubado nas lâminas por uma hora em câmara úmida a 37°C. Após remoção deste tampão, as lâminas foram incubadas com solução de anticorpo primário de anti-5-metilcitosina, diluído em 1xPBS/0,5% Tween-20/0,1% BSA (1:250), e mantidas em câmara úmida a 4°C overnight. A detecção do anticorpo primário foi realizada com Alexa 488 anti-mouse IgG diluído em 1xPBS/0,5% Tween-20/0,1% BSA (1:200), com incubação por 90 minutos em câmara úmida a 37°C. Finalmente as lâminas passaram por lavagens em 1xPBS/0,5% Tween-20 e foram montadas com solução de DAPI/antifade. As análises foram realizadas em Fotomicroscópio

Monocromático Olympus BX5.3. As imagens capturadas foram editadas com os softwares Image J 1.52a (SCHNEIDER *et al.*, 2012) e GIMP 2.10.12 (GNU Image Manipulation Program – www.gimp.org).

4.3 Resultados

Os complementos cromossômicos das espécies analisadas foram determinados com base em coloração com Giemsa. Indivíduos de *H. aff. ancistroides* possuem 66 cromossomos (ROCHA-REIS *et al.*, 2018), com heteromorfismo relacionado ao sexo, caracterizando um sistema cromossômico sexual do tipo XX/XY. Todos os indivíduos de *H. ancistroides* apresentaram $2n = 68$ (KAVALCO *et al.*, submetido)⁸, com variação de fórmulas cariotípicas entre populações de diferentes localidades.

Os fenótipos de heterocromatina constitutiva mostram, de uma forma geral, bandas conspícuas e sutis, localizadas normalmente em regiões subterminais e pericentroméricas de vários cromossomos do complemento (Figura 1). Em *H. aff. ancistroides*, os cromossomos X apresentam bloco conspícuo no braço longo em região terminal em ambos os sexos, enquanto o Y apresenta-se totalmente eucromático (Figura 1A e 1B - caixas, *apud* Rocha-Reis *et al.*, 2018).

A partir da imunocoloração observamos hipermetilação em indivíduos de *H. aff. ancistroides*, tanto em fêmeas quanto em machos, em contraste com as demais espécies (Figuras 2 e 3). Encontramos ainda diferenças entre os sexos em *H. aff. ancistroides*, uma vez que o macho apresenta todos os cromossomos com padrão hipermetilado e a fêmea apresenta alguns cromossomos hipermetilados, além de algumas marcações discretas, presentes apenas no braço curto ou longo, ou em maior quantidade nos centrômeros (Figura 2A e 2B, Figura 4). Detalhe para os cromossomos sexuais X e Y, que apresentam-se quase completamente metilados (Figura 4 – caixas).

Figura 1: Cariótipos em Giemsa de duas espécies de *Hypostomus* após técnica de bandamento C. Os blocos mais escuros nos cromossomos indicam regiões de heterocromatina constitutiva. Em (A) e (B), fêmea e macho, respectivamente, de *H. aff. ancistroides*, evidenciando o heteromorfismo de sexo. Cromossomos sexuais estão nas caixas. Em seguida, cariótipo de *H. ancistroides* para Araras (C), Botucatu (D), Indaiatuba (E) e Terra Roxa (F).

⁸ Chromosomal Radiation: a model to explain karyotypic diversity in cryptic species, de autoria de KAVALCO, K. F.; ROCHA-REIS, D. A.; BRANDÃO, K. O.; DERGAM, J. A.; PASA, R. Submetido ao jornal científico periódico Heredity.

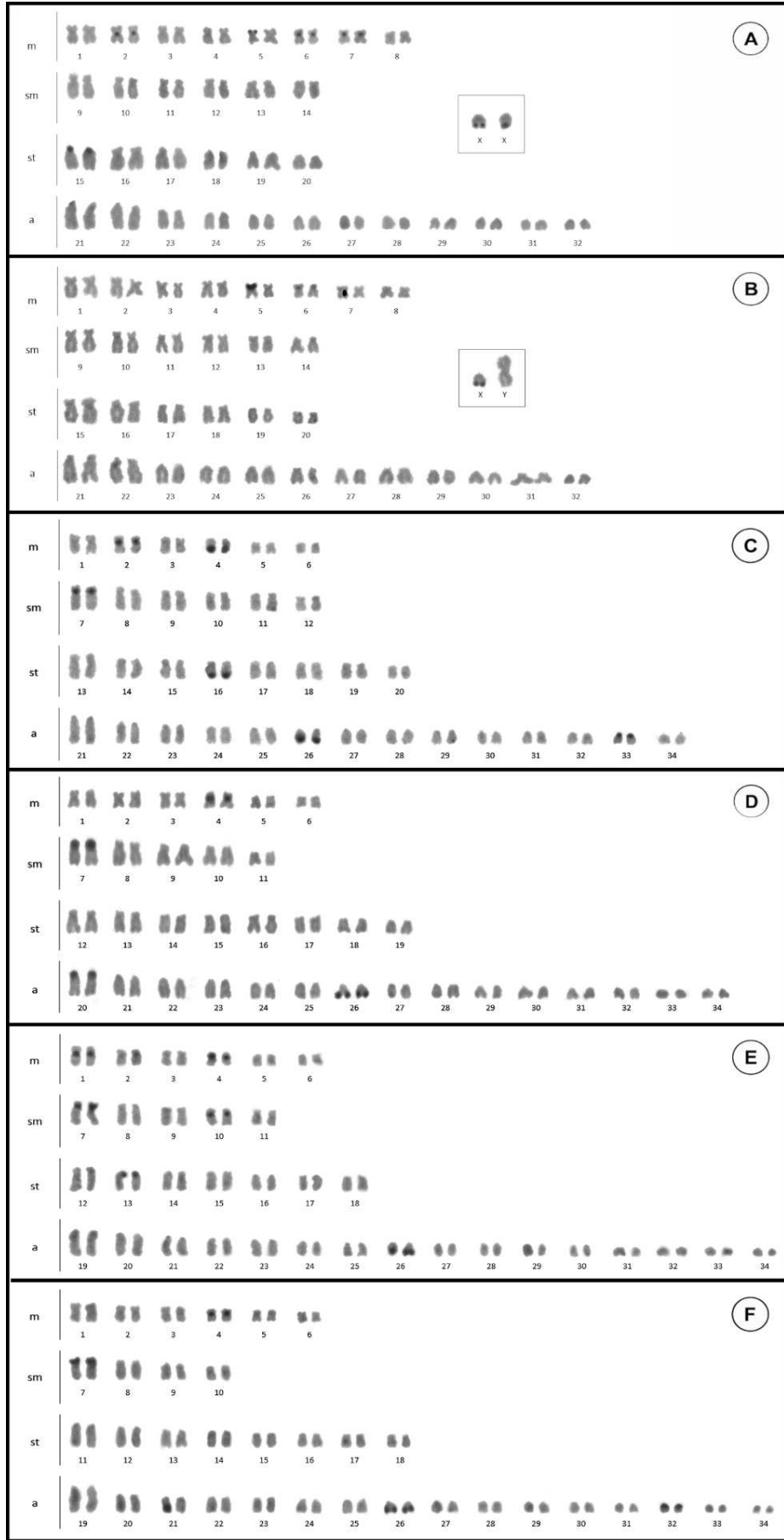
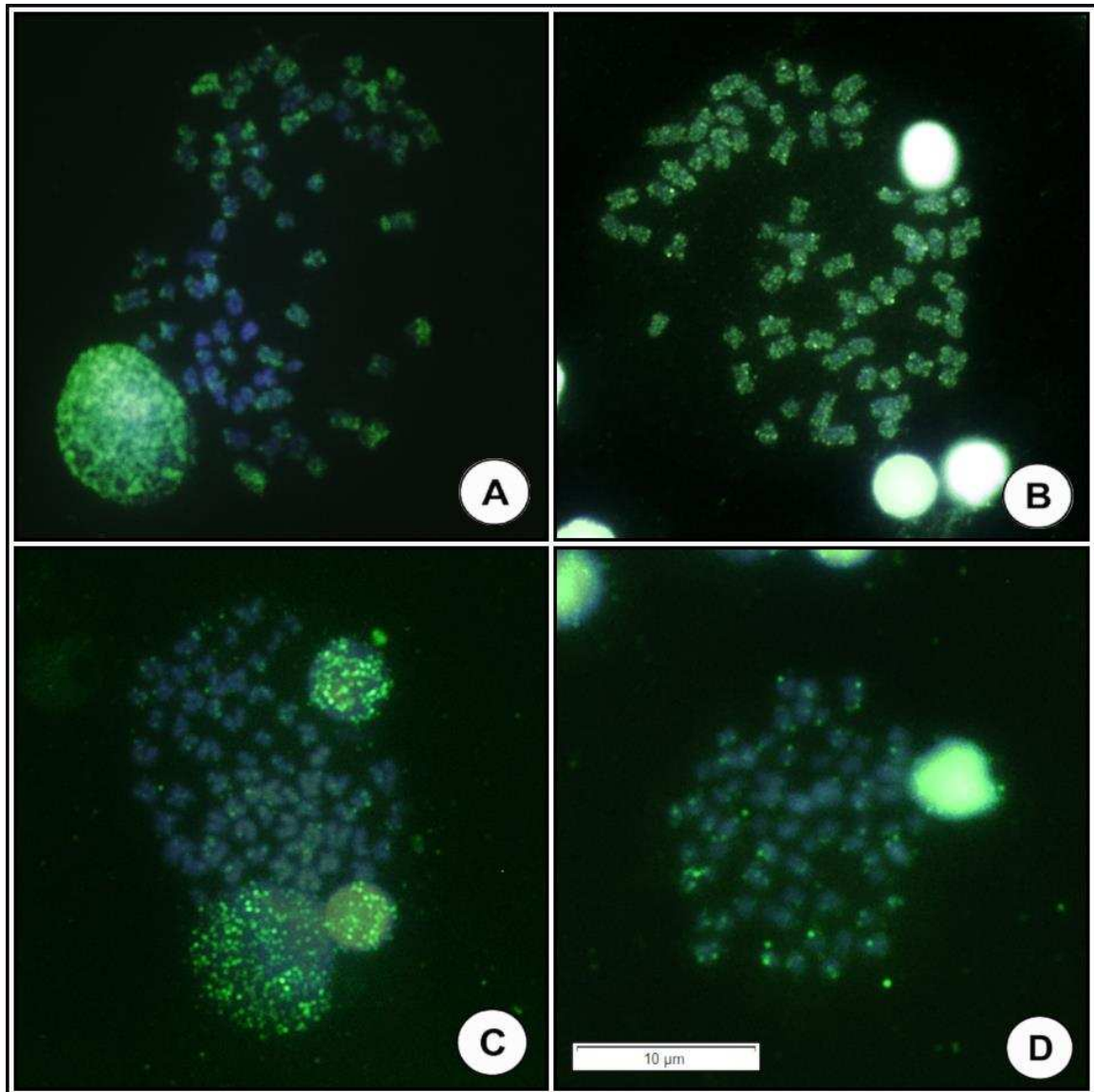


Figura 2: Padrões de metilação encontrados para as duas espécies de *Hypostomus* analisadas.

Regiões em verde representam imunocoloração positiva à anti-5-MeC, enquanto os cromossomos estão em azul pelo uso de DAPI. Fêmea (A) e macho (B) de *H. aff. ancistroides* apresentaram padrões diferenciados entre si, enquanto fêmea (C) e macho (D) de *H. ancistroides* apresentaram padrão semelhante.

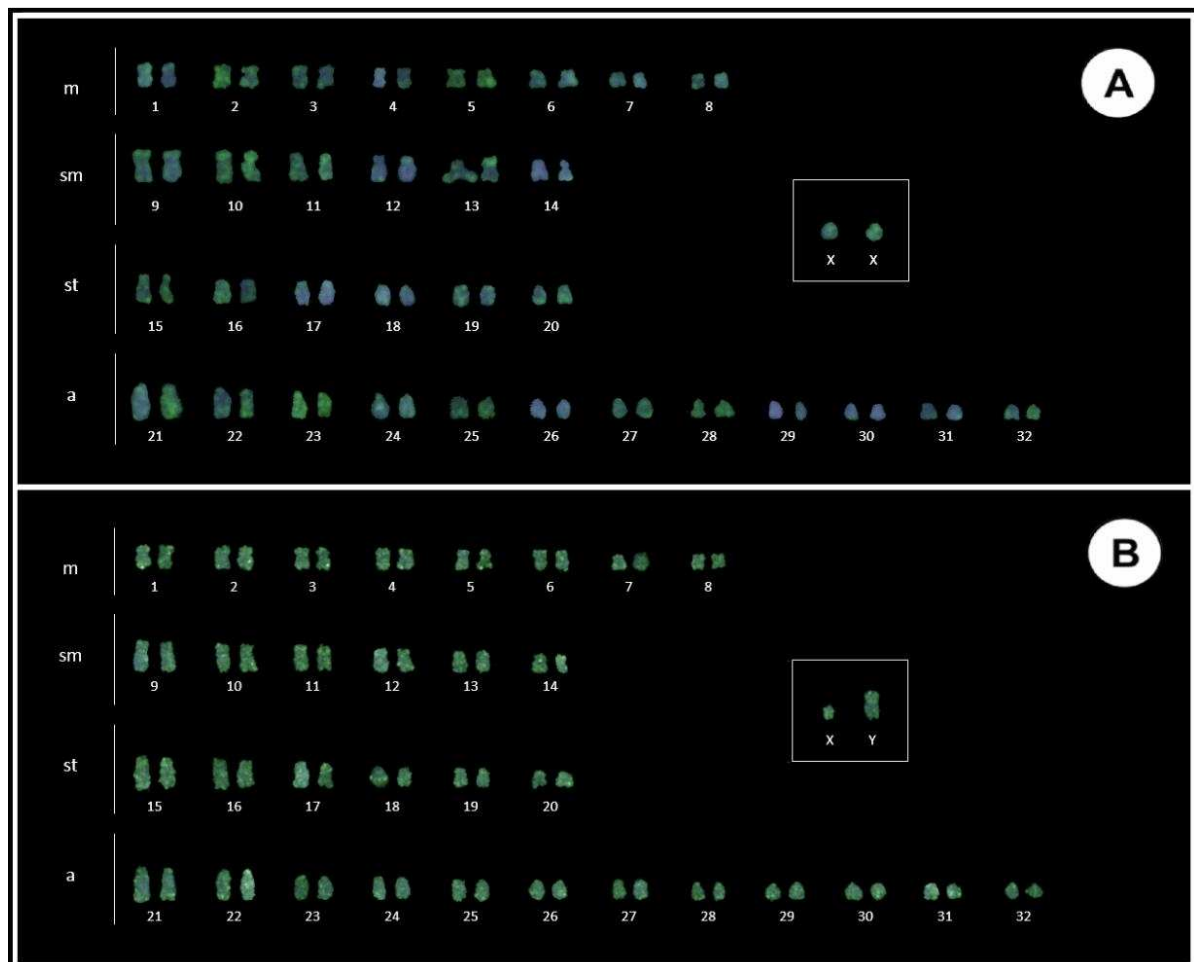


4.4 Discussão

Os trabalhos que abordam padrões de metilação do DNA a nível citogenético em peixes são escassos. Almeida-Toledo *et al.* (1998) trabalharam com indivíduos diploides e triploides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) produzidos artificialmente e identificaram apenas duas regiões positivas para anti-5-MeC, que eram coincidentes com marcações de heterocromatina constitutiva. Schmid *et al.* (2015) também observaram padrões coincidentes de metilação e

heterocromatina constitutiva em nove espécies de Characiformes. Entretanto, algumas regiões com fluorescência intensa de metilação exibiram bandas C fracas ou moderadas. Além disso, todos os cromossomos sexuais presentes nestas nove espécies, sejam XY ou ZW também apresentaram padrões de hipermetilação da heterocromatina. Já Motta-Neto *et al.* (2018) identificaram padrões de hipermetilação em duas espécies de *Bodianus* (Labridae) mais parecidos com o que encontramos, onde a maioria dos cromossomos apresentavam regiões positivas.

