

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E  
BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**MAPEAMENTO FÍSICO CROMOSSÔMICO DE ELEMENTOS REPETITIVOS EM  
*Semaprochilodus* spp. (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE):  
ESTUDO COMPARATIVO EM DIFERENTES TIPOS DE ÁGUAS AMAZÔNICAS**

**MARIA LEANDRA TERCENIO**

**Manaus, Amazonas**

**Fevereiro, 2013**

**MARIA LEANDRA TERCENIO**

**MAPEAMENTO FÍSICO CROMOSSÔMICO DE ELEMENTOS REPETITIVOS EM  
*Semaprochilodus* spp. (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE):  
ESTUDO COMPARATIVO EM DIFERENTES TIPOS DE ÁGUAS AMAZÔNICAS**

Orientador: Eliana Feldberg, Dra.

Co-orientador: Marcelo Ricardo Vicari, Dr. UEPG/PR

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus, Amazonas**

**Fevereiro, 2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

T316 Terencio, Maria Leandra

Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em *Semaprochilodus* spp. (Characiformes, Prochilodontidae): estudo comparativo em diferentes tipos de águas amazônicas / Maria Leandra Terencio. --- Manaus : [s.n.], 2013.

xvii, 103 f. : il. color.

Tese (doutorado) --- INPA, Manaus, 2013.

Orientadora : Eliana Feldberg

Coorientador : Marcelo Ricardo Vicari

Área de Concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Peixes – Evolução genômica. 2. *Semaprochilodus insignis*. 3. *Semaprochilodus taeniurus*. 4. Jaraqui – Amazônia. 5. FISH (técnica). 6. Clonagem. I. Título.

CDD 19. ed. 597.52

### **Sinopse:**

*Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus*, conhecidas popularmente como *jaraquis* foram estudadas mediante análises de citogenética clássica (coloração convencional, detecção da heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo), molecular (clonagem, sequenciamento e hibridização fluorescente *in situ* de DNA repetitivo em tandem e disperso) e microdissecção do cromossomo W de *S. taeniurus*. Os resultados revelaram que as sequências repetitivas possuem papel atuante na carioevolução das espécies, principalmente na evolução do sistema de cromossomos sexuais em *S. taeniurus* e na origem dos múltiplos sítios de DNA ribossomal 5S.

Palavras - chave: *Semaprochilodus insignis*, *Semaprochilodus taeniurus*, sequências repetitivas, elementos transponíveis, FISH, clonagem

Dedico esta tese a todos aqueles  
que me ajudaram, apoiaram e  
torceram.

“Assim como casas são feitas de pedras, a ciência é feita de fatos. Mas uma pilha de pedras não é uma casa e uma coleção de fatos não é, necessariamente, ciência”

Jules Henri Poincaré

**A realização deste estudo foi possível devido:**

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao programa de pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV) e ao laboratório de Genética Animal (LGA).

Aos financiamentos fornecidos pelo Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2) e pelo Projeto Genômica comparativa de peixes amazônicos frente a diferentes desafios ambientais – (Pronex/ FAPEAM/CNPq 003/2009- Processo: 653:2009).

Ao laboratório de Citogenética e Evolução, sediado na Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa - PR, onde as análises envolvendo a microdissecção cromossômica foram realizadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e pela taxa de bancada (processo. 141660/2009-0) durante a realização deste estudo.

## **Agradecimentos**

Ao longo desse caminho perdi as contas de quantas vezes desejei ter como última obrigação escrever os **Agradecimentos** desta tese, entretanto aqui estou eu, olhando para o computador, sem saber o que escrever. Foram tantas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse possível que já vou me desculpando com aquelas que não forem citadas neste breve texto.

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu esposo Igor José Theodorovitz, pelo seu amor e compreensão ao longo desse caminho, pela sua dose absurda de paciência comigo, principalmente naqueles dias em que o trabalho não tinha rendido (nem eu me aguentava nesses dias). Obrigada por tudo!

Agradeço a toda minha família e amigos distantes que mesmo longe sempre me confortaram com palavras de otimismo e esperança, em especial aos meus pais Maria Inês Zanni e Flávio Cesar Terencio e à minha “vozinha” Teresa Maria Zanni, que mesmo tendo pavor de voar, veio rezando seu terço de Curitiba até Manaus só para me ver. Obrigada!