Figura 3: Cariótipos de fêmea (A) e macho (B) de *H. aff. ancistroides* demonstrando a diferenciação nos padrões de metilação entre os sexos. Cromossomos sexuais estão nas caixas. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (em azul), enquanto regiões em verde representam imunocoloração positiva à anti-5-MeC.



A princípio, é possível observar uma forte relação entre heterocromatina constitutiva e regiões metiladas. Isto é esperado, visto que tais regiões são ricas em sequências repetitivas de DNA, que podem ser muito longas e que não são transcritas (LONG, DAWID, 1980; SINGER,

1982; SOUTHER, 1984), tornando-as mais vulneráveis a processos de metilação sem consequência fenotípica para o indivíduo, uma vez que estariam silenciadas. A baixa pressão seletiva nestas regiões permite que ocorra variação no genoma das espécies, e isto está paralelo às mudanças rápidas nos padrões de metilação que são observados (SCHMID *et al.*, 2015).

Este modelo de associação entre heterocromatina e metilação explica parte dos fenótipos encontrados neste trabalho. Em *H. ancistroides* pode ocorrer relação e/ou coincidência destas regiões (detalhes em Figura 1C, D, E e F; Figura 2C e 2D), apesar de ser evidente que a metilação aparece de forma quantitativamente maior que o bandamento C - resultados semelhantes àqueles encontrados por Schmid *et al.* (2015). Infelizmente, pela qualidade dos cromossomos obtidos, não foi possível determinar em quais cromossomos dos complementos são observadas metilações. Assim, pode-se inferir que as regiões marcadas positivamente com anti-5-MeC podem corresponder à heterocromatina constitutiva rica em GC em *H. ancistroides*.

Entretanto, o padrão de metilação encontrado para *H. aff. ancistroides* é global, semelhante ao encontrado por Motta-Neto *et al.* (2018) e mais comumente encontrado para vertebrados, distribuído por quase todo o genoma (BIRD, 2002). Além disso, como Rocha-Reis *et al.* (2018) propôs, esta população é morfologicamente semelhante à *H. ancistroides*, mas apresenta peculiaridades que sugerem que se trate de uma nova espécie a ser descrita. Os indivíduos desta população apresentam diminuição do número diploide, sistema cromossômico sexual único para o morfótipo (XX/XY) e monofiletismo molecular fortemente estruturado (ROCHA-REIS *et al.*, 2018). Essas diferenças, aliadas ao padrão completamente diferente de metilação, reforçam sua diferente posição filogenética e seu reconhecimento como uma unidade evolutiva significativa. Além disso, indicam que os processos de metilação de DNA podem estar envolvidos na diferenciação genética da população e no surgimento do sistema sexual, observado apenas nesta população até o momento.

Os fenótipos de anti-5-MeC encontrados em fêmeas e machos de *H. aff. ancistroides* foram diferentes entre si em todas as metáfases analisadas (Figura 2A e 2B; Figura 4). Como observado por Schmid *et al.* (2015), cromossomos sexuais podem revelar-se positivos à metilação, coincidindo com regiões heterocromáticas. No presente estudo, os cromossomos X analisados possuem blocos de heterocromatina constitutiva apenas na região subterminal do braço longo, enquanto o Y apresenta-se totalmente eucromático (Figura 1A e 1B – caixas), em contraste com os padrões completamente metilados encontrados (Figura 4A e 4B – caixas). Como a metilação pode ser considerada um controlador de expressão gênica, ela pode estar silenciando regiões gênicas nestes cromossomos sexuais e, neste sentido, não importaria que os

cromossomos tivessem grandes porções ou fossem totalmente eucromáticos, haveria inibição de transcrição dos genes.

Como os padrões de metilação encontrados não são coincidentes com os fenótipos de bandamento C para *H. aff. ancistroides*, deve existir outro mecanismo que explique os padrões hipermetilados observados. Jabbari *et al.* (1997) encontraram relação entre temperatura corporal e níveis de metilação em grupos de vertebrados. Neste sentido, grupos como peixes e anfíbios possuiriam maiores níveis de metilação, enquanto répteis, aves e mamíferos apresentariam um padrão menos metilado. Varriale e Bernardi (2006) discutem que este menor nível de metilação em vertebrados de “sangue quente” seja devido à uma maior taxa de desaminação relacionada à maior temperatura corporal. Estes autores ainda compararam os padrões de metilação entre peixes que habitam águas com diferentes temperaturas, e encontraram que peixes de regiões polares apresentam níveis de metilação de DNA mais altos que peixes de regiões temperadas/tropicais, e estes últimos ainda apresentam níveis maiores que aves e mamíferos. Assim, há uma relação inversa entre metilação de DNA e temperatura corporal (VARRIALE E BERNARDI, 2006).

A metilação de DNA é um processo epigenético que pode modificar a evolução genética e/ou cariotípica dos organismos (MOTTA-NETO *et al.*, 2018). Entretanto, apesar de ser crescente o número de estudos identificando sua localização, a sua influência e a sua interação nos cariótipos ainda não são bem conhecidas em peixes. É fato que os padrões observados podem seguir uma tendência, como a coincidência com regiões heterocromáticas, porém estas variam entre indivíduos, populações e espécies. Esta variação pode refletir em diferenças no papel que as metilações desempenham nas histórias evolutivas de cada grupo e precisam ser mais bem estudadas para que se possa estabelecer modelos que auxiliem na compreensão deste importante processo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos por todo suporte e disponibilidade do uso do fotomicroscópio presente no Laboratório de Sistemática Molecular – BEAGLE da Universidade Federal de Viçosa.

4.5 Referências

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; COUTINHO-BARBOSA, A. C.; FORESTI, F.; NIVELEAU, A.; DE ALMEIDA TOLEDO-FILHO, S. Localization of 5-methylcytosine in metaphase chromosomes of diploid and triploid pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 83, p. 21-24, 1998.
- BASHKEEL, N.; PERKINS, T. J.; KAEM, M.; LEE, J. M. Human gene expression variability and its dependence on methylation and aging. **BMC Genomics**, v. 20, p. 941, 2019.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K.; MEIER, R.; WINKER, K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, p. 148-155, 2007.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, p. 6-21, 2002.
- BOROWSKA, N.; IDZIAK, D.; HASTEROK, R. DNA methylation patterns of *Brachypodium distachyon* chromosomes and their alteration by 5-azacytidine treatment. **Chromosome Research**, v. 19, p. 955-967, 2011.
- CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell**, v. 53, p. 3–4, 1988.
- CIOFFI, M. B.; MOREIRA FILHO-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BERTOLLO, L. A. C. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 80, p. 2125-2139, 2012.
- COVELO-SOTO, L.; MORÁN, P.; PASANTES, J. J.; PÉREZ-GARCÍA, C. Cytogenetic evidences of genome rearrangement and differential epigenetic chromatin modification in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). **Genetica**, v. 142, p. 545–554, 2014.
- EDEN, S.; CEDAR, H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, p. 255–259, 1994.
- GOLD, J. R.; LI, C.; SHIPLEY, N.; POWERS, P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, v. 37, p. 563-575, 1990.
- GOWHER, H.; LEISMANN, O.; JELTSCH, A. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 6918–6923, 2000.
- GREENBERG M. V. C.; BOURC'HIS, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 590-607, 2019.
- HOLLANDA CARVALHO, P. H. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

- IRVINE, R. A.; LIN, I. G.; HSIEH, C. L. DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 6689-6696, 2002.
- JABBARI, K.; CACCIÒ, S.; BARROS, J. P. P.; DESGRÈS, J.; BERNARDI, G. Evolutionary changes in CpG and methylation levels in the genome of vertebrates. **Gene**, v. 205, p. 109-118, 1997.
- KASS, S. U.; LANDSBERGER, N.; WOLFFE, A. P. DNA methylation directs a time dependent repression of transcription initiation. **Current Biology**, v. 7, p. 157-165, 1997.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.
- LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, p. 915-926, 1992.
- LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p.727-764, 1980.
- LYKO, F.; RAMSAHOYE, B. H.; JAENISCH, R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 408, p. 538-540, 2000.
- MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 23-38, 2013.
- MOTTA-NETO, C. C.; MARQUES, A.; COSTA, G. W. W. F.; CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C.; SOARES, R. X.; SCORTECCI, K. C.; ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F. Differential hypomethylation of the repetitive *Tol2/Alu*-rich sequences in genome of *Bodianus* species (Labriformes, Labridae). **Comparative Cytogenetics**, v. 12, p. 145-162, 2018.
- ROCHA-REIS, D. A.; de OLIVEIRA BRANDÃO, K.; de ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. The persevering cytotaxonomy: discovery of a unique XX/XY sex chromosome system in catfishes suggests the existence of a new, endemic and rare species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 156, p. 45-55, 2018.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; YANO, C. F.; CIOFFI, M. B. Hypermethylated chromosome regions in nine fish species with heteromorphic sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 147, p. 169-178, 2015.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to IMAGEJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.
- SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**, v. 76, p. 67-112, 1982.
- SOUTHERN, E. M. DNA sequences and chromosome structure. **Journal of Cell Science Supplement**, v. 1, p. 31-41, 1984.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 465-476, 2008.

VARRIALE, A.; BERNARDI, G. DNA methylation and body temperature in fishes. **Gene**, v. 385, p. 111-121, 2006.

WAGNER, J. R.; BUSCHE, S.; GE, B.; KWAN, T.; PASTINEN, T.; BLANCHETTE, M. The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts. **Genome Biology**, v. 15, p. R37, 2014.

WEBER, M.; HELMANN, I.; STADLER, M. B.; RAMOS, L.; PÄÄBO, S.; REBHAN, M.; SCHÜBELER, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature Genetics**, v. 39, p. 457-466, 2007.

YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends in Genetics**, v. 13, p. 335-340, 1997.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os genomas mitocondriais de *Hypostomus* aff. *ancistroides* e *Hypostomus ancistroides* apresentam mesma organização dos demais vertebrados, com mesmo arranjo e número de genes. Entretanto, as diferenças encontram-se nas regiões não codificantes, o D-loop, com *H. ancistroides* apresentando 321 pb excedentes quando comparado à *H. aff. ancistroides*, responsável também pela diferença dos tamanhos totais dos mitogenomas. Além disso, a topologia da árvore filogenética utilizando os 13 genes codificadores de proteínas demonstra a localização das duas espécies em ramos diferentes, reforçando a diferenciação entre elas.

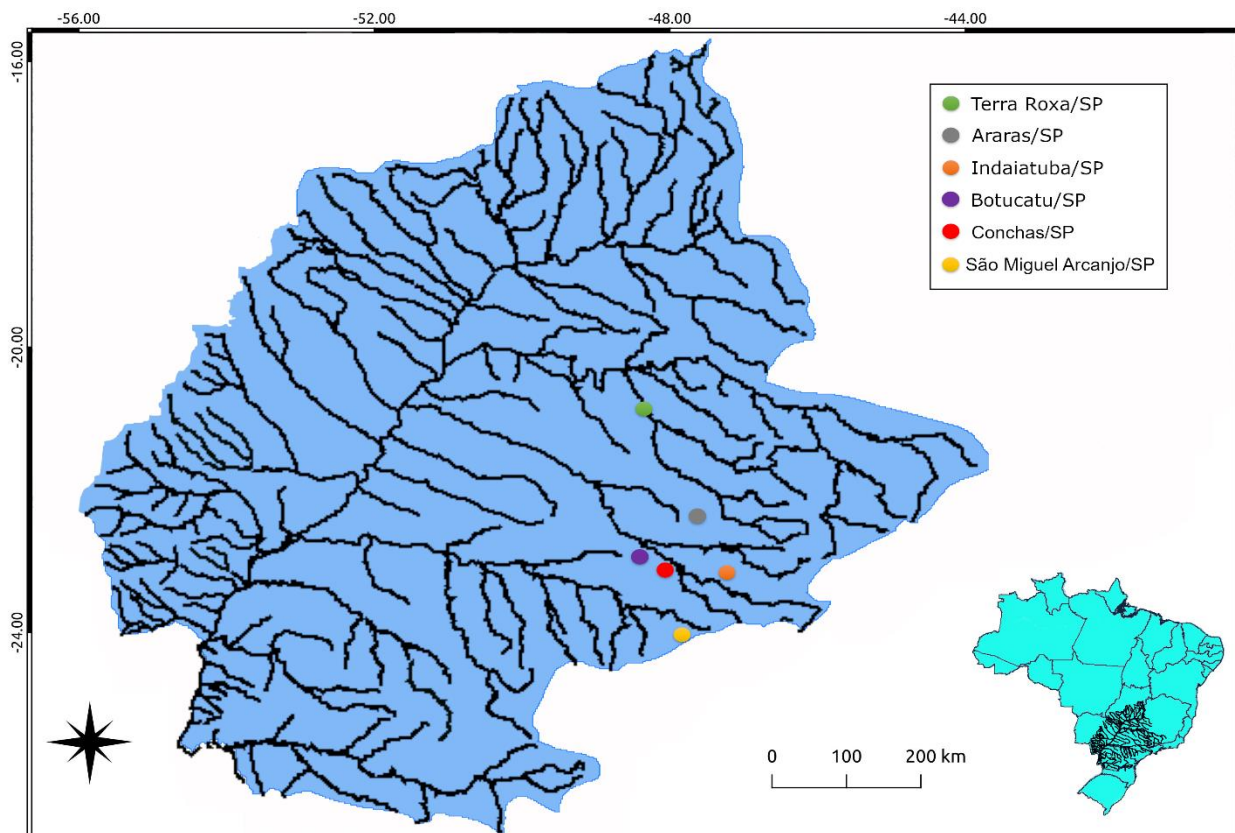
A prospecção dos satelitomas permitiu observar diferenças entre o número de sequências repetitivas presentes nos genomas de *H. aff. ancistroides* e *H. ancistroides*. Apenas duas sequências eram compartilhadas, em contrapartida com o enorme número de sequências exclusivas de cada espécie. Após Hibridação *in situ* Fluorescente, três dos onze satDNAs analisados hibridaram nas duas espécies, apresentando variação em número e localização, e outros dois DNAs satélites foram encontrados apenas na espécie isolada. Isso demonstra a especificidade de sequências repetitivas e evidencia satelitomas diferentes entre as espécies.

Os padrões de metilação encontrados também demonstram variação. Enquanto indivíduos de *H. ancistroides* apresentaram padrão hipometilado, relacionado à regiões heterocromáticas, *H. aff. ancistroides* demonstrou padrão hipermetilado, como todos os cromossomos exibindo marcações positivas. Destaque para o padrão mais metilado em machos do que fêmeas desta população e para os cromossomos sexuais X e Y, que possuem praticamente todo conteúdo metilado. Embora sejam compostos em grande parte por eucromatina, a metilação provavelmente inibe diversos genes nestes cromossomos.

Todos os resultados apresentados reforçam a ideia que *H. aff. ancistroides* não pertence à mesma unidade evolutiva que *H. ancistroides*. A redução do número diploide que inviabiliza cruzamentos e provoca isolamento reprodutivo, as pequenas diferenças morfológicas existentes, o surgimento do sistema cromossômico sexual único para o complexo de espécies, o monofiletismo molecular, a diferenciação em tamanho e conteúdo de bases no genoma mitocondrial, as diferenças entre os satelitomas e os fenótipos de hibridação e o padrão de metilação completamente diferente demonstram que esta é uma nova espécie que necessita de identificação e descrição para tornar-se taxonomicamente válida.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A/ATTACHMENT A – Mapa hidrográfico da bacia do Alto rio Paraná demonstrando os pontos de amostragens das populações analisadas neste estudo. As cores dos círculos no mapa são correspondem àquelas na legenda, de acordo com as coordenadas geográficas do município mais próximo do local de coleta, todos no estado de São Paulo, Brasil. Terra Roxa pertence à bacia hidrográfica do rio Grande, São Miguel Arcanjo está localizada na bacia do rio Paranapanema e os demais pontos são pertencentes à bacia do rio Tietê.