À minha orientadora Dra. Eliana Feldberg, por ser essa pessoa especial que literalmente adota os seus alunos como filhos. Obrigada pelos ensinamentos, oportunidades e confiança. A senhora sempre será especial em minha vida. A toda família do Laboratório de Genética Animal do INPA, obrigada pelos maravilhosos dias de convivência na bancada, no campo e na vida. Em especial ao Dr. Jorge Porto, Leila Braga Ribeiro e Eduardo Eler.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Ricardo Vicari pelos seus ensinamentos, paciência e disponibilidade mesmo estando tão longe. Perdi as contas de quantos e-mails intitulados “problemas” lhe enviei ao longo desse tempo. Estendo esse agradecimento ao Dr. Roberto Ferreira Artoni, Dra. Viviane Nogaroto Vicari, Dra. Mara Cristina de Almeida, Miguel Airton Carvalho, enfim, a todas as pessoas do Laboratório de Citogenética e Evolução (a famosa M-40) da UEPG que foram tão prestativas durante o tempo que fiquei no laboratório. Obrigada!

À minha segunda orientadora Maria Claudia Gross, por participar de TUDO: coletas, bancada, resumos, artigos, tese, etc.. Obrigada pelas idéias, dedicação, paciência, sinceridade e amizade. Sentirei falta de tudo, pode ter certeza! Ao pessoal do laboratório LACA-UFAM por me acolherem nessa fase final (mais perigosa) do doutorado. Diverti-me muito com vocês, na bancada e principalmente nas festinhas.

Ao amigo e também “finalista-sofredor-quase-doutor” Carlos Henrique Schneider que assim como eu sobreviveu para escrever os seus agradecimentos. Obrigada pela parceria em todo esse trabalho. Sei que perdemos muitas noites de sono por conta dos “problemas” de

bancada (os quais eram enviados por e-mail para o Marcelo Vicari), mas apesar de tudo (incluindo tiques nervosos e olho pulante) conseguimos cumprir nossos objetivos com muita diversão. Agora, vê se para de implicar comigo!

Ao povo do condomínio Morada do Sol que fez meus dias mais felizes, obrigada pela diversão e amizade.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente passaram pela minha vida. Sem vocês eu não seria quem sou e nem faria o que eu faço.

**Obrigada!**

## Resumo

O gênero *Semaprochilodus* é compreendido por seis espécies de peixes altamente exploradas no comércio pesqueiro que são conhecidas popularmente como *jaraquis*. A característica migratória destas espécies ao longo dos vários ambientes amazônicos obriga-as a experimentar diferentes águas com características físico-químicas completamente distintas que levam esse grupo a desenvolver, durante o processo evolutivo, uma grande plasticidade genotípica e fenotípica. Diante disto, utilizando ferramentas da citogenética clássica e molecular, neste trabalho foi identificada a fração repetitiva e a localização física destas sequências entre as espécies e populações de *S. insignis* e *S. taeniurus* que ocupam diferentes tipos de águas com o objetivo de compreender se a distribuição dos elementos repetitivos está relacionada a estes biótopos. Além disso, objetivou elucidar os mecanismos evolutivos que estabeleceram a diferenciação cromossômica sexual apenas em *S. taeniurus*. Foram utilizados 22 *Semaprochilodus taeniurus* (10 ♂, 12 ♀) e 20 *S. insignis* (10 ♂, 10 ♀) capturados nos rios Tapajós-PA, Negro-AM e lago Catalão-AM. Por ser um estudo comparativo, quatro *Prochilodus nigricans* (1 ♂, 3 ♀) bem como cinco *P. lineatus* (3 ♂, 2 ♀) foram incluídos neste estudo. No geral, os resultados encontrados não revelaram padrões associados aos diferentes biótopos tanto na análise intra-específica quanto interespecífica. Com relação à estrutura cariotípica de *S. insignis* e *S. taeniurus* os resultados indicaram uma conservação de um grande número de marcadores cromossômicos convencionais, porém diferenças significativas foram encontradas na distribuição da heterocromatina e no par portador da região organizadora de nucléolo. O DNAr 18S foi localizado em um único par cromossômico, enquanto o DNAr 5S apresentou sítios múltiplos, evidenciados em vários pares cromossômicos em ambas as espécies. A amplificação, clonagem e sequenciamento desta subunidade ribossomal foi confirmada, mas também revelou clones com deleção de pares de base na região codificante do gene, sugerindo que alguns sítios revelados pela FISH podem tratar-se de pseudogenes. A FISH cruzada com sondas *C<sub>ot</sub>-I* DNA revelou que os genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus* apresentam alto grau de similaridade tanto na estrutura quanto na localização dos sítios de hibridização. Entretanto, indicaram baixo grau de similaridade entre estes genomas e o genoma de *P. lineatus*, principalmente no que se refere aos cromossomos B. A clonagem e sequenciamento da fração repetitiva do genoma permitiram a identificação de inúmeros fragmentos classificados como microssatélites, transposons e retrotransposons. A pintura cromossômica da sonda W-específica de *S. taeniurus* em seus próprios cromossomos revelou hibridização completa no cromossomo W, sítios centroméricos e terminais no Z assim

como em outros cromossomos autossômicos. A hibridização cruzada desta sonda em *S. insignis*, *Prochilodus lineatus* e *P. nigricans* não revelou o proto-W, mas mostrou sinais positivos de hibridização de DNA repetitivo. A identificação das sequências W-específicas mostrou alta similaridade com microssatélites e elementos transponíveis as quais sugerem que a degeneração genética deste cromossomo pode ter ocorrido devido ao acúmulo destes DNA repetitivos. O mapeamento físico cromossômico de microssatélites e elementos transponíveis nos cromossomos de *S. insignis* e *S. taeniurus* indicaram que estas são mais abundantes no genoma de *S. taeniurus*, mas também ocorrem em regiões eucromáticas no genoma das duas espécies, indicando que algumas destas sequências possivelmente desempenhem algum papel funcional no genoma. Além disso, grandes clusters de sequências repetitivas obtidas neste estudo foram evidenciados nos cromossomos sexuais Z e W de *S. taeniurus*. Esta informação é de grande importância uma vez que o acúmulo de sequências repetitivas nas regiões ricas em genes pode refletir na diferenciação entre os proto-sexuais, evoluindo no par heteromórfico ZW observado em *S. taeniurus*. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que as sequências repetitivas possuem papel atuante na carioevolução das espécies, principalmente na evolução do sistema de cromossomos sexuais em *S. taeniurus* e na origem dos múltiplos sítios de DNA ribossomal 5S em ambas as espécies.

## Abstract

The genus *Semaprochilodus* comprises six fish species popularly known as *jaraquis* of high commercial value. The characteristic migratory movements of these species through various Amazonian environments expose them to waters with distinct physical-chemical characteristics, which have resulted in the evolution of considerable genotypic and phenotypic plasticity. We sought to identify the repetitive fractions of the genomes of species and populations of *S. insignis* and *S. taeniurus* that occupy different types of aquatic environments and physically locate those sequences are utilizing both traditional and molecular cytogenetic techniques and investigate the distribution of repetitive elements related to their biotypes. Additionally, we sought to examine the evolutive mechanisms that established sexual chromosome differentiation only in *S. taeniurus*. We examined 22 specimens of *Semaprochilodus taeniurus* (10 ♂, 12 ♀) and 20 specimens of *S. insignis* (10 ♂, 10 ♀) captured in the Tapajós (PA) and Negro (AM) rivers and in Catalão Lake (AM). As this was a comparative study, four individuals of *Prochilodus nigricans* (1 ♂, 3 ♀) and five of *P. lineatus* (3 ♂, 2 ♀) were included in the analysis. In general, the results did not reveal distinct patterns associated with the different biotypes in either the intra- or inter-specific analyses. In relation to the karyotypic structures of *S. insignis* and *S. taeniurus*, our results indicated the conservation of large numbers of conventional chromosome markers, but significant differences were observed in terms of heterochromatin distribution and in the chromosome pairs carrying the nucleolar organizer region. 18S DNAr was localized in only a single chromosome pair, while the 5S DNAr demonstrated multiple sites in various chromosome pairs in both species. The amplification, cloning, and sequencing of this ribosomal subunit was confirmed, but also revealed clones with deletions of base pairs in the coding region of the gene, suggesting that some sites identified by FISH may be pseudogenes. Cross-FISH using *Cot-1* DNA probes demonstrated that the genomes of *S. insignis* and *S. taeniurus* had high degrees of similarity in terms of both their structures and the locations of the hybridization sites. These analyses indicated low degrees of similarity between these genomes and that of *P. lineatus*, however, principally in terms of the B chromosomes. The cloning and sequencing of the repetitive fraction of the genome allow / allowed the identification of innumerable fragments classified as microsatellites, transposons, and retrotransposons. Marking by the W-specific probe of *S. taeniurus* on its own chromosomes revealed complete hybridization on chromosome W, on centromeric and terminal sites on Z, and on other