6.2 ATTACHMENT B - Characteristics of mitochondrial genomes of *Hypostomus ancistroides* and *Hypostomus aff. ancistroides*.

<i>Hypostomus ancistroides</i>								<i>Hypostomus aff. ancistroides</i>							
Gene	Start	Stop	Size (pb)	Codon		IGN*	Strand	Gene	Start	Stop	Size (pb)	Codon		IGN*	Strand
				Start	Stop							Start	Stop		
tRNA ^{Phe}	1	68	68			0	H	tRNA ^{Phe}	1	68	68			0	H
12S rRNA	69	1022	954			0	H	12S rRNA	69	1022	954			0	H
tRNA ^{Val}	1023	1094	72			0	H	tRNA ^{Val}	1023	1094	72			0	H
16S rRNA	1095	2771	1677			0	H	16S rRNA	1095	2772	1678			0	H
tRNA ^{Leu}	2772	2846	75			0	H	tRNA ^{Leu}	2773	2847	75			0	H
ND1	2847	3821	975	ATG	TAA	+4	H	ND1	2848	3822	975	ATG	TAA	+4	H
tRNA ^{Ile}	3826	3897	72			0	H	tRNA ^{Ile}	3827	3898	72			0	H
tRNA ^{Gln}	3898	3968	71			-1	L	tRNA ^{Gln}	3899	3969	71			-1	L
tRNA ^{Met}	3968	4037	70			0	H	tRNA ^{Met}	3969	4038	70			0	H
ND2	4038	5082	1045	ATG	T--	0	H	ND2	4039	5083	1045	ATG	T--	0	H
tRNA ^{Trp}	5083	5153	71			+2	H	tRNA ^{Trp}	5084	5154	71			+2	H
tRNA ^{Ala}	5156	5224	69			+1	L	tRNA ^{Ala}	5157	5225	69			+1	L
tRNA ^{Asn}	5226	5298	73			+32	L	tRNA ^{Asn}	5227	5299	73			+32	L
tRNA ^{Cys}	5331	5397	67			0	L	tRNA ^{Cys}	5332	5398	67			0	L
tRNA ^{Tyr}	5398	5467	70			+1	L	tRNA ^{Tyr}	5399	5468	70			+1	L
COI	5469	7019	1551	GTG	TAA	0	H	COI	5470	7020	1551	GTG	TAA	0	H
tRNA ^{Ser}	7020	7090	71			+4	L	tRNA ^{Ser}	7021	7091	71			+4	L

tRNA ^{Asp}	7095	7167	73			+14	H	tRNA ^{Asp}	7096	7168	73			+14	H
COII	7182	7872	691	ATG	T--	0	H	COII	7183	7873	691	ATG	T--	0	H
tRNA ^{Lys}	7873	7946	74			+1	H	tRNA ^{Lys}	7874	7946	73			+1	H
ATP8	7948	8115	168	ATG	TAA	-10	H	ATP8	7948	8115	168	ATG	TAA	-10	H
APT6	8106	8788	683	ATG	TAA	0	H	APT6	8106	8788	683	ATG	TAA	0	H
COIII	8789	9572	784	ATG	T--	0	H	COIII	8789	9572	784	ATG	T--	0	H
tRNA ^{Gly}	9573	9644	72			0	H	tRNA ^{Gly}	9573	9644	72			0	H
ND3	9645	9993	349	ATG	T--	0	H	ND3	9645	9993	349	ATG	T--	0	H
tRNA ^{Arg}	9994	10063	70			0	H	tRNA ^{Arg}	9994	10063	70			0	H
ND4L	10064	10360	297	ATG	TAA	-7	H	ND4L	10064	10360	297	ATG	TAA	-7	H
ND4	10354	11734	1381	ATG	T--	0	H	ND4	10354	11734	1381	ATG	T--	0	H
tRNA ^{His}	11735	11804	70			0	H	tRNA ^{His}	11735	11804	70			0	H
tRNA ^{Ser}	11805	11871	67			+1	H	tRNA ^{Ser}	11805	11871	67			+1	H
tRNA ^{Leu}	11873	11945	73			0	H	tRNA ^{Leu}	11873	11945	73			0	H
ND5	11946	13772	1827	ATG	TAA	-4	H	ND5	11946	13772	1827	ATG	TAA	-4	H
ND6	13769	14290	522	ATG	TAG	0	L	ND6	13769	14290	522	ATG	TAG	0	L
tRNA ^{Glu}	14291	14359	69			+2	L	tRNA ^{Glu}	14291	14359	69			+2	L
CYTB	14362	15499	1138	ATG	T--	0	H	CYTB	14362	15499	1138	ATG	T--	0	H
tRNA ^{Thr}	15500	15572	73			-2	H	tRNA ^{Thr}	15500	15572	73			-2	H
tRNA ^{Pro}	15571	15640	70			0	L	tRNA ^{Pro}	15571	15640	70			0	L
D-loop	15641	16826	1186			0	H	D-loop	15641	16505	865			0	H

6.3 ANEXO C - Protocolos

Técnica alternativa para preparações cromossômicas em peixes (HANKS) (GOLD *et al.*, 1990)

1. Retirar o rim e colocá-lo em uma cuba de vidro contendo 8mL de solução modificada de Hanks (ou meio 1640 ou TC199, com ou sem soro fetal bovino).
2. Dissociar o material, com auxílio de uma pinça de dissecação e de uma seringa de vidro desprovida de agulha.
3. Adicionar uma ou quatro gotas de colchicina a 0,0125%.
4. Incubar em estufa a 36-37°C por cerca de 25 minutos.
5. Ressuspender o material, utilizando uma pipeta Pasteur, e centrifugá-lo, por 10 minutos, a 900 rpm.
6. Remover o sobrenadante, com uma pipeta Pasteur, e acrescentar solução hipotônica de KCl a 0,075M (10-12 mL).
7. Ressuspender o material e incubá-lo, por aproximadamente 25 minutos, em estufa a 36-37°C.
8. A partir deste passo, o material é trabalhado segundo os procedimentos de fixação da técnica de “air-drying”.

HANK'S:

Solução A:

- 8 g de NaCl
- 0,4 g de KCl
- 0,047 g de Na₂HPO₄ ou
- 0,0898 g de Na₂HPO₄.7H₂O ou
- 0,12 g de Na₂HPO₄.12H₂O
- 0,06 g de KH₂PO₄
- 100 mL de água destilada.

Solução B:

- 0,14 g de CaCl₂
- 0,2 g de MgSO₄.7H₂O
- 100 mL de água destilada.

Solução de Vermelho Fenol:

- 0,14 g de vermelho fenol
- 0,2 g de NaOH 0,1 N
- 100 mL de água destilada

Misturar as soluções A e B juntamente, com 0,35 g de bicarbonato de sódio, 1 g de dextrose e 2 mL de vermelho fenol. Completar com água bidestilada até 1 litro. Deve ficar com uma coloração vermelha. Armazenar em frasco âmbar a 4° C. (OBS: a solução de vermelho fenol deve ser armazenada no freezer).

Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda-C) (SUMNER, 1972)

1. Tratar o material preparado, segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N à temperatura ambiente durante 15 minutos.
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar.
3. Colocar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 5%, recém-preparada e filtrada, a 42°C, durante 1,5 minutos.
4. Para interromper a ação da solução de hidróxido de bário e evitar precipitação, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.
5. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C durante 25 minutos.
6. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar.
7. Corar com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 5 minutos.

Ácido Clorídrico - HCl 0,2 N:

- 16,6 mL de HCl
- q.s.p. 1 litro de água destilada

Colocar 900 mL de água destilada em uma proveta ou Erlenmeyer e deixar o ácido escorrer lentamente pela parede do frasco. Completar para 1 litro. OBS: nunca diluir a água no ácido.

Hidróxido De Bário (5%)

- 2,5 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- q.s.p. 50 mL de água destilada

Diluir o hidróxido de bário em um frasco e filtrar. A solução será supersaturada. Deixar em banho-maria a 42° C.

Solução de 2xSSC

- 17,53 g de NaCl
- 8,82 g de Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (citrato de sódio cristalino)
- q.s.p. 800 mL de água destilada

Dissolver tudo e acertar o pH 7,0 com NaOH 10 N (se estiver ácido) ou com HCl 1 N (se estiver básico). Completar com água destilada para um volume de 1000mL. Guardar em frasco âmbar.

Adapted protocol for generating fluorescently labelled genomic DNA

*This protocol follows **BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System** user guide, scaled down to save expensive labelled nucleotides.*

Reaction set-up:

1. Add 200 ng of each genomic DNA sample to be labelled to a new 1.5 mL microcentrifuge tube and suspend in sterile distilled water to a final volume of 19 µL.
2. Add 0.1 µL [1 microgram (µg)] of the Control DNA included in the kit (supplied at 10 µg/µL) per reaction.
3. Add 16 µL of 2.5x Random Primers Solution to each sample.
4. Incubate at 95°C in an incubator/thermal cycler or water bath for 5 minutes, and then immediately cool on ice for 5 minutes.
5. On ice, add the following to each tube to differentially label each sample:

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
10X dCTP or dUTP Nucleotide Mix	3 µL	3 µL	3 µL
Biotin-dCTP or -dUTP	1.8 µL	--	--
Digoxigenin-dCTP or -dUTP	--	1.8 µL	--
Fluorochrome -dCTP or d-UTP	--	--	1.8 µL
Exo-Klenow Fragment	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL

6. Mix gently and perform a quick spin down (5 seconds).
7. Incubate at 37°C for overnight.

8. Add 5 μL of Stop Buffer to each tube and place on ice. The reaction can be at -20°C overnight, if necessary.

Purification

9. Add 400 μL of Binding Buffer B2 (prepared with 6 mL of 100% isopropanol) to each tube and vortex for 30 seconds to mix.
10. Load each sample onto a PureLink® Spin Column, preinserted in a collection tube.
11. Centrifuge at 11,000 g for 1 minute at room temperature. Discard the flow-through and place the column back in the tube.
12. Add 600 μL of Wash Buffer W1 (prepared with 40 mL of 100% ethanol) to the column.
13. Centrifuge at 10,000 g for 1 minute at room temperature. Discard the flow-through and place the column back in the collection tube.
14. Add 200 μL of Wash Buffer W1 again to the column.
15. Centrifuge at 10,000 g for 1 minute at room temperature. Discard the flow-through.
16. Spin at maximum speed for an additional 2-3 minutes to remove any residual wash buffer. Discard the flow-through.
17. Place the Spin Column in a new, sterile Amber Recovery Tube (supplied in the kit).
18. Add 50 μL of ultrapure distilled water to the centre of the column and incubate at room temperature for 1 minute.
19. Centrifuge at maximum speed ($\sim 20,000$ g) for 2 minutes. The flow-through contains the purified labelled DNA probes. (Discard the column after use).

Adapted protocol for Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) (SCHWARZACHER, HESLOP-HARRISON, 2000)

Pre-treatment:

1. Refix the slides in 3:1 methanol/ acetic acid for 30 minutes at room temperature and air-dry.
2. Dehydrate the slides in 100% ethanol for 5 minutes at room temperature. Repeat the procedure one more time and air-dry.
3. Apply 200 μL of RNase solution (0.4% diluted in 2xSSC) to each slide and cover with a plastic coverslip. Incubate for 1 hour at 37°C in a humid chamber.
4. Wash the slides in 2xSSC for 10 minutes at room temperature, removing the coverslip. Repeat the wash one more time.
5. Wash the slides in 1xPBS for 5 minutes at room temperature.

6. Fix the material in formaldehyde solution (1% formaldehyde/ 1xPBS/ MgCl₂ 50mM) for 10 minutes at room temperature, in the fume hood.
7. Wash the slides in 1xPBS for 5 minutes at room temperature.
8. Wash the slides in 2xSSC for 10 minutes at room temperature.
9. Dehydrate the slides in ethanol series: 70%, 80% and 100% ethanol for 2 minutes each, at room temperature. Discard the 70% ethanol used and keep in storage the 80% and 100% to prepare 70% and 70%/80%, respectively.
10. Air-dry the slides while preparing the denaturation solution.

Hybridization:

11. Apply 40 µL of hybridization mix (see “solutions” at the end of the protocol) in the slides and cover with a plastic coverslip and place in a thermal cycler or hybridization system. Denature for 8 minutes at 80°C then cool the slide to 37°C and leave at this temperature for 12 to 48 hours depending on the probe size and type (PCR product or labelled oligo, respectively).

Post-hybridization washes

12. Put the slides in 2xSSC heated at 42°C to remove the coverslips and wash the slides for 5 minutes.
13. Wash the slides in a stringent wash solution (high stringency - 20% formamide/ 0.1xSSC **or** low stringency- 0.1xSSC) at 42°C for 5 minutes. Repeat the stringency wash one more time.
14. Wash the slides in 0.1xSSC at 42°C for 5 minutes. Repeat one more time.
15. Wash the slides in 2xSSC for 5 minutes at room temperature.
16. If you applied three probes or don't need to apply immunostaining than proceed the detection of the signal. For sequential immunostaining, you cannot use probe marked with green fluorochromes in FISH (FITC or Alexa 488, for example), just red or far red.

Detection of the FISH's signal

17. Incubate the slides in detection buffer (4xSSC/ 0.2% Tween-20) for 5 minutes at room temperature.
18. Apply 200 µL of blocking buffer (5% BSA in 4xSSC/ 0.2% Tween-20) in the slides and cover with a plastic coverslip. Incubate for 15 minutes at room temperature while

proceeding the preparation of the antibody solution (see “solutions” at the end of the protocol).

19. Remove the coverslip, drain the slides and apply 50 μL of antibody solution to each slide. Replace the coverslip and incubate slides at 37°C for 60 minutes in a humid chamber.
20. Wash in detection buffer at 42°C for 10 minutes. Repeat two more times.
21. Proceed to the dehydration with 70%, 80% and 100% ethanol for 5 minutes each, and air-dry the slides.
22. Stain the slides applying 40 μL of DAPI/antifade solution [0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (or Vectashield Mounting Medium with DAPI) and cover with a large glass coverslip (50x24mm). Keep the slides refrigerated in dark until analyzing it in epifluorescence photomicroscopy.

Solutions:

RNAse 0.4% - q.s.p. 1 slide.

- 0.8 μL RNAse stock [10mg/mL];
- 199,2 μL 2xSSC.

Formaldehyde 1% - q.s.p. 100 mL.

- 1 mL formaldehyde;
- 10 mL 10xPBS;
- 5 mL 1M MgCl_2 ;
- 84 mL distilled water.

Hybridization mix q.s.p.1 slide. (to more slides, multiply them add 1 μL).

Master mix - final volume: 34 μL

- 20 μL 100% formamide;
- 4 μL 20xSSC;
- 8 μL 50% dextran sulphate;
- 1 μL Salmon sperm DNA [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$];
- 0.5 μL 100mM EDTA;
- 0.5 μL 10% SDS.

To the master mix add 25 to 200 ng of the labelled probe and complete with ultrapure water to 40 μL .

Stringency wash solution

For low stringency - 0.1xSSC without formamide (GISH, very small probes).

For high stringency - 20% formamide / 0.1xSSC (repetitive probes) - q.s.p. two washes.

- 40 mL 100% formamide;
- 10 mL 2xSSC;
- 150 mL distilled water.

Detection buffer - 4xSSC/ 0.2% Tween-20 - q.s.p. one incubation and 3 washes.

- 100 mL 20xSSC;
- 1 mL Tween-20;
- 400 mL distilled water.