autosomal chromosomes. Cross hybridization with this probe in *S. insignis*, *Prochilodus lineatus*, and *P. nigricans* did not identify the proto-W chromosome, but demonstrated positive signs of hybridization with repetitive DNA. The identification of W-specific sequences demonstrated high similarity with microsatellites and transposable elements, which suggests that the genetic degeneration of this chromosome may have occurred through accumulations of these repetitive DNAs. The physical chromosomal mapping of microsatellites and transposable elements on the chromosomes of *S. insignis* and *S. taeniurus* indicated that they were more abundant in the *S. taeniurus* genome, but also occurred in euchromatic regions in the two species, indicating that some of these sequences could have functional roles in the genome. Additionally, large clusters of repetitive sequences were observed in the Z and W sexual chromosomes of *S. taeniurus*. This information is important because accumulations of repetitive sequences in regions rich in genes may play a role in the differentiation between the proto-sex chromosomes, evolving into the heteromorphic ZW pair observed in *S. Taeniurus*. The results obtained in the present study indicated that repetitive sequences have an active role in the karyoevolution of species, principally in the evolution of the sexual chromosome system in *S. taeniurus* and in the origin of the multiple 5S DNA ribosomal sites in both species.

## Sumário

I. Introdução Geral.....	18
I.1 Bacia amazônica e a influência dos tipos de água na ictiofauna.....	18
I.2 Família Prochilodontidae e sua importância comercial na Amazônia.....	20
I.3 Citogenética da família Prochilodontidae.....	22
I.4 Citogenética molecular.....	24
I.5 Objetivos.....	27
I.5.1 Objetivo geral.....	27
I.5.2 Objetivos específicos.....	27
II. Material e Métodos.....	28
II.1 Indivíduos amostrados e locais de coleta.....	28
III. Resultados e discussão.....	30
III.1 – Artigo 1 - Estabilidade cariotípica: regra geral para os peixes da família Prochilodontidae?.....	31
III.1.2 Introdução.....	32
III.1.3 Material e Métodos.....	33
III.1.4 Resultados.....	35
III.1.5 Discussão.....	39
III.2 – Artigo 2 – Sequências repetitivas: a diversidade oculta da heterocromatina nos peixes prochilodontidae.....	44
III.2.1 Resumo.....	45
III.2.2 Introdução.....	45
III.2.3 Material e métodos.....	47
III.2.4 Resultados.....	48
III.2.5 Discussão.....	54
III.3 – Artigo 3 – Sequências repetitivas associadas com a diferenciação do cromossomo W em <i>Semaprochilodus taeniurus</i> .....	59
III.3.1 Resumo.....	60
III.3.2 Introdução.....	60
III.3.3 Material e Métodos.....	61
III.3.4 Resultados.....	64
III.3.5 Discussão.....	69

III.4 – Artigo 4 – Dinâmica evolutiva do DNA repetitivo e cromossomos sexuais: <i>Semaprochilodus</i> (Characiformes, Prochilodontidae) como modelo. ....	73
III.4.1 Resumo.....	74
III.4.2 Introdução .....	74
III.4.3 Material e Métodos .....	76
III.4.4 Resultados .....	77
III.4.5 Discussão.....	81
V. Perspectivas .....	87
VI. Referências Bibliográficas .....	88

## Lista de figuras

### Introdução

- Figura 1:** Cladograma da família Prochilodontidae, estimado com base em caracteres morfológicos, proposto por Castro e Vari 2004. .... 20
- Figura 2:** Cladograma do gênero *Semaprochilodus*, estimado com base em caracteres morfológicos, proposto por Castro e Vari 2004. .... 21
- Figura 3:** Mapa indicando os locais de coletas. 1) Rio Negro/Lago Catalão; 2) Tapajós/Amazonas. .... 28

### Capítulo 1

- Figura 1:** Cariótipos de *Semaprochilodus insignis* (a) coloração convencional; (b) bandeamento-C; (c) Ag-RON e *Semaprochilodus taeniurus* (d) coloração convencional; (e) bandeamento-C; (f) Ag-RON. Em destaque: cromossomos sexuais..... 37
- Figura 2:** Cariótipos mostrando os DNAr 18S (sítios vermelhos) e 5S (sítios verdes). (a) *Semaprochilodus insignis*; (b) *Semaprochilodus taeniurus* e (c) *Prochilodus nigricans*. ..... 38
- Figura 3:** Alinhamento da sequência consenso do DNAr 5S de *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus* (5S-I) e uma das sequências que apresentou deleção na parte funcional do gene (5S-II). Em negrito está a região codificante do DNAr 5S, as bases sublinhadas referem-se ao local de anelamento dos primers. Os hífen indicam as deleções. .... 39

### Capítulo 2

- Figura 1:** FISH da fração repetitiva do genoma de três espécies da família Prochilodontidae. (a) cromossomos de *S. insignis* contracolorados com DAPI. (b) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *S. insignis* hibridizada em seus próprios cromossomos. (c) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *S. taeniurus* hibridizada nos cromossomos de *S. insignis*. (d) *Double-FISH* (e) cromossomos de *S. taeniurus* contracolorados com DAPI. (f) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. insignis* hibridizada nos cromossomos de *S. taeniurus*. (g) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. taeniurus* hibridizada em seus próprios cromossomos. (h) *Double-FISH*. (i) Cromossomos de *P. lineatus* contracolorados com DAPI. (j) Sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. insignis* hibridizada nos cromossomos de *P. lineatus*. (k) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. taeniurus* hibridizada nos cromossomos de *P. lineatus*. (l) *Double-FISH*. .... 51

### Capítulo 3

**Figura 1:** Cromossomos de *S. taeniurus* após (A) Bandeamento-C; (B) FISH com sonda telomérica; (C) FISH com sonda *Rex1*. ..... 64

**Figura 2:** Hibridização cruzada da sonda W-específica de *S. taeniurus* em (A) seus próprios cromossomos; (B) *S. insignis*; (C) *Prochilodus lineatus*; (D) *P. nigricans*. Bs = cromossomos B. Bar = 10  $\mu$ m. .... 69

**Figura 3:** Provável origem do cromossomo W em *Semaprochilodus taeniurus*. ..... 71

### Capítulo 4

**Figura 1:** Metáfases cromossômicas de *Semaprochilodus taeniurus*, hibridizadas com sequências microssatélites (a – f) e elementos transponíveis (g – k). Os cromossomos foram contracorados com DAPI e as sondas marcadas com biotina (verde) e digoxigenina (vermelho). Localização da heterocromatina constitutiva nesta espécie (l). ..... 79

**Figura 2:** Metáfases cromossômicas de *Semaprochilodus insignis* hibridizadas com sequências microssatélites (a – d) e elementos transponíveis (e, f). Os cromossomos foram contracorados com DAPI e as sondas marcadas com biotina (verde) e digoxigenina (vermelho) (a – k). Localização da heterocromatina constitutiva nesta espécie (g). ..... 81

**Figura 3:** Ideograma esquemático dos cromossomos sexuais de *Semaprochilodus taeniurus*, destacando o padrão de distribuição das sequências repetitivas evidenciadas pela FISH. Regiões em cinza representam a localização da heterocromatina constitutiva e em preto as sequências hibridizadas. .... 84

**Figura 4:** Cromossomos sexuais (Z e W) de *Semaprochilodus taeniurus* evidenciando: o padrão de localização das sequências repetitivas hibridizadas pela FISH; a localização da heterocromatina constitutiva (banda-C). .... 85

## Lista de tabelas

### Capítulo 2

**Tabela 1:** Homologia nucleotídica dos clones da fração *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *Semaprochilodus insignis* com sequências depositadas no NCBI e GIRI. .... 52

**Tabela 2:** Homologia nucleotídica dos clones da fração *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *Semaprochilodus taeniurus* com sequências depositadas no NCBI e GIRI..... 53