Blocking buffer (FISH) - 5% BSA in 4xSSC/ 0.2% Tween-20

- 0.25g Bovine Serum Adult (BSA);
- q.s.p. 50 mL 4xSSC/ 0.5% Tween-20 (detection buffer).

Antibody solution (FISH) - q.s.p. 8 slides and 2 probes

For the probes labelled with Biotin:

- 2 µL Alexa 594-streptavidin [200 µg/mL]

For the probes labelled with Digoxigenin:

- 4-6 µL FITC-anti-digoxigenin [200 µg/mL]

Add 400 µL blocking buffer (50 µL/slide).

DAPI solution - [0.2 µg/mL] - 40 µL - q.s.p. 1 slide.

Normally this solution is prepared in high quantity and kept in the freezer.

- 8 µL DAPI stock [4 µg/mL];
- 32 µL antifade (PBS/ glycerol).

Phosphate-buffered saline – PBS

10x (mass):

- 14.196g Na₂HPO₄ (disodium phosphate);
- 2.4496g KH₂PO₄ (monopotassium phosphate);
- 80.0669g NaCl (sodium chloride);
- 2.0129g KCl (potassium chloride).
- q.s.p. 1000 mL distilled water.

Start with 800 mL of distilled water to dissolve all salts. The pH of PBS is ~7.4. If necessary, pH can be adjusted using NaOH (sodium hydroxide) or HCl (hydrochloric acid). Add distilled water to a total volume of 1000 mL before autoclaving. Keep at 4°C and dilute to 1x before use.

Saline-sodium citrate, salt sodium citrate or standard saline citrate buffer – SSC

20x (mass)

- 175.3 g NaCl (sodium chloride);
- 88.2 g Na₃C₆H₅O₂·2H₂O (di-hydrated sodium citrate);
- 900 mL distilled water.

Dissolve the solutes and adjust to pH 7.0 with NaOH (sodium hydroxide) or HCl (hydrochloric acid) if necessary. Add distilled water q.s.p. 1000 mL distilled water and sterilize by autoclaving.

Adapted protocol for Immunostaining of Anti-5-MeC (BOROWSKA *et al.*, 2011)

Pre-treatment:

1. Refix the slides in 3:1 methanol/ acetic acid for 30 minutes at room temperature and air-dry.
2. Dehydrate the slides in 100% ethanol for 5 minutes at room temperature. Repeat the procedure one more time and air-dry.
3. Wash the slides in 1xPBS for 5 minutes at room temperature.
4. Fix the material in formaldehyde solution (1% formaldehyde/ 1xPBS/ MgCl₂ 50mM) for 10 minutes at room temperature, in the fume hood.
5. Wash the slides in 1xPBS for 5 minutes at room temperature.
6. Wash the slides in 2xSSC for 10 minutes at room temperature.
7. Dehydrate the slides in ethanol series: 70%, 80% and 100% ethanol for 2 minutes each, at room temperature. Discard the 70% ethanol used and keep in storage the 80% and 100% to prepare 70% and 70%/80%, respectively.
8. Air-dry the slides while preparing the denaturation solution.

Denaturation:

9. Apply 200 μ L of denaturation solution (40% formamide/1xSSC) in the slides and cover with a plastic coverslip. Incubate during 5 minutes at 72°C in hybridization system or thermal cycler.
10. Wash in 2xSSC 4 times, the first very fast (2 minutes) to remove coverslips and the major formamide solution. The other three washes apply for 10 minutes each.

Immunostaining

11. Wash the slides in 1xPBS/0.5% Tween-20 for 10 minutes at room temperature.
12. Apply 200 μ L of blocking solution (Buffer 2 – 0.5% BSA in 1xPBS/0.5% Tween-20) and cover the slides with a plastic coverslip. Incubate for 1 hour at 37°C in a humid chamber.
13. Remove the blocking solution by washing the slides in 1xPBS/0.5% Tween-20 for 10 minutes at room temperature.
14. Apply 100 μ L of **primary antibody solution of anti-5-MeC (diluted at 1:250)** and place a plastic coverslip. Incubate either at 37°C for 90 minutes **or** at 4°C overnight in a humid chamber (the best result is overnight at 4°C).
15. Wash the slides 3 times in 1xPBS/0.5% Tween-20 for 10 minutes each at room temperature.
16. TO detect primary antibody treat the slides with 100 μ L of **Alexa 488 anti-mouse IgG (diluted at 1:200)**. Apply plastic coverslips and incubate at 37°C for 90 minutes in a humid chamber.
17. Remove the unbounded antibodies washing the slides 3 times in 1xPBS/0.5% Tween-20 for 10 minutes each at room temperature.
18. Stain the slides applying 40 μ L of DAPI/antifade solution (or Vectashield Mounting Medium with DAPI) and cover with a glass coverslip. Keep the slides refrigerated in dark until analyzing in epifluorescence photomicroscopy.

Disassembly the slides to reuse it:

19. To use the same slides for *in situ* hybridization, proceed the heating of the slides to remove the coverslips. Keep the slides at 37°C for 30 to 50 minutes in a humid chamber and withdraw the coverslip without slipping.
20. Wash the slides in 1xPBS/0.5% Tween-20 for 5 minutes at room temperature. Repeat this step one more time.

21. Wash the slides in 2xSSC for 10 minutes at room temperature. Repeat this step one more time.
22. Proceed to the dehydration with 70%, 80% and 100% ethanol for 5 minutes each, and air-dry the slides. Discard the 70% ethanol used and keep in storage the 80% and 100% to prepare 70% and 70%/80%, respectively.

Solutions:

Formaldehyde 1% - q.s.p. 100 mL.

- 1 mL formaldehyde;
- 10 mL 10xPBS;
- 5 mL 1M MgCl₂;
- 84 mL distilled water.

Denaturation solution

- 80 µL 100% formamide;
- 120 µL 2xSSC.

1xPBS/0.5% Tween-20

- 5 mL de Tween-20;
- 995 mL de 1xPBS.

Blocking solution

Buffer 1 - 1xPBS/0.5% Tween-20/0.1% BSA – q.s.p. 50 mL – *stock in refrigerator*

- 0.05 g Bovine Serum Adult (BSA);
- 50 mL 1xPBS/0.5% Tween-20.

Buffer 2 – 1xPBS/0.5% Tween-20/0.5% BSA – q.s.p. 50 mL – (one Coplin jar) – *freshly made*

- 0.25 g Bovine Serum Adult (BSA);
- 50 mL 1xPBS/0.5% Tween-20.

Monoclonal antibody anti-5-MeC [1:250] – q.s.p. 1 slide

- 0.4 µL stock anti-5-MeC;
- 99.6 µL blocking buffer 1.

Alexa 488 anti-mouse IgG [1:200] – q.s.p. 1 slide

- 0.5 μL stock Alexa 488 anti-mouse;
- 99.5 μL blocking buffer 1.

DAPI solution - [0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$] - 40 μL - q.s.p. 1 slide.

Normally this solution is prepared in high quantity and kept in the freezer.

- 8 μL DAPI stock [4 $\mu\text{g}/\text{mL}$];
- 32 μL antifade (PBS/ glycerol).

Phosphate-buffered saline – PBS

10x (mass):

- 14.196g Na_2HPO_4 (disodium phosphate);
- 2.4496g KH_2PO_4 (monopotassium phosphate);
- 80.0669g NaCl (sodium chloride);
- 2.0129g KCl (potassium chloride).
- q.s.p. 1000 mL distilled water.

Start with 800 mL of distilled water to dissolve all salts. The pH of PBS is ~ 7.4 . If necessary, pH can be adjusted using NaOH (sodium hydroxide) or HCl (hydrochloric acid). Add distilled water to a total volume of 1000 mL before autoclaving. Keep at 4°C and dilute to 1x before use.

Saline-sodium citrate, salt sodium citrate or standard saline citrate buffer – SSC

20x (mass)

- 175.3 g NaCl (sodium chloride);
- 88.2 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (di-hydrated sodium citrate);
- 900 mL distilled water.

Dissolve the solutes and adjust to pH 7.0 with NaOH (sodium hydroxide) or HCl (hydrochloric acid) if necessary. Add distilled water q.s.p. 1000 mL distilled water and sterilize by autoclaving.

6.4 ANEXO D – Características dos DNAs satélites isolados de *Hypostomus ancistroides* e *Hypostomus* aff. *ancistroides*.

Nome	Tipo	Proporção Genômica	Probabilidade - satélite	Tamanho (pb)	Homologia de sequência
<i>Hypostomus ancistroides</i>					
Sat01-80_Han	Satélite putativo	0.037	0.775	80	
Sat02-80_Han	Satélite putativo	0.560	0.545	80	
Sat03-464_Han	Satélite putativo	0.500	0.0417	464	
Sat04-2620_Han	Satélite putativo	0.280	0.047	2620	TC1/Mariner-type non-autonomous DNA transposon <i>D. rerio</i> ; AATA (Start 1694 - End 1766)
Sat05-2660_Han	Satélite putativo	0.230	0.0558	2660	R2-like non-LTR-retrotransposon; Penelope-like retrotransposon <i>Danio rerio</i>
rDNA5S-1190_Han	Satélite putativo	0.220	0.106	1190	5S rRNA gene/pseudogene Vertebrata
Sat06-191_Han	Satélite putativo	0.180	0.049	191	
Sat07-1850_Han	Satélite putativo	0.075	0.0227	1850	
Sat08-17_Han	Satélite putativo	0.060	0.64	17	<i>Cottoperca gobio</i> genome assembly, chromosome 1
Sat09-21_Han	Satélite putativo	0.056	0.0277	21	<i>Denticeps clupeioides</i> genome assembly, chromosome 1
Sat10-282_Han	Satélite putativo	0.031	0.0383	282	
Sat11-46_Han	Satélite putativo	0.027	0.246	46	
Sat12-192_Han	Satélite putativo	0.025	0.00924	192	
Sat13-29_Han	Satélite putativo	0.023	0.105	29	<i>Denticeps clupeioides</i> genome assembly, chromosome 15
Sat14-45_Han	Satélite putativo	0.019	0.0393	45	
Sat15-52_Han	Satélite putativo	0.018	0.427	52	
Sat16-31_Han	Satélite putativo	0.017	0.024	31	
Sat17-34_Han	Satélite putativo	0.013	0.0281	34	
Sat18-42_Han	Satélite putativo	0.013	0.0357	42	
tRNA-698_Han	Satélite putativo	0.012	0.098	698	tRNA-Phe (decoding TTY) gene/pseudogene Vertebrata
snRNA-853_Han	LTR element	0.26	0.0343	853	U2 snRNA; U5 snRNA (spliceosomal RNA gene/pseudogene) Vertebrata
Sat19-80_Han	Satélite putativo	0.550	0.851	80	
Sat21-52_Han	Satélite putativo	0.018	0.974	52	

Sat22-138_Han	Satélite putativo	1.200	0.0407	138	
Sat23-559_Han	Satélite putativo	1.100	0.0084	559	Tc1-5_DR DNA transposon; Mariner-12_DR Tc1/Mariner-type DNA transposon <i>Danio rerio</i>
Sat24-174_Han	Satélite putativo	0.530	0.0803	174	
Sat25-2600_Han	Satélite putativo	0.280	0.2450	2600	Tandem and Simple Repeats - ATT (Start 824 - End 884)
Sat26-191_Han	Satélite putativo	0.230	0.0211	191	
Sat27-2290_Han	Satélite putativo	0.068	0.0433	2290	ncRNA <i>Pygocentrus nattereri</i>
Sat29-17_Han	Satélite putativo	0.054	0.6890	17	<i>Sphingomonas</i> sp. YZ-8 plasmid unnamed 1, complete sequence
Sat30-80_Han	Satélite putativo	0.038	0.0664	80	
Sat31-46_Han	Satélite putativo	0.035	0.1070	46	
Sat32-335_Han	Satélite putativo	0.033	0.0952	335	
Sat33-192_Han	Satélite putativo	0.023	0.0145	192	
Sat35-41_Han	Satélite putativo	0.022	0.0357	41	
tRNA-866_Han	Satélite putativo	0.021	0.0496	866	Variant tRNA-Glu (decoding GAG) gene/pseudogene; tRNA-Tyr (decoding TAC) gene/pseudogene Vertebrata
Sat36-31_Han	Satélite putativo	0.016	0.0190	31	
Sat37-31_Han	Satélite putativo	0.013	0.0564	31	
Sat38-1030_Han	LTR element	0.27	0.0129	1030	<i>Erpetoichthys calabaricus</i> genome assembly, chromosome 18
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i>					
Sat01-2920_HanXY	Satélite putativo	0.380	0.780	2920	R2-like non-LTR-retrotransposon; Penelope-like retrotransposon <i>Danio rerio</i>
rDNA5S-1190_HanXY	Satélite putativo	0.300	0.727	1190	5S rRNA gene/pseudogene Vertebrata
Sat02-52_HanXY	Satélite putativo	0.120	0.853	52	
Sat03-1130_HanXY	Satélite putativo	0.033	0.775	1130	MmaSat093-953 <i>Megaleporinus macrocephalus</i>
Sat04-138_HanXY	Satélite putativo	1100	0.0413	138	
Sat05-80_HanXY	Satélite putativo	0.540	0.6990	80	
Sat06-208_HanXY	Satélite putativo	0.350	0.2250	208	
Sat07-174_HanXY	Satélite putativo	0.320	0.0490	174	
Sat08-80_HanXY	Satélite putativo	0.085	0.2640	80	

Sat09-17_HanXY	Satélite putativo	0.032	0.0813	17	<i>Campylobacter showae</i> strain 129_VTPP genome assembly, chromosome I
Sat10-335_HanXY	Satélite putativo	0.031	0.0413	335	
Sat11-31_HanXY	Satélite putativo	0.028	0.0317	31	
Sat12-46_HanXY	Satélite putativo	0.022	0.6370	46	
Sat13-31_HanXY	Satélite putativo	0.017	0.0782	31	
Sat14-45_HanXY	Satélite putativo	0.017	0.0428	45	
Sat15-58_HanXY	Satélite putativo	0.015	0.0173	58	
Sat16-42_HanXY	Satélite putativo	0.014	0.0306	42	
Sat17-40_HanXY	Satélite putativo	0.010	0.6970	40	
Sat18-2610_HanXY	LTR element	0.3	0.138	2610	Penelope-like retrotransposon <i>Danio rerio</i> ; AGGGTT (1073-1107); AGGGTTT (1073-1104); ATTT (2572-2608)

6.5 ANEXO E – Sequências dos DNAs satélites obtidas após a prospecção dos satelitomas em *Hypostomus ancistroides* e *Hypostomus aff. ancistroides*.