### Capítulo 3

**Tabela 1:** Exemplares e locais de captura das espécies analisadas. (F) fêmeas e (M) machos. .... 62

**Tabela 2:** Homologia nucleotídica dos clones W-específicos de *Semaprochilodus taeniurus* com sequências depositadas nos bancos públicos de sequências NCBI e GIRI. .... 66

### Capítulo 4

**Tabela 1:** Sequências repetitivas hibridizadas nos cromossomos de *S. insignis* e *taeniurus*. . 76

**Tabela 2:** Quadro comparativo de sequências hibridizadas em *S. insignis* e *S. taeniurus* += sinais de hibridização; - = ausência de hibridização. .... 80

## **I. Introdução Geral**

### **I.1 Bacia amazônica e a influência dos tipos de água na ictiofauna**

A bacia amazônica é constituída por um complexo sistema de drenagem formado por cerca de sete mil tributários que deságuam no Solimões-Amazonas. Nos aproximadamente 7.000.000 km<sup>2</sup> que definem sua área total, o regime de chuvas tropicais e a grande extensão de terras baixas são os fatores determinantes para que 300.000 km<sup>2</sup> de margens sejam alagadas anualmente, contribuindo para a heterogeneidade dos ambientes amazônicos (Goulding *et al.* 2003). Aliado a isso, as características geológicas, físicas, químicas e biológicas contribuem para a inexistência de ambientes idênticos dentro desta bacia (Junk & Furch, 1993).

Os rios amazônicos são diferentes não apenas na morfologia de seus cursos, mas também nas características físico-químicas de suas águas. Com base nestes fatores Sioli (1950) subdividiu as águas amazônicas em "brancas", "pretas" e "claras". As águas brancas apresentam-se turvas, com coloração barrenta e baixa transparência, em razão de carrearem uma grande quantidade de sedimentos resultantes dos processos de erosão da Cordilheira dos Andes. Estes sedimentos conferem à água uma composição química rica em sais minerais, com pH quase sempre próximo ao neutro (6,5 a 7) e condutividade alta. As águas pretas recebem este nome devido à coloração escura que possuem quando em grande volume. A cor escura é devida à grande concentração de ácidos húmicos e fúlvicos que se originam da decomposição incompleta, em condições de acidez, da matéria orgânica das florestas que circundam os rios e dos processos edáficos existentes nos solos amazônicos. Ainda são desconhecidos os fatores que causam a produção destes ácidos. A acidez (pH entre 3,0 e 5,0) se deve à ausência de cálcio/magnésio e à pobreza de sais minerais. As águas claras apresentam maior transparência com coloração verde claro. Apesar de possuírem certa heterogeneidade nos padrões físico-químicos seu pH varia, de maneira geral, entre 4,5 e 7,0 e sua condutividade é relativamente baixa (Sioli 1984; Furch 1984).

Além dos diferentes tipos de água, a biota amazônica também está adaptada aos pulsos de inundação, sendo que na época da cheia grandes regiões de floresta tornam-se alagadas (Junk e Furch 1993). Nestas regiões há uma tendência para o estabelecimento de condições hipóxicas permanentes ou transitórias nos ambientes aquáticos. Isto faz com que diferentes espécies de peixes se estabeleçam de acordo com suas demandas de oxigênio e

comportamento, o que culmina em uma distribuição peculiar da ictiofauna nas áreas alagáveis (Junk *et al.* 1997). Florestas alagadas por água branca rica em sedimentos e nutrientes são conhecidas como várzea, já as florestas alagadas por água preta rica em ácidos húmicos e pobre em nutrientes são conhecidas como igapós. Estes dois ambientes apresentam alta diversidade de peixes, entretanto diferem em sua composição (Junk *et al.* 1997; Parolin *et al.* 2004).

Como os organismos aquáticos respondem diretamente às alterações na composição físico-química do meio, os peixes amazônicos desenvolveram um avançado conjunto de habilidades para manter a homeostase orgânica quando expostos a diversas condições ambientais desfavoráveis, seja de origem natural. Estas estratégias adaptativas ocorrem em todos os níveis da escala biológica, desde o nível molecular até o nível comportamental e foram desenvolvidas em resposta a uma pressão seletiva causada por desafios ambientais crônicos, tais como: mudanças na disponibilidade de oxigênio dissolvido, águas pobres em íons, acidez, oscilações de temperatura, radiação ultravioleta, entre outros. O desenvolvimento de estratégias adaptativas frente à pressão seletiva do ambiente pode ter contribuído no processo de especiação dos peixes amazônicos, bem como nos diferentes padrões de plasticidade que algumas espécies exibem (Slobodkin e Rapoport 1974; Wootton 1990; Wilkelski e Cooke 2006).

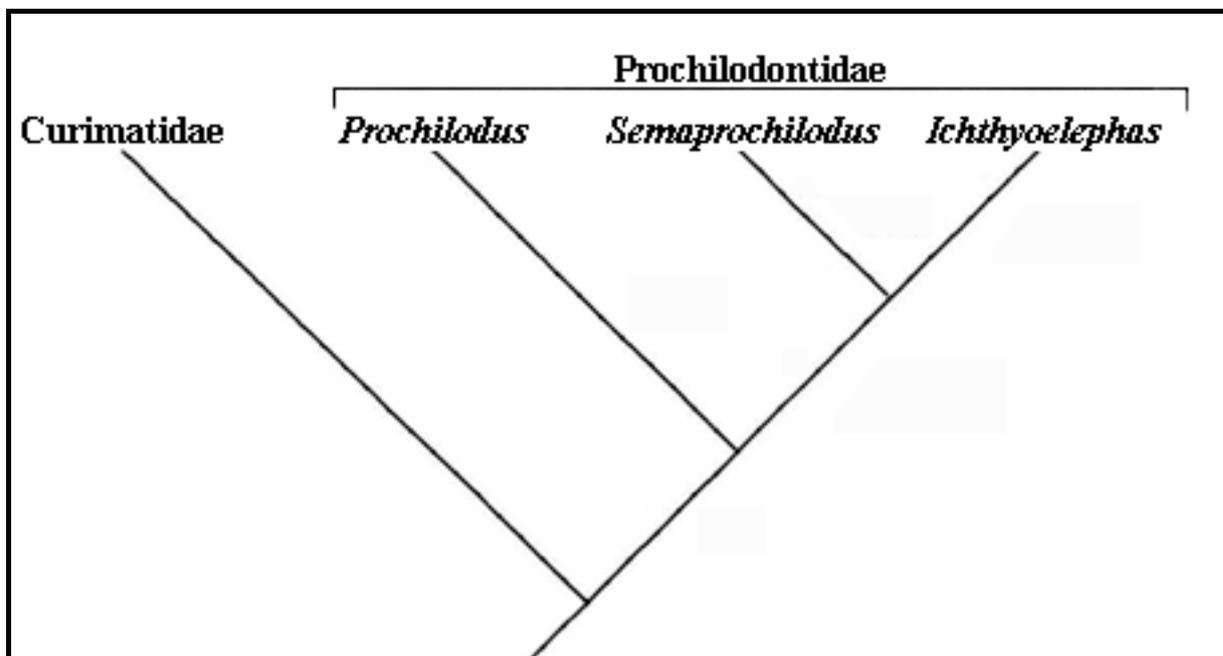
As migrações laterais constituem um exemplo da heterogeneidade físico-química a que muitas espécies de peixes são submetidas constantemente. Nestes processos os peixes deixam os rios de água clara e preta com destino aos rios de água branca, para que possam crescer acumular gordura e desovar em ambientes onde a produtividade de alimento é maior (Goulding 1980). Posteriormente, retornam ao seu habitat original. Todavia, também ocorrem desovas nos rios de águas consideradas pobres, como é o caso do rio Negro (Ribeiro, 1985). Esta rica variedade de ambientes permite que a ictiofauna seja exposta a diferentes níveis de pH, concentrações de oxigênio dissolvido e outros fatores que divergem entre os diferentes tipos de águas amazônicas.

Desta forma, algumas espécies desenvolveram estratégias para tentar vencer as adversidades a que são submetidas constantemente, como as pertencentes à família Prochilodontidae. Porém, os processos que conferem esta adaptabilidade aos peixes amazônicos ainda não estão elucidados.