Nome	Sequência consenso
<i>Hypostomus ancistroides</i>	
Sat01-80_Han	GTTTAGGCACTTCGGCGCTGTATGCGCTCTGATCCGATAGTAATTAGAAAGCAGATTCATTTGTTTATTAACCTTCTGAAC
Sat02-80_Han	GAGCGCTGATTTATATGAATGAAGCGCTGTTAATCACGAGCTGTGAGGCGAGTTTTAAAAAGGAGGGAAGCGTCTTAGT
Sat03-464_Han	TTAGCGGAAACTCATTTTACGCCTCGCGCTGATTCCTTGTACTCATTACTCTCTTGGTTGCTTAGGAAAGTCCGTTTCAACTGAA TGTGTGATTTTATACTGTTTCACTTTATATATGTCAATGGAAAAAATATTTTCAACTGAATGACTGTTCTCACTTTATGTTAC CCAAAATAAATGTATACATTGTCTTTTGTAAAAGAGCACCTCAAACAGTGTCAACGAGCTCTCTTTTACAGAAGAGCATTTTT CTGCCTCGCTTTGACTGCTTGTACTCGTTGCAGATATTGTCGCTTAGGAAACAGTCAGTTTCAACCAACTGACTGTTCTTACACT AATTCGCTTTAACTTTATGTATATCAATGGGAAAATAGTCCTTTTTCAGCTGAGTGAATGATCTTACCTCATGTTACCCAAAACA AAGTGTATAACCTTTTGTATTACACCACAAACAGCTCTTCT
Sat04-2620_Han	TCTAACCCAAAAACCTCACCTGTTCCATCCCAGCGCCCCCGCTTATCCTTAAAGGAGGGTATGGGTGGTGTGGGACATGAACA GGTGATTGGATAAAAAGCCCAGACAGGCTTGGGCATGAGTCGCTTAGTTGAGTGGCGCATGCTTTCTTCTATATCACCGTCATGT CCCAAGGAGCGACCCTAGCCCTCTAATAATAACCCTTAGCACGGCTTAATAAATAAATAAAAAATAAACCAACAATAGGACAA AACCTAACTTTATGCATAAACTGTAATCTTAGCCCTAACTCAAAATCTACACCTAACCCCTAAGCCCTAACTTAAACCCGATAC CTCACCTGTTCCGTCCCAGCGCCCCCGCTTTTCTGACAGGAGGGTAGGGGTGGTGTGGGACATGAATAGGTGATTGGATAAA GCCAGACAGGCTTGGGTGTGTCCTGCTCGGTTGAGTGGTGCATGCTTTCTTCCACATCACTGTCATGACCCAAGGAGCGACC CAGCCCTCGAAGCATAACCCTTAGAACTCCTAAAAATCCAACCATAGGCCTAAAACCTAACCTTAACTAACTCCACCAT GAACCTAACCTAACCCCTAACCCCAACCCCTAGGCCTAACCCCTTAGGACACTTAAAAATTCAACTATAAGCCTAACCTAA CCATAATACCTAACTTAAACCTAACCCATAAACCCCTAATCTTGACCCCAACTCAAAACCCTACACATAACCCTAAGACCTAACATTA TTAAACCTAACCCCTAACCTTAAATTCTTAAACCTAACCCCTAACCTATAACTTTAAACCTCAAACCGAACCCCTATGCCTGAGCCCTA AACCTCAACTTAGTCCTAAAACGTAACCATAACTCTTTTCCCTCTCATTTTAAATCCCAAAAGCCTTAACTTTACCCAGTCAAAC TTAAGAAAAGTGCATCTAGAAAACGGCCACAAGAGGGCAGCAAAGGATTAATAAATAAACGTTCCCCCTTTAAATTTGACGC CATTCGCTTTTGAATGACTTTTAACTTAAACATCGTCATTTAAACTATGCAATCACCTTTAACTGGGCCCTTCTACAGATATTC TGTTAAAGGTAATTATTCTGATCAACCAGATCTGTACCAAAAACGAGCAAAAACCTAGATTAGAACTTTTAAAGAACAACAAGTT AACGCAAAGCCTCATGGGTAGTATAATTATTGGTCATTTAAACTGTAATAACGCTTGGACTTGGCAATAGAAATAAATAAATTA ATAAATAAATAAATCATTTATCGAGTTTTATAAGTAAAAATCCATGTAAATCTGAAGTTTTGACCAGACTACACATGGGCATAT GAACTAGTCTCACCCCTGATGGGGAAGCTGAATCCGGTTAGGCACCTGGATGGGCTATCCAACCAGAAAACCTGCCTTATAGGG GCTGACAGTTTTCTTACAGAAGCCTGTTGCCTCATGGGACTTCCAGTAGAAGCTTGTGGCTGAGTCTGCAGCCATCCGCTGG

GGTACAAGGTTCCAGCCCATGTTTCAGCGCGGCATAAACTCTGCTCGACTGACCTCAGAAAGACCAAGGCGGTGAGTAACCTTA
TTCAAGGTACATTTTAAAGGTTATTAGATCTTAAAGCTAATCTTGACAACAAAAGCTTATGTCAATGTATAACCCAAGATTCGA
AGTTCAGCGTCAACAAAAATA
TAAAATAAATAAATTA AAAAGTAAAAAATCTCAACCCAAAAATAGGAAAACCTATTCTACGTGGAGAAGCAACAGACAAGGTC
ACATCTCGAGTGAAAAATAGGAAAACCCATTCCATTACAAAGTACCAGATCTAAATGATCAGAAAATCAAACAAATAAATAA
AAATTGGACATGGGACACAAAGTCGAGGACTGATCAACCTACGGCTGGCCACCTCGGATGAAGGCGTACAGTGTTCATGGCCG
AAACGTCTGATGATTCCGAGGCACACTGCTGATGATTGTTGTTCCACAAAACAAAACAATTGGAAC TCAAAACACATCTCAAT
TGCTGGTACTATACCTCAACCCAAAATAGGAAAACCTTATTCAATTTTCATGAAGCAACAGCCCGATAAAAAAGTCACACCTTAAC
GGAAAAATAGGAAAAGCTATTCCATTAGGAGAAGCATCAGATCTAAAGGGTCACTACTACATCTTAACTCAAAAATAAGGAA
ATTTATTCCACTTGTATTCCCAATATTCTAACTCCTAAATGACAGGATCAAATACAGAACCACCTAATACAATACTTAAAACA
GCTCCTATTCTGCTAACTTCTAGTAATCCCAGTTGAGTTGCACTCGATTGGTTTTGGTAAATAAGCAGACGACAGGGGTCTGCT
GCAGGGACAATGGCATAACTTAACAAGCGCCGGCCCGTGCACAGCCCTTGATTTCCCTATCTAACCGCGCTACAGGGTAGCGAC
GGGGGAATCATTGTATTTTCACAAAACCTAACCTGCCAGAGCCTTCGGACCTAGTGTGCCAACTGAACCAAAGCAGTCCC
AGAGGTTAGTAGTTAGGAGTACAATATACATTTA

TCAATGGGCTTTGTGGCTGAGATCCGCAGCTTATTGCGCTCATGGGCTTGCTGGGCACAGCAGTGAAAAACGACTCTTATTTAG
TCATGGGGGGCCCTTGATAGGCGTTATGCGGCGGACTCCAAAGCATAGGCCTCCATCGGCCAAGCAAACAGAGTCAGCAGGG
CAGGAAC TCAAGCCGTACCCACGCTTGGGAACCGCAGCCCGGTGTACTATCATTTATTTATTGAGTGGTCAAAAATATGAT
GAACCCACTGCTGTAGGAATAACTCAGTCATATTTGTACAAAGTCCATTA ACTTATTAACCTCAGCTGGAGTAATTTCCCTT
ATGGGTTACTGAGGTTATGGTTAGGACAAGATTTTAATTAAGGTTAGGGTTAGGAGGTTAGGTTTAGGGCTAGATTTTAATTAT
GATTAAGACTAAAATTTAAATTAAGGTAAGAGTTGAGGCTAAATTTTAATTAAGGTCATGGTTAGGGTAAAAGCTAAATCTCT
AACCTCAGCTTGATTTATTTCCCTTAAGGGTACTGAGCTTAGGTGTTATGGTCAGGATTGGAGCTATGCCGTAAATTAGGATT
ATTGTTTAACTCAGATGAATGTGTCCCTTATGGGGTACTGAGGTTAAGTGTTAGGTTCTAGTAGTCTTAAGGGTAAAAATCTA
ATTCTTTCTTTTAGTGGGGTTGTCAGTCCCACATTGTAATCATTGAACTGGAAACAGAGTCAGA ACTGTTAGTGTCAAAGGTG
GTGTTTGAGGATAGCCATGCCAATTAAGCTATCTGGCATTGAATAGGATTTTAGGACCCATCTTCAGTAGTGTACCTCAGAGTC
ATAAGGTGTG TAGGCCTTTAAGCACTACCATTAACATCAAGATAGAGGTGGGCTAGTAAGCCATCAGAAACCATATCGGCAC
CTCTTCGGTAGTAATATACCTCAGAGTCACTGGGTGTTTCAGCCTTTTGAACACTATACACCCTCTTCTGAGGTGGCCCGCCAA
GGTGATCAGTCTCAGCGTGTGTCCCATGTCCAATAAATTATGGTGTGGCTATTACATTAACATGTCAA ACTAAACACCAACAGT
TAGGTGGGGTTAAGAACTATTGGTGAAATCACTTCAGGTAACAACATTGACTTGCACCTCAATTAAGAGTACTCACCACC
ATAGGTTTCTGAAGTCAATCCAGCAGAGTCCACACCACGATCAGCATAGTTGGGAACCCCGAATCCAGCGGATGGCTCTGG
AATAAGTCATCAAGCTTCTACTGGGAAGTCCCCTGGGTCCACAAGCTTTTAAGAAGCAACTTTAGGACCCTATCAGGAAGCAT
GTCGACTAGGACAGCCAGTCCAAGTACCTAACAGGCATCGTCTTACCAATGTGGCGAGACTTAAAACATTCAACTAAAACCA
GTCTGAACCCAAATCCAGATCAAGAGCTTTAATCTGACAAAAAACCTATTCTCCTATTTACCTTATTATTATTAATATTTAAAG
GTTATTGCATTTTAAGTTAACACCAGTTACATTACCCATGAGGCTTTGTGTTAACTTCCCTTGAACCACCCTAATTTATATCAAG
TCCATTTGCTTATAGTGTAGTTTAAATGAAATAATTTTCATGGGGGATAAAAAAAGGTTTAGGTGATGGCCTAGAGTAAATTA
TGAATAAACTTCAATACGTTTAAGTAACTCACCTTATATTTACAAGGGAGACCCCATGTTTGATCCTATGTCGCCCTCTGTG

Sat05-2660_Han

	<p>GGCGTTTAGCGTTATAAACGCCACTTAATTATGACTGAGTTTTTTTTTAAGAAAGAGGGAATGTTTTTCAGTTTTAAATGATGGC AAAGTAGTAGGGGGAGCAAAGATTCTAGGGGAGAAGACCCAGGGGGGACAAGTCCCGCAAACATGGGTGGCACTGGCTGG ATTAGGATTGGGGTTAGGGGAAATGATACCCCAAGCCGAGACTCCGAGTAAGCTCTGAATCGAGCAACCCAAAGAGAACTCGTT GTGCACTGGCCTACCACATGTCACTTAGACCCAGGTCCAACCTGTGACCAACTCCCTCTTAAGGATATTAAGCCCCCAATTTT GAATATTGGCAGCTGGGTGATGACCACTCTATCATTAAAGCCCGTATAGGCTTTTTAAGGGCTGAATTCTCTGGCGGAGGGTCTG AGTCAGTCCCCACCCATATAACCGTATTTCCGCCACAAGAAACCATATCGGCTCAGCAAACGGAATCAGTCAGGGAGGACGCT GAACCGACCCTTCCACGTTCAAGAACAGCTCATTAGGATTCAAGTAGTTCAGGTAAGTGATCTTAGTTTATTTTTTGTAGCCAA ATTCCAGGGGAAAATGGCAAGATATGTTTTAAAATTAATCTACTTTAGATACCTATCTTTTAAATAAAAATTCAGTCTTGGTTAGA ACTAAACTTAAAAAGGGAACATATTCTTTTAACTCAGCTGGATTACTTTCCCTTATGTGGTACTGAGGTTAAGTGTTGGGGTT CCATTGGGGTGAACCTAGTTTGAGCCATATGGCCTTAGTCTATTTTTTGTGGCTGAATTCCACGGCAGAGGGTCCGAACCGATC CCAAGATAGCCGTA CTCTGCCGCAAGGAACCTTAATGGGCTTCGTTGCTGGAGTCCGCGGCGAGGTGCC</p>
rDNA5S-1190_Han	<p>AGGGGGAATCTAAAAAGTGATGCACTTGGAGCTAGATGCATAAGTAGACGATATTTTTCCACCGAGTGACGTTCCAAGCAAAT ATTTTAGACCACTCTCATCTTGTCCGTTCAAATGCTAATCAGGTATAGCCCTGCACACAGCCTGCATGGGAGACCCACTCTCA ACACCAGGTGATGCAAAATTCTCACGCTCTACCGCATTCTCTTGGCAAAGTCCTACAAGCTGCTCAGCAAAATTGACTGCAAAT CCCAGCACACAGTCACACAACCTGCAACGCCACTTGCTTTTCATGCACCTGTGCAAGCCACGGGACTGGAGGACTGCTGTGTGCA GAGCAGACTGCATTATGACATCAGAGTTTCTTATTAAGATCCAGAATTCCCGTAATGGGGTCACTACAGTTCAGATCCAGTTG AAAGTTGCATGTTGAAAACAAAAGCGTGGACAAATGAGCCAACGGATGAATGATGCAAGCTGTGCTGTGACCCGGGCAGGCC GTAACGGAACAGCGAGGTCACCTCTGGGGCAAATTGACAGAGACTTGGGTAGACTTGGGTTTTTGACAAGAAAAATCTGAAG AAATGAGCGAATGGTAAAGCGGGCTCCAGCCAAACGTTTAAACGGCGGTCAGGTTAGAGCATAAAGAGCCGCGCCACCCGGC TGCTTCCGCTTGCGGCCACACTGCCTTGAGAGTGCCCGATCTCGTCAGATCTCGGAAGCCAAGCAAGGTCGGGCCTGGTCAGT ACCTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATCCCAGGTGCTGCAAGCTTTTTGCGCTGGAGTCCGTCAGCTGTTGGTGAAAGAGGGC TTTGAATTTGAAGAAAGGGTCCGATTGTCCTTTGTTGTGAGCTTGATTTGTGGTAGCCCTGCGAGGCAGTTGTGTGATTGACAG GTGTAAGAATGTTTGCCTGATTATGACGTAATGGTTTTCTGAATGGGCCTGTAATGTGTGTAATTGAGGTGAGGTCCAGGTTG TGTTTTGCAAATGAAAGCATGAGTGTAGGAATGAATGTGTGAAGGAGTGAGTTGGGCATTAGGACCTATTCGTGTGGTAATGT AAGAGTGAGGTGATTGATGTGGCCTGTTGTATTTGGATGGAGGTTAAATATGGTGTGTTGTAATCTTTGTGTGTCATCTTTTTTTT TTGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAG</p>
Sat06-191_Han	<p>ACGGATGTCTCTCCCCAGACACAGGGCAGGTGCCCGGGCCTTGTCTCGTGTCCCGCTCTACCGGAGGTCAAGGAACCAGGGC AAGGGATGCGGAGGCCTCTGCCCGCCAGGAGGCCTGATGTGTGGGTATGGACCTCCATGTGTTTTCCCTTGAGCCAAGTCTCG AAAACTCAACCGCAGGAGGGACG</p>
Sat07-1850_Han	<p>GTGAGAACAAGCAGATACAAACCTGCAGCTCACAGGAGAACCCTGCGAAATGGTGTATCCAACATCCTGTTTGGCTCTGTGG GTGTCTGGGAGTACTCCCGCGGACCAGAACAAGAGATAATTCAGTTTCAATACTCAACAATGGTCTATAGACCATAGAAGA GTCCATCATGTTCTGAAGACTTACACTGAACTGGAACAGGGGTCCAGACCATGGCAGCCTGACCATCACCAGTCCATCCAGTA CTGCAACATCCTAAGAATGAAATGAAAAATTGAAATATGAAATGCATAATATAGCATATAATATGAGAAACATGAGTAACAA CGGGACTATCCTTCAAGGCCGATGACCATGGTCGCTGCCTGGATGGGTGGCAGCTGTAGATCTGTAATCAGAGACAAACATTA GACTAATCATTAGGATTGGTAATGTGACATGCACAAACCTTATCAATATGTAACCAAGAGCATTGGGTGTTATGGAAATGTGTT</p>

	CATTCTTGATCTTTTCTGTATTAGATCAATTCTAGAAAAGCAGATACTTACAATACAGCCAATAAACCCAAAGAAATAAAGAG AACATAAAACAGAAATCTGTTTTATGGTTTTAGTGATTTTAATGCTTTGCTTTGACTCAGTAATAACACAGTGTTTGTGAACT GCACCATTTATTCACAACCTTAAAATACACCATATCCCTTATATATAACAGCTATATATAACAATGAGGTACATTTTTGTGGCCA AGTCGTCCATAATTATAATTCAGGTAATGCAACAAAATGTCATATATATCATAACATTAGTAACGTGAAAACGTAAAAATATAA TATTACATTGACCAGGGGTGCTAAAAAATGATATACAACGCTATATTTTGGATATGGAAGGCAGTATATTCTCGTTTTCTGTAAA ATGGCGCAGGTTTACATCCGGACACTGGCTTCAGGAACAATTTCCGATTTTACATTGCTAGCATGTATCCATGACAACGTGGTT ACATTTCCGGCTAGTTTATTTACACTTTGTTTTGTTTCAGGTAATAAAATGACTTCCGGACTGTACTAAATAGTATTTCACTTGATGTT ACAAACACTTTTAAATCATCCCAGTTCAGTATTTTTTACAAATTATGTAGTGAAGACGGAGAAATTTAGGAACTTCGCAAATTA GCAATAATGCTAAAGCTAATTTACGGATTTGAGCAGCAAGAGTGATTTTATTGGAAGTTGTTGGATTTATTGTGTGTGTTGTAA ACTTTAGCTGCAACATAAATGCAACTTAGCTTGATGAAAAATCCACATTCTGGACTGGGGGCAGATGATCTGGTCTGCCAGGT CATCTCAGAGTCCGGCTCAGCGTCCGGGGAAATTACAGCACAGGAGAAAATGAGGAGAAAGAGAGAGAGAAAGGTGATGGT TAATGATTTAGTAAGGGATGAACAGATTCATTAATTCCTCATAATATAATAATGAATACATTTAACAATAATTCAAACATTTA TGTTAAACCAAAACAAAATAAAACCTTAAAATGGATGAATTTCTGTTAAAAATGAGTTCAGAAGAATCCAGTAGGTGGGGCTGG ACGTCTGGCTGTTGGCGGAGGGATGAGAGGTGCCTGAAGGGTGTGGTGTCACTGGACTCCGAAGAGCCCCAACCCCATCCT TGTTACGCCACACAGCCTTGCAGGTCTGGACATGGTAGTGTGCTGTAACAAACACAGAAACACAGTTATTAACAGGATTCTG AAAGCCCATGTAAAAACCATTAAGAAAACATCTCATAAACTCTTACCAGGAAGCTTTCCTGCACTTCTGAGGTGTGTGATGA CTCACACACCTCAGAA
Sat08-17_Han	CAGCGTTCAACCTACAT
Sat09-21_Han	GTAGAAACAAGTAGATAGAAA
Sat10-282_Han	TCAAATTTTTGGTAACCGCCGGACCTTACGATTTTTGGTGATTTTGGGTGAAATTTTGGACATCTTCAGATCTTCTTCATTTTTGC ACCATAGAATTATAAGAACAATAGTAATGCGTCAGTAGAGTATTGTGACTCTGGCATTCTCCAATTTTGAATATTGCCGTCCA ACTTTTCGATGTCGATCGCATTATTTTCATCAAAATTAATAATCATCATATCTCAGGATTGGAGGGTGATAGATCAATGAAATTTA CTTTTCCTGCATCTACATAGCGCCAAAAA
Sat11-46_Han	ATGCTGGATACACACTACATAGTGCCTACATAGGGAGTGAGGATA
Sat12-192_Han	GTTTTCCCTGAGATCTGCCCTCGTTTTCCACCTCCGAGGCTCCGTTTCGCGGAGAACCAGATTTTCAGACCGGGAAGGCGCACCGC GGTCCGCCTGGGCGAGCAGCCGTGCCCGCGGTGAAATCCTGGAAGTCTAAGTCAGAAGGGGCGCATCCCAGTCGGACGGGG CCGAGCCAGTGGACTATTCACGGGTG
Sat13-29_Han	CTCACACACAGATACTTAAAGCTCTCTCG
Sat14-45_Han	ACAAGCATGCAGAAACAAAGAGATAGGCAGGCAGGCAGAGACAAG
Sat15-52_Han	ATCCTACCTACATTATTATCAGTTCTGATAAAGTTATACAGCCTGTAAAATC
Sat16-31_Han	CAATAAACAGTACAGCAGCTACCGCCCAACA
Sat17-34_Han	GATGTTCTGGTACCAGTTCAGTCCCTCACACTAA
Sat18-42_Han	CAACTGAAGCTACGACCACAACAACAGAACCAACCACAATA

tRNA-698_Han	TTTCGGCACGGTGCTCATGTCTTCGTGTTAAAATACTCTTAGGTCATACAGTAAACATACAGTGACAATAGAGGACACGCTGTA AAGACAGTTTCATCTAAGGTTTTTCATGTATGTAGGATATCAGCTATTTCTATTGTATATGTTTTAAACCAACATTTTAATGCCAC TTAACCCGGTGCAAGAGTGACCTCATGTGGGGACATTGAGTAACCACAACACTACTTACCCTGAATACACTCACTGCGTGGTAGT GTGATTCATTTAGGAAAATGGATAGAGGTTTATCAAAAAAGGTGGATAGGACCTTAAGATCTTCAGTCTAACGCTCTCCCAAC TGAGCTTTTTTCAGCACATTGCAAAGTGTTGCTGCTTTGAGCAGCATAACCTTGCTGTTACAGCTTTTAGCTGGTCGGTATTGTGT AGAAATGCCAGCCCATGGCATATATGGGTACGTTTTTCCAGTGTTTTCAAATATATGCTGTATATTGTGTTCTCTGCAAACATCA ACACGCTAGTAAATGAAACGAAGAAAATGAGCACAATTCCTCATTCATTAGACGAATTTTGAAAGGGATGAGAGAACTG TTCCAGACCTTCTATAACCAGAAACGCTGCTCTTGTGTACTCACTTGCCGAAACCCGGGATCGAAAAAGGGACCTTTAGATCTT CAGTCTAACGCTCTGCCAACTGAGCTA
snRNA-853_Han	TTTTTTTTTAAGTAAAATGGAGGGAAAACGCAAACTGAACAATAAGGGTGTGTGGCCCTGTCGAAAACCCCTTTCAGACCGA CACCCATCTCTGGAGACCTGAGAGCTTCGTCTACTTATGGACTTGTTTATTGATTTCTGTTTCTGGACTGTTTCAGAACTGCAC CGTTCCTGGAGGTACTGCAATACCAGGCCGATGCGTGGAGCGGACGGAGCAAGCTCCTCTTCCGGCTCCCGGGCCTAAAAATC CATTAAATATGAAGTCTCCATATAGGAGACATATCAGATATTGAACTGATAAGAACAGATACTACACTTGATCTTAGCCAAAA GGCCGAGAAGCGATGACCAGAACTTGCACATGCGCTGCTCGAGAAGAGAGCCTCATGCAGCAGCAGCAGGCCCTCGTGCTCC ATGGTCTCTCCGCTGATCTAGAAGGGCTGTGTGGGGGAGACAGAGAGAGAGAAAACAACGACAAAATACCAAATCATAAAA CTAGTGGAGAACAGGCCCTTCTCCCACAGCTTCTGTTTTTGTGACCACCAAAGTCAGCTTTGCCAGACAAAGCCTTCCAAAA ATACAACAACTCATCCCTCTCCACGGAAATCTTTAGTAAAAGGCGAAAGATTTATGCGTGAATGAAGAGAAACCAGAGCCGA CGGGCCAAGCGGCCAGCTCTCCTACCCATAATCTGAGGCCTAGGAAGAGGGCTCGGGGCACAAGAGCACGGTCGCGTCTCTCC AAGGGAGGGCGGGCTCTGTGCCAGTCCACGTCAAAAGTGCTTGCTGCTCAAAGGAAAGACAACCGATCTGTTGAGTCCCT GATTAATACCCCCCACACTT
Sat19-80_Han	GCTTCCCTCCTTTTTAAACTCGCCTCACCGCTCGTGATTAAACAGCGCTTCATTCATATAAATCAGCGCTCACTAAGAC
Sat21-52_Han	TGATTTTACAGGCTGTATAACTTTATCAGAAGTATAATAATGTAGGTAGGA
Sat22-138_Han	ACCCGGGACCAACCCTACCAAATTTTCGTGGGCGTAGGTCGAAAACCTGACTGAGTTACGGTCAATGGGCCCCCAGGGGCCCCAG TGCCCAGCCGGGGTCCAAAGGGGCCCCATTGACATCACATATCACCTCAAGGTCC
Sat23-559_Han	GTGTTGGACAATGAAACTGAAACACCTGTCATTTTAGACCACAATAATTTATTAGTATGGTGTAGGGCCTCCTTTTGCGGCCAA TACAGCGTCAATTCGTCTTGGGAATGACATATAACAAGTCCTGCACAGTGGTCAGAGGGATTTTAAGCCATTCTCTTGCAGGAT AGTGGCCAGGTCACTACGTGATGCTGGTGGAGGAAAACGTTTCTGACTCGCTCCTCCAAAACACCCCAAAGTGGCTCTTGAT ACATCACACAAAGACTTGCTGTCTTGGTCACAGATGCGCCAGCAAGACGTGCACCAACAATTTGTCTCTTTTGAAGTCTATGT CACCCATAATGTTGTGTGCATTGCAATATTTTGGAGCAAACTGTGCTCTTACCCTGCTAATTGAACCTTCACACTCTGCTCTTAC TGGTGCATGTGCAATTAATGAAGATTGGCCACCAGGCTGGTCCAATTTAGCCATGAAACCTCCCACTAAAATGACAGGTG TTTCAGTTTTATTGTCCAACACCTGTATATATATATATATATATATATATACAG
Sat24-174_Han	GGACTTTCCTAAGCGACCAAGACAGCAATGAGTACAAGGAATCAGCGCGAGGCAGAAAATGCTTTTCTGTAAAGAAGAGCT CGTTGACACTGTTTGGAGGTGCTCTTTTACAAAAGACAATGTATACATTTAGTTTTGGGTAACATAATGTAAGAAGAGTCAATCA GTTGAAAC

AACCTCTGGGACTGCTTTGGTTTCAGTTGGCACACTAGGTCCGAAGGCTCTGGCAGGGTTAGGTTTTTGTGAAAATACAATGATT
CCCCCATCTCTGCAATCCGCAGGTGGTTAGATAGGAAATCAAGGAATGTGCACTGGCCGGCGCTTGTTAAGTTATGCCATTGT
CCCTGCAGCAGACCCCTGTCGTCTGCTTATTTACCAAACCAATCGAGTGCAACTCAACTGGGATTACTAGAAGTTAGTAGAAT
AGGAGCTGTTTTAAGTATTGTATTAGGTGGTTCTGTATTTTGATCCTGTCATTTAGGAGTTAGAATATTGGGAATACAAGTGGA
ATAAATTCCTTATTTTTGAGTTAAGATGTAGTAATGACCCTTTAGATCTGATGCTTCTCCTAATGGAATAGCTTTTCCTATTTTT
CCGTTAAGGTGTGACTTTTTATCGGGCTGTTGCTTCATGAAATTGAATAAGTTTTCTATTTTTGGGTTGAGGTATAGTACCAGCA
ATTGAGATGTGTTTTGAGTTCCAATTGTTTTGTTTTGTGGAACAACAATCATCAGCAGTGTGCCCTCGGAATCATCAGACGTTTTCG
GCCATGAACACTGTACGCCTTCATCCGAGGTGGCCAGCCGTAGGTTGATCAGTCCCTCGACTTTGTGTCCCATGTCCAATTTTTAT
TTATTTGTTTGATTTTTCTGATCATTTAGATCTGGTACTTTGTAATGGAATGGGTTTTCTATTTTTCACTCGAGATGTGACCTTGT
CTGTTGCTTCCCCACGTAGAATAGGTTTTCTATTTTTGGGTTGAGATTTTTACTTTTAATTTATTTATTTTATTTTATTTATTTA
TTTATTTATTCATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTTGTGACGCTGAACCTCGAATCTTGGGTTATACATTGACATAAG
CTTTTGTGTCAAGATTAGCTTTAAGATCTAATAACCTTTAAAATGTACCTTGAATAAGGTTACTCACCGCCTTGGTCTTTCTGA
GGTCAGTCGAGCAGAGTTTATGCCGCGCTGAACATGGGCTGGAACCTTGTACCCCAGCGGATGGCTGCAGACTCAGCCAACAA
GCTTCTACTGGGAAGTCCCATGAGGCAACAGGCTTCTGTAAGAAAATGTCAGCCCCTATAAGGCAGGTTTTCTGGTTGGATA
GCCCATCCAGGTGCCTAACCGGATTCAGCTTCCCCATCAGGGTGAGACTAGTTCATATGCCCATGTGTAGTCTGGTCAAACTT
CAGATTTACATGGATTTTTACTTATAAACTCGATAAATGATTTATTTATTTGTTTAAATTTATTTATTTCTATTGCAAGTCAAGCG
TTATTACAGTTTAAATGACCAATAATTATACTACCCATGAGGCTTTGCGTTAACTTGTTGTTCTTAAAAGTTCTAATCTAGTTTT
TGCTCGTTTTTGGTACAGATCTGGTTGATCAGAATAATTACCTTTAACAGAATATCTGTAGAAGGGGCCAGTTAAAGGTGATT
GCATAGTTTAAATGACGATGTTAAGTTAAAAGTCATTTCAAACGCAATGGCGTCAAATTTAAAGGGGGAACGTTTATTTTTAA
TCCTTTGCTGCCCTCTTGTTGGCCGTTTTCTAGATCGCACTTTTCTTAAAGTTTGACTGGGTAAAGTTTAAAGGCTTTTGGGATTTAA
ATGAGAGGGAAAAGAGTTATGGTTACGTTTTAGGACTAAGTTGAGGTTTAAAGGCTCAGGCATAGGTTTCGTTTTGAGGTTTAA
AGTTATAGTTAAGGGTTAGGTTAAGAATTAAGTTAGGTTAGGTTTAAAGTTAATGTTAGGTCTTAGGTTATGTGTAGGGTT
TTGAGTTGGGGTCAAGATTAGGTTTATGGTTAAGTTTAGGTATTATGGTTAGGTTTAAAGTTAATGTTAGGTCTTAGGTTATGTGTAGGGTT
TAAGGGTTAGGCTAGGGGGTTGGGGTTAGGGGTTATGGTTAGGTTTCATGGTGGAGTTTAAAGTTAGGTTTAAAGTTAGGTTTAAAGGCT
TATGGTTGGATTTTTAGGAGTTCTAAGGGTTATGCTTCGAGGGCTGGGGTCGCTCCTTGGGTCATGACAGTGATGTGGAAGAAA
GCATGCACCACTCAACCGAGCAGGACACACCCAAGCCTGTCTGGGCTTTATCCAATCACCTATTCATGTCCCACACCACCCCTA
CCCTCCTGTCAGGAAAAGCGGGGGGCGCGGGACGGAACAGGTGAGGTATCCGGGTTAAGTTTAAAGGCTTAGGGTTAGGTTAGGTTAGG
ATTTTGAAGTTAGGGCTAAGATTACAGTTTATGCATAAAGTTAGGTTTTGTCCTATTGTTGGTTTTATTTTTATTTATTTATTTAAGCC
GTGCTAAGGGTTATTATTAGAGGGCTAGGGTCGCTCCTTGGGACATGACGGTGATATAGAAGAAAGCATGCGCCACTCAACTA
AGCGACTCATGCCAAGCCTGTCTGGGCTTTTATCCAATCACCTGTTTCATGTCCCACACCACCCATACCCTCCTTTAAGGATAAG
CGGGGGGCGCGGGATGGAACAGGTGAGGTTTTTGGGTTAGATAAATGTATATTGTACTCCTAACTACT

Sat25-2600_Han

TGCGGTTGAGTTTTTCGAGACTTGGCTCAAGGGAAAACACATGGAGGTCCATACCCACACATCAGGCCTCCTGGGCGGGCAGA
GGCCTCCGCATCCCTTGCCCTGGTTCCTTCGACCTCCGGTAGAGCGGAACACGAGACAAGGCCCGGGCACCTGCCCTGTGTCTG
GGGAGAGACATCCGTCGTCCCTCC

Sat26-191_Han

GCTGTGGTTCTTACATTCATGTTTCTTAACTGTCTTTCAGTTACTGTGACCTAAACATGACCTGTTCTGTTTCAGCGTGTGGAG

Sat27-2290_Han

ACCATATCTCCGAGGTGTCAATGAACATCAAGAAGGAGTCATCACACACCTCAGAAGTGCAGGAAAGCTTCCTGGTAAGAGTT
TATGAGATGTTTTCTTTAATGGTTTTTACATGGGCTTTCAGAATCCTGTTAATAACTGTGTTTCTGTGTTTGTACAGCACACTAC
CATGTCCAGGACCTGCAAGGCTGTGTGGCTGAACAAGGATGGGTGTTGGGGCTCTTCGGAGTCCAGTGACACCAACACCCTTC
AGGCACCTCTCATCCCTCCACCAACAGCCAGACGTCCAGCCCCACCTACTGGATTCTTCTGAACTCATTTTTAACAGAATTCATC
CATTTTAAGGTTTTATTTTGTGGTTAACATAAAATGTTTGAATTATTGTTAAATGTATTTCATTATTATATTATGAGTGAATTA
ATGAATCTGTTTCATCCCTTACTAAATCATTAACCATCACCTTCTCTCTCTCTTCTCCTCATTTTTCTCCTGTGCTGTAATTTCCC
GGACGCTGAGCCGGAACCTCTGAGATGACCTGGACGACCAGATCATCTGCCCCAGTCCAGAATGTGGATTTTTTCATCAAGCTA
AGTTGCATTTATGTTGCAGCTAAAGTTTACAACACACATAAAATCCAACAACCTTCCAATAAAAATCGCTCTTATTGCTCAAAAT
CCGTAAATTAGCTTTAGCATTATTGCTAATTTGCGAAGTTTCTAAATTTCTCCGTCTTCACTACATAATTTGTAATAAAATACTG
AACTGGGATGATTA AAAAGTGTGGCAACATCAAGTGAATACTATTTAGTACAGTCCGAAGTCATTTATTACCTGAACAAAAC
AAAGTGTAATAAACTAGCCGAAATGTAACCACGTTGTCATGGATACATGCTAGCAATGTA AAAATCGGAAATTGTTCTGAA
GCCAGTGTCCGGATGTA AACCTGCGCCATTTACAGAAACGAGAATATACTGCCTTCCATATCCAAAATATAGCGTTGTATGC
AATTTCTTTAGCACCCCTGGTCAATGTAATATTATATTTTACGTTTTACGTTACTAATGTATGATATATAGCTGTTATATAAGGGATATG
CATTACCTGAATTATAATTATGGACGACTTGGCCACAAAAATGTACCTCATTGTATATATAGCTGTTATATAAGGGATATG
GTGTATTTTAAAGTTGTGAATAAAATGGTGCAGTTCATAAACTGTGTTATTACTGAGTCAAAGCAAAGCATTAAAATCACT
AAAACCATAACAACAGATTTCTGTTTTATTGTTCTCTTTATTTCTTTGGGTTTATTGGCTGTATTGTAAGTATCTGCTTTTTCTAGA
ATTGATCTAATACAGAAAAGATCAAGAATGAACACATTTCCATAACACCAAATGCTCTTGGTTACGTATTGATAAGGTTTGTG
CATGTCACATTACCAATCCTAATGATTAGTCTAATGTTTGTCTCTGATTACAGATCTACAGCTGCCACCCATCCAGGCAGCGAC
CATGGTCATCGGCCTTGAAGGATAGTCCCCTGTTACTCATGTTTCTCATATTATATGCTATATTATGCATTTTCATATTTCAATT
TTTCATTTCACTTAGGATGTTGCAGTACTGGATGGACTGGTGTGGTTCAGGCTGCCATGGTCTGGACCCCTGTTCCAGTTCG
GTGTAAGTATTGAGAACATGATGGACTCTTCTATGGTCTACAGATCATTGTTGAGTATTGAAACTGAATTATCTCTTTGTTCTG
GTCCGCGGGAGTACTCCCAGGACACCCACAGAGCAAACAGGATGTTTGGATACACCATTTTCGCAGTGGTTCTCCTGTGAGCTG
CAGGTTTGTATCTGCTTGTCTCCATTATATAACATCATTTTATTTGCCTTACTAATGGAACATTATAGTTGATGCTTCTATTG
ATTTTCACAGCAGGTGGAGGTGAAGCTGCAGCATAAGACCTATTATGCAGGCCTGGAGTCTGAGCACTGGTGGGTGCTCAGT
AATCAGTTCTACCAGCTGCACCAACAGGTA ACTTTTTAAATGGAAAGTCTGGGCTCTGTAAGGTTTAGCTCATGATTAATACCT
GACTGCACTATATTTGTCTTGCAGCTCCCTCCATTGCACTACGGCACAGTCATCGTCACGGCCTGCATTAAGTAAGACTGAT
GCCAATTTGGACAAAACACATTTTTT

Sat29-17_Han

GCGTTCAACCTACATCA

Sat30-80_Han

AGAGCGCATAACAGCGCCGAAGTGCCTAAACGTTTCAGAAGTTAATAAACAATGAATCCGCTTTCTAATTACTATCGGATC

Sat31-46_Han

ACTATGTAGTGTGTATCCAGCATTATCCTCACTCCCTATGTAGTGC

Sat32-335_Han

GAAAAGATCTGAGGAGATCTCTTTTTTGGCCTAAAATCAAATTTTTGGTAACCGCCGGACCTTACGATTTTGGTGATTTTGGGT
GAAATTTTGGACATCTTCAGATCTTCTTCATTTTTTGCACCATAGAATTATAAGAACAATAGTAATGCGTCAGTAGAGTATTGTG
ACTCTGGCATTCTCAAATTTGAAATATGGCCGTCCA ACTTTTCGATGTCGATCGCATTATTTTCATCAAAAATTA AAATCATCAT
ATCTCAGGATTGGAGGGTGATAGATCAATGAAATTTACTTTTTCTGCATCTACATAGCGCCAAAATCTGCCTTGCGAATTTG

Sat33-192_Han	CGCGGTGCGCCTTCCCGTTCTGAAATCTGGTTCTCCGCGAACGGAGCCTCGGATGGAAAACGAGGGCAGATCTCAGGGAAAAC CACCCGTGAATAGTCCACTGGCTCGGCCCGTCCGACTGGGATGCGCCCCTTCTGACTTAGACTTCCAGGATTTCCACCGCGGG CACGGCTGCTCGCCAGGCGGACGG
Sat35-41_Han	ATGCTTGTCTTGTCTCTGCCTGCCTGCCTCTTTGTTTTCTGC
tRNA-866_Han	GTCTCTCCCTGATGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTCACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAAGCTCAGC AATCTCTTTTCTTTTACAGCAGATTCTGCTGTAAACCATTTCCGATGGGAGTACTTGACACGACAAAAAACAAAACACTGA CTCCTTCGAGCCGGAGTTGAACCAGCGACCTAAGGATAGCTTCTTTACCAACTACAGTCTCCGCTCTACCAACTGAGCTATCG AAGGGAACAAGCAAGCCCTTGTCTGAGTAACTCAAAGCATAACTGGATTCAGACTACTCTTTTATACCCACGAAAACAAGT GCTTGCCTTCTATGCACAAAGCGGATGGATAATCCAAGGATTTTTATACTGCTTGAAAACAGTCAAATCACCCTTCTCTCAA GCGCCAAATTTCCAGTCTTTTGCAAAACGTTCAAGGTGCCAAGGCTAGATTCATGAGCCAACCTTAGCTCCACGTTGTTGAAAACA ACATCCTTTTCAAGATGATCAAAAGACACTGGTCTCAAGTGTGTCAATGAGATTGTGTCTTAGCCATTAGGCTGTAAACCACAC GTAATAAGCAAGTCTTTTCTGTGTTACCTAGGTGGGTAAAGTGAAGGCAATATTCCAACAAGTTGGACTGCTGTTACATCGTG ATAGAAATCTTGCAAGTTGTTGCAATGAGAAGAAGTTGAGCAATTTGTAGTTGTTATGACTATTTGAAAGAAGTTCCGAATG ATGAGCAAAGAGGGAGGGGCCATTTTAGGTTTGTCTTGATGGGAGGGCAATTTCTGGAAAGTAATGAGCTTCGAAAAGTACG TAACTGGCCACAAAGCAACTCGCTGTTT
Sat36-31_Han	GGACGGGACCGCAGTATAAACTAGAGAAGGC
Sat37-31_Han	GCCCAACACGATAAACAGTAGAGCAGCTACC
Sat38-1030_Han	GACGTTCCCTTTTTACAAAAATGGCTTCTTTTACTCCCCGTTCAAACCAGCGTTCCTCCCTATCAAGGATCTTCACGTCTTCATCC TTGAAAGAGTGGCCACTGGCCTGTAGGTGGGTGTAAACCGCAGAGTCTGGCCTGATGAGGTAGCTCTTCTATGTTGTGCCATC CGTTTCGCCAGCGGCTGTTTGGTTTCCCAATGTACAATTCTGGCAATCCTCCCGGCACTTAACAGCATACTACTACTCT GTTTGTGCTGGGGGACCCGATCCTTGGGGTGGACCAGTCTCTGGCGTAGCGTGTTTTGGGGTTTGAAAGCCACCGAGACGCGGT GTTTTGAAAATATGCGTCTCAATTTTTCCGACGTTCCCTGCCACATATGGAATCACCCTGGTTTACGTTTAGACTGCGGTTGTTGT TCTCCTCTCGTCGATCTGCTGGAGCACTGTTTGGGTGTCTTACCGGCTTTGACGAAGGCCAGTTCGGATAACCACATTTGCCCA GGGCCTGCTTAATGTGAGATTTCTCTCCATCCTTGGCCGCTGTGTCAAGTGGGGACGCTGTCTGCTCGGTGGTACAGTGTCTGAT GACTCCTAATTTGTGCTCCAATGGATGATGAGAGTCAAACCTTAAGTACTGATCCGTATGTGTTGGCTTACGGTAAACATCAACT TTCAATTGTCCCCATCTCCAATCACAACCTTACAATCCAAGAAGGCTAACCTGTTTATCTGGACATAGGTTTTTGTGGGAGATA CGTTTCGTCACTCATCTAAGTGACTTCTTCAAGTCTCAGCTAGTTGGAAATCTTCCCAATCTTATATACAGCACATTTGCATAATG ACTCATAACCAGCACCATTACATAACAATGGGACCGGTGATTAGTTAATATGCAGATAGCCATGGCCATTAATGACAATGGCCA CGTGTGCCATTCACACAGGATTGGGGAATAGCTGCGACGGCAGCGTTGTAAGATGGTGAGAGGTGTACTCTGAGGCCCTCCT CGTTTCAGGGATG
<i>Hypostomus aff. ancistroides</i>	
Sat01-2920_HanXY	AAAAAAACTCAGTCATAATTAAGTGGCGTTTATAACACTAAACGCCACAAGAGGGCGACATAGGATCAAACATGGGGGTCT

CCCTTGTAATATAAGGTGAGTTTACTTAAAAACGTATTTAAGCTTATTCACAATTTACTCTAGGCAATCACCCAAACCTTTTC
TTTATCCCCCATGAAAATCATTTCATTCAAACCTAACACTATAAGCAAATGGACTTGATACAAATTAGGGTGGTTCAAGGGAAGT
TAACACAAAGCCTCCTGGGTAATGTAAGTGGTGTAACTTAAAAGGCAATAACCTTTAAATAATAATAATAGGGTAAATAGGA
GAGTAGGTTTTTTGTCAGATTAAAGCTCTTGATCTGGATTTGGGTTTCAGACTGGTTTTAGTTGAATGTTCAAGTCTCGCCACATT
GGTGAAGACGATGCCTGTTAGGTACTTGGACTGGCTGTCCTAGTCGACATGCTTCCTGATAGGGTCCTAAAGTTGCTTCTTAAA
AGCTTGTGGACCCAGGGGACTTCCCAGTAGAAGCTTGATGACTTGTTCAGAGCCATCCGCTGGGATTCCGGGTTCCCAACTAT
GCTGATCGTGGTGTGGACTCTGCTGGATTGACTTCAGGAAACCTATGGTGGTGAGTACTCTTAATTGAAGTGCAAGTCAATGTT
GTTTTACCTGAAGTGATTTACCAATAGTTTCTTAACCCACCTAACTGTTGGTGTTTAGTTTGACATGTTAATGTAATAGCCAC
ACCATAACTAATTGGACATGGGACACACGCTGAGACTGATCACCTTGGCGGGCCACCTCAGAAGAGGGTGTATAGTGTTCAA
AGGCTGAAACACCCAGTACTCTGAGGTATATTACTACCGAAGAGGTGCCGATATGGTTTCTGATGGCTTACTAGCCACCTCT
ATCTTGATGTTTAATGGTAGTGCTTAAAGGCCTACACACCTTATGACTCTGAGGTACACTACTGAAGATGGGTCCTAAAATCCT
ATCAATGCCAGATAGCTTAATTGGCATGGCTATCCTCAAACACCACCTTTGAACACTAACAGTTCTGACTCTGTTTCCAGTTC
AATGATTACAATGTGGGACTGACAACCCCACTAAAAGAAAGAATTAGATTTTTACCCTTAAGACTACTAGAACCTAACACTTA
ACCTCAGTACCCATAAGGGACACTTATTCATCTGAGGTTAAACAATAATCCTAATTTACGGCATAGCTCCAATCCTGACCACA
ACACCTAACCTCAGTACCCCTTAAGGGAAATAAATCAAGCTGAGGTTAGAGATTTAGCTTTTACCCTAACCTAACCTAACCT
AAATTTAGCCTTAACTCTTACCTTAAATTTAAATTTTAGTCTTAAACCATAATTAATAATCTAGCCCTAACCTAACCTAACCT
AACCAACCCCTAATTAATAATTTAGCCCTAACCTTACCCTAACCTTAAATTAATAATCTTGCCCTAACCTTAACTCAGTAACCC
ATAAGGGAAATTACTCCAGCTGAGGTTAATAAGTTAATGGGACTTTGTACAAATATGACTGAGTTATTCCCTACAGCAGTGGG
ATCATCATATTTTTGACCACTAAATAAATAAATGAAGCACACCGGGCTGCAGTTCCCAAGCGTGGGGGTACCGGCTTGACTTC
CTGCCCTGCTGACTCTGTTTGCTTGGCCGATGGAGGCCATGCTTTGGAGTCCACCGCATAACGCCTATAAAGGCCCCCCCATG
ACTAAATAAGAGTCGTTTTTACTGCTGTGCCAGCAAGCCCATGAGCGCAATAAGCTGCGGATCTCAGCCACAAAGCCCTT
GAGGCATCCCCGCCGCGGACTCCAGCAACGAAGCCATTAAGGTTCTTGCAGCAGAGTACGGCTATCTTGGGGACTGGTTC
GGACCTCTGCCGTGGAATTCAGCCACAAAAAATAGACTAAGGCCATATGGCTCAAATTAGGTTTACTCAATGGAACCCCA
ACATTTAACCTCAGTACCACATAAGGGAAAGTAATCCAGCTGAGGTTAAAAGAACATGTTCCCTCTTTAAGTTTACTTAAACC
AAGACTGAAATTGTATTAAGATAGGTAAGTAAAGTAGATTAATTTAAACATATCTTGCCATTTTCCCCTGGAATTTGGCT
ACAAAAATAAACTAAGATCACTCACCTAAATTACTTGAATCCTAATAAGCTGTTCCCTGAGCGTGGAAAGGTTCGGTTGGGCG
TCCTCCCTGGCTGATTCCGTTTGCTGAGCCGATGGAGGTCTGTGCAGAAGGGTCCGCAGCACAAAGGCTATTCGCAGGCTGTT
TCCTGTTACTGAACCCACCATGCCATGAGCGCGATGGGCTGTGTACCTCGGTGACGATCAAACTGAACCCACCAAGCCCA
TAAGTGCATGAGCTGTGGACCTCAGTCACATAAAGCCGATCGGTGCACCTCGCTGCGGACTCCTGCAACAAAGCCTATTGT
GGTTTCTTGTGGCGGAAATACGGTTATATGGGTGGGGACTGACTCAGACCCTCCGCCAGAGAATTCAGCCCTTAAAAGCCTA
TACGGGCCTTAATGATAGAGTGGTCAACCCAGCTGCCAATATTCAAAATTGGGGGGCTTAATATCCTTAAAGAGGGAGTTG
GTCACAGGTTGGACCTGGGTCTAAGTGACATGTGGTAGGCCAGTGCACAACGAGTTCTCTTGGGTTGCTCGATTACAGAGCTT
ACTCAGAGTCTCGGCTTGGGGTATCGTTTCCCCTAACCCCAACCCTAATCCAGCCAGTGCCACCCATGTTTACGGGACTTGTT
CCCCCTGGTTCTTCTCCCCTAGGAATCTTTGCTCCCCCTACTACTTGGCCATCATTTAAAACCTGAAAAACATTCCCTCTTTCCTT

rDNA5S-1190_HanXY

GAAAAACAAAGATTACAAAGACCATATTTAACCTCCATCCAAATACAACAGGCCACATCAATCACCTCACTCTTCCATTACCA

CACGAATAGGTCCTAATGCCCAACTCATTCCCTCACACATTCATTCCCTACACTCATGCTTTTCATTTGCAAAAACACAACCTGGAC
CTCACCTCAATTACACACATTACAGGCCCATTCAGGAAACCATTACGTCATAATCACGCAAACATTCTTTACACCTGTCAATCA
CACAACACTGCCTCGCAGGGCTACCACAAATCAAGCTCACAAACAAGGACAATCGGACCCTTTCTTCAAATTCAAACACCTCTTT
CACCAACAGCTGGACGGACTCCAGCGCAAAAAGCTTGCAGCACCTGGGATTCCCAGGCAGTCTCCCATCCAGGTAAGTACTGACCA
GGCCCCGACCTTGCTTGGCTTCCGAGATCTGACGAGATCGGGCACTCTCAAGGCAGTGTGGCCGCAAGCGGAAGCAGCCGGGT
GGGCGCGGCTCTTTATGCTCTAACCTGACCGCCGTTAAACGTTTGGCTGGAGCCCGCTTTACTATTTCGCTCATTCTTCAGATT
TTTCTTGTCAAAAACCAAGTCTACCCAAGTCTCTGTCAATTTGCCCCAGAGGTGACCTCGCTGTTCCGTTACGGCCCGCACG
GGTCACAGCACAGCTTGCATCATTATCTGTTGGCTCATTTCGTCACGCTTTTGTGTTTCAACATGCAACTTTCAACTGTATCTG
AACTGTAGTGACCCCATACGGGAATTCTGGATCTTTAATAGGAACTCTGATGTCATAATGCAGTCTGCTCTGCACACAGCA
GTCCTCCAGTCCCATGGCTTGCACAGGTGCATGAAAGCAAGTGGCGTTCAGTGTGTGATTGTGTGCTGGGATTTGCAGTCC
ATTTTGTGAGCAGCTTGTAGGACTTTGCCAAGAGAATGCGGTAGAGCGTGAGAATTTTGCACCACCTGGTGTGAGAGTGG
GTCTCCCATGCAGGCTGTGTGCAGGCCTACACCTGCTTAGCATTTTTGAACGGACAGGATGTGAGTGGTCTAAAAGGTTTGT
TGGAACGTCACCTCGGTGGAAAAATATCGTCTACTTAGGCATCTAGCTCGAGGTGCATCAATTTTTAGATTCCCCCTCTTTTTG
TTTTTTTGAACAAAAAATAAATT

Sat02-52_HanXY

TGATAATAATGTAGGTAGGATGATTTTACAGGCTGTGTAACCTTATCAGAAC

Sat03-1130_HanXY

TGTTTTAGAGTGAGCAAATCACAGTTGTTTGATATCATTACTGAAATAATATTGATTGCTAGAAAATAGTTTCATACTGAGG
AACATGTTTTCAGGAGATTTCTGCATATCTGGCTGGCCACAGATTGAGACATTAGCAGCTCCACCCACATCAAAGTACTTTGGC
ACCCCAAACCTGATAATTGTACACAATTACATGTGAAAGACCCATGTAATTCAAAAACTCAACCAGCAATTATTGTATAC
TTGCAATCATTCTTTACTACCATACCATGGTGATAGGTAATTAAGAAGAAGTGGAAAAAGACATCTGTGGCAAAGACAAG
AATGCCCCAAAGAATAGCACTTATGACTGGAATAACATCCAGTGTCTTTGATTGACTTAATCTTGTGCTTTTTTTCTGCAAGC
ATCAAGATGTTCCATTAAGTGATAAATTTTTGTGACGTTAGTTCTTGTGATAAATCAATATTATCTAGCCCAACAAACAG
CAATTTCCACTGCAACACAGAATTGATAGAATAATTTTTGTGATATTAAGTACTGAGTTACTGTTGTTCTCTCATGCTAGATGATGT
TGCTGAAGTCACTATAAACTACACCAACAAAAAGCACTTTCCAAAAGAGAAAGAATGGATAGAACCCTGTTGGAGTATTAC
CTGTGACAATCGTGTGAGCATAACATTTTCTAGTGTCAACTAAATGTAAGAAATTTTTCACTTAGCTGAATGACTACATCTT
GTCGACTGATCATGAATAAAATTATCCTTGCATATAGATTATAATGTTATTTCCAAGTGTGTTTCAAGGATGGGAAAAGAGAAG
TCTTTGGAACAGATGAGACTGCCCAAATAAAAGCACTTATGAAAGAAATAACATCCAGTGTCTCTATTTGAAGTAATCTAAT
TGTTACTCTGTGTAAGTGGTAGACATTGTCCCACTACAGTCAAATTTCTGGCATGCCATATTAACAAGCTCTTGTGCTTGAGC
CACTTGAAACTACCCCAACAAATAGCACTTACCAAAGAAAAATCAGGTTAGAGCCATTGTTAGAGTAAGAGCTGTGACTG
TTCTCAGTAGAACATCTTCTTTGTGTAGTCCCTCAGCTAAAAGAAAGAAT

Sat04-138_HanXY

GCCGGGGTCCAAAGGGGCCCCAGTGACATCACATATCACCTCAAGGTCCACCCGGGACCAACCCTACCAAATTTTCGTGGGCGT
AGGTGCAAAACTGACTGAGTTACGGTCAATGGGCCCCAGGGGCCCAAGTGCCCA

Sat05-80_HanXY

CGCCTCACTGCTCGTGATTAAACAGCGCTTCATTCATATAAATCAGCGCTCACTAAGACGCTTCCCTCCTTTTTAAACT

Sat06-208_HanXY

GAGACGGATGTCTCTCCCCAGACACAGGGCAGGTGCCCGGGCCTAGTCTCGTGTTCCTCTCTGCCAGAGGTGCAAGGAACCAG
GGCAAGGGATGCGGAGGCCTCTGCCCGCCAGGAGGCCTGATGTGTGGGTATGGACCTCCATGCGTTTTCCCTTGAGCCAAGA

	CTCGAAAACTCACCCGCAGGAGGGACGCAACCAGGCGGGGG
Sat07-174_HanXY	TCCGTTTCAACTGAATGACTGATCTTACATTATGTTACCCAAAATAATGTATACATTGTCTTTTGTAAAACAGCACCTCAAACAGCGTCAACGAGCTCTCTTTTACAGAAAAGCATTTTTCTGCCTCGCTCTGATTCTTGTACTCGTTGCAGATATGGTCGCTTAGGAAAG
Sat08-80_HanXY	AAACGTTCAGAAGTTAATAAACAAATGAATCCGCTTCTAATTACGATCGGATCAGAGTGCATACAGCGCCGAAGTGCCT
Sat09-17_HanXY	GAACGCTGATGTAGGTT
Sat10-335_HanXY	TGAATTTTCATCGATCTGTCACTCCAATCAAGAGATATGATGATTTTAATTTTGTATGAAAATAATACGATCGACATTGAAAGTTGGACGTCCATATTTCAAATTGGAGAATGCCAGAGTCACAATACTCTACTGACGCATTACTATTGTTTCTAATATGCTATG GTGCAAAAATGAAGAAGATCTGAAGATGTCCAAAATTTACCCAAAATCACCAAAATCGTAAGGTCCGGGGGTTACAAAAAATTTGATTTTTGGCCAAAAAAGTGATCTCCTCAGATCTTTACCAAATTCACACAGCAGATTTTTGACGCTACGTAGATGCAGGAAACG
Sat11-31_HanXY	TAAACAGTACAGCAGCTACCGCCAAACACGA
Sat12-46_HanXY	TCCCTATGTAGTGCATATGTAGTGTGTATCCAGCATTATCCTCAC
Sat13-31_HanXY	GCAGTATAAACTAGAGAAGGCGGACGGGACC
Sat14-45_HanXY	AAGACAAGCATGCAGAAACAAAGAGATAGGCAGGCAGGCAGAGAC
Sat15-58_HanXY	CCACTAACACACAACCCATCATTACAACAATGTACAACACTACAAACACACAAAAACA
Sat16-42_HanXY	TTGTGGTCGTAGCTTCGGTTGTAGTTGTGGTTGGTTCTGTTG
Sat17-40_HanXY	CATTTTCTTGAATAATTAACATTGTCCAAGAATGTTTCC
Sat18-2610_HanXY	TTTGTGACGCTGAACTTCGAATCTTGGGTATAACATTGACATAAGCTTTTGTGTCAAGATTAGCTTTAAGATCTAATAACCTT TAAAATGTACCTTGAATAAGGTTACTCACCGCCTTGGTCTTTCTGAGGTCAGTCGAGCAGAGTTTATGCCGCGCTGAACATGGG CTGGAACCTTGTACCCAGCGGATGGCTGCAGACTCAGCCAACAAGCTTCTACTGGGAAGTCCCATGAGGCAACAGGCTTCTG TAAGAAAATGTCAGCCCCTATAAGGCGGGTTTTCTGGTTGGATAGCCCATCCAGGTGCCTAACCGGATTGAGCTTCCCCATCA GGGTGAGACTAGTTCATATGCCCATGTGTAGTCTGGTCAAACTTCAGATTTACATGGATTTTTACTTATAAACTCGATAAAT GATGTATTTATTTAATTTAATTTAATTTAATTTCTATTGCAAGTCAAGCGTTATTACAGTTTAAATGACCAATAATTATACTACCCAT GAGGCTTTGCGTTAACTTGTGTTCTTAAAAGTTCTAATCAAGTTTTTGCTCGTTTTTGGTACAGATCTGGTTGATCAGAATAAT TACTTTTAACAGAATATCTGTAGAAGGGGCAAGTTAAAGGTGATTGCATAGTTTTAAATGACGATATTAAGTTAAAAGTTCATT TCAAAACGCAATGGCGTCAAATTTAAAGGGGGAACGTTTATTTTTAATCCTTTGCTGCCCTCTGTGGCCGTTTTCTAGATTGC ACTTTTCTTAAGTTTACTGGGTAAGTTTAAAGGCTTTTGGGATTAATAAGAGAGGGAAAAGAGTTATGGTTACGTTTTAGGA CTAAGTTGAGGTTTGGGCTCAGACATAGGTTTCGGTTTGGGTTTAAAGTTATAGTTAAGGGTTAGGTTAAGAATTAAGTT AGGGTTAGGTTTAAAGTTAAGTTAGGTTAGGTTATGTGTAGGGTTTGGGTTCAAGATTAGGGTTTATGGTTAAG TTTAGGTATTATGGTTAGGTTAGGCTTATAGTTGAATTTTTAAGTGTCCCTAAGGGTTAGGCCTAGAGGGTTAGGGTTAGGGTT TAGGGTTAGGGTTAGGTTTCATGGTGGAGTTTAGGTATTAAGGTTAGGTTTTAGGCCTATGGTTGGATTTTTAGGAGTTCTAAG GGTTATGCTTCGAGGGCTGGGGTTCCTTGGGTCATGACAGTGATGTGGAAGAAAGCATGCACCACTCAACCGAGCAGGA

CACACCCAAGCCTGTCTGGGCTTTATCCAATCACCTATTCATGTCCCACACCACCCCTACCCTCCTGTCAGGAAAAGCGGGGG
GCGCGGGACGGAACAGGTGAGGTATCCGGGTTAAGTTTAGGGCTTAGGGTTAGGTGTAGATTTTGAGTTAGGGCTAAGATTA
CAGTTTATGCATAAAGTTAGGTTTTGTCATATTGTTGGTTTATTTTTATTCATTTATTTATTTATTTTCTCTCTTTTAAGC
CGTCCTAAGGGTTATTATTATTAGAGGGCTAGGGTCGCTCCTTGGGACATGACGGTGATATAGAAGAAAGCATGCGCCACTC
AACTAAGCGACTCATGCCAAGCCTGTCTGGGCTTTTATCCAATCACCTGTTTATGTCCCACACCACCCATACCCTCCCTTAA
GGATAAGCGGGGGGCGCGGGATGGAACAGGTGAGGTTTTTGGGTTAGATAAATGTATATTGTACTCCTAACTACTAACCTCT
GGGACTGCTTTGGTTCAGTTGGCACACTAGGTCCGAAGGCTCTGGCAGGGTTAGGTTTTGTGAAAATACAATGATTCCCCC
ATCACTGCAATCCGCAGGTGGTTTAGATAGGAAATCAAGGAATGTGCACTGGCCGGCGCTTGTTAAGTTATGCCATTGTCCC
TGCAGCAGACCCCTGTCGCTGCTTATTTACCAAAACCAATCGAGTGCAACTCAACTGGGATTACTAGAAGTTAGTAGAATA
GGAGCTGTTTTAAGTATTGTATTAGGTGGTCTGTATTTTGATCCTGTCATTTAGGAGTTAGAATATTGGGAATACAAGTGGA
ATAAATTCCTTATTTTTGAGTTAAGATGTAGTAATGACCCTTAGATCTGATGCTTCTCCTAATGGAATAGCTTTTCCTATTT
TTCCGTTAAGGTGTGACTTTTTATCGGGCTGTTGCTTCATGAAATTGAATAAGTTTTCTATTTGGGTTGAGGTATAGTACC
AGCAATTGAGATGTGTTTTGAGTTCCAATTGTTTTGTTTTGTGGAACAACAATCATCAGCAGTGTGCCTCGGAATCATCAGA
CGTTTCGGCCATGAACACTGTACGCCTTCATCCGAGGTGGCCAGCCGTAGGTTGATCAGTCCTCGACTTTGTGTCCCATGTC
CAATTTTTATTTATTTGTTTGATTTTCTGATCATTTAGATCTGGTACTTTGTAATGGAATGGGTTTTCTATTTTTCACTCGAG
ATGTGACCTTGTCTGTTGCTTCTCCACGTAGAATAGGTTTTCTATTTTTGGGTTGAGATTTTTTACTTTTAATTTATTTATT
TATTTATTTATTTATTTATTTATTATT