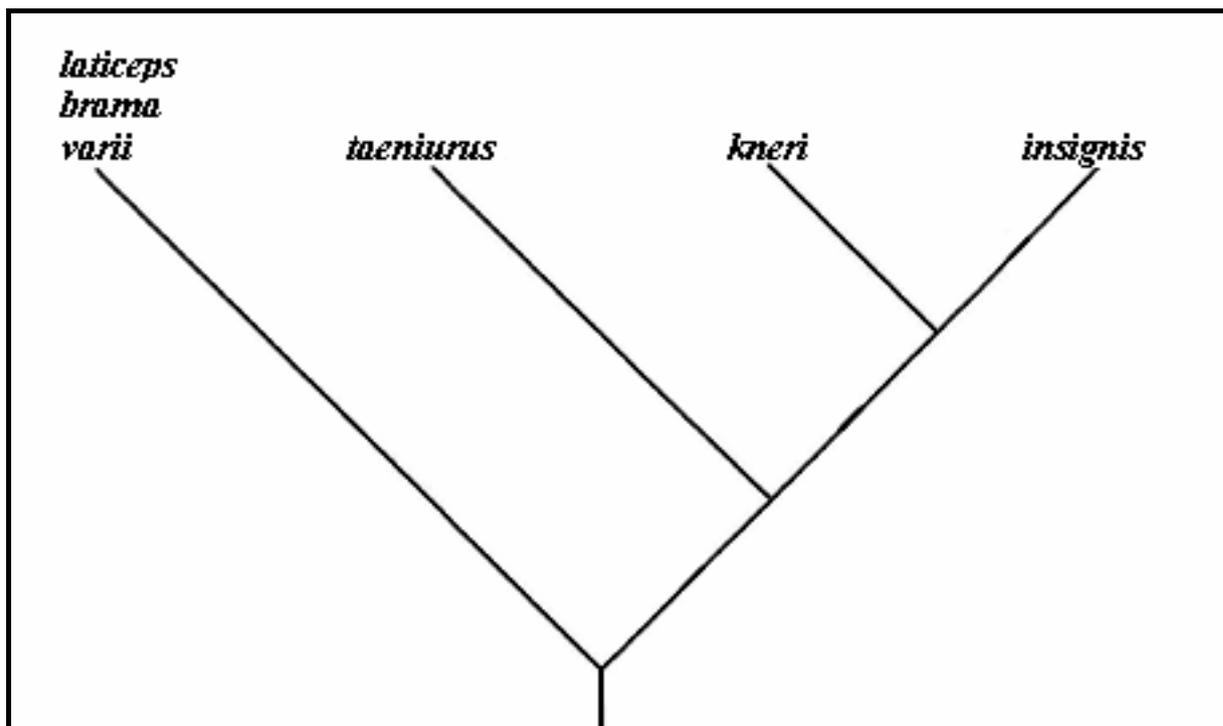
## I.2 Família Prochilodontidae e sua importância comercial na Amazônia

A família Prochilodontidae é compreendida por 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus*. O gênero *Semaprochilodus* é composto por seis espécies (*Semaprochilodus brama*, *Semaprochilodus insignis*, *Semaprochilodus kneri*, *Semaprochilodus laticeps*, *Semaprochilodus taeniurus* e *Semaprochilodus varii*) das quais somente *S. taeniurus* e *S. insignis* são endêmicas da bacia amazônica central (Castro e Vari 2003). Ainda, híbridos naturais podem ocorrer entre estas duas espécies (Ribeiro 1985; Teixeira *et al.* 1990).

Estudos biogeográficos estimam que a família apresenta cerca de 12 milhões de anos, entretanto a sistemática é um tanto complexa devido à extraordinária estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos adotados para a distinção das diferentes espécies (Castro e Vari 2004). Filogenias construídas com base em caracteres morfológicos (informações osteológicas e sistemas anatômicos) e moleculares (ATPase, D-loop, ND4 and COI) indicam que *Prochilodus* é grupo irmão de *Semaprochilodus* (Sivassundar *et al.* 2001; Castro e Vari 2004; Turner *et al.* 2004) (Figura 1). A última filogenia estimada para o gênero *Semaprochilodus* (Castro e Vari 2004) *S. brama*, *S. laticeps* e *S. varri* aparecem com grupo irmão do clado *S. taeniurus* (*S. kneri* (*S. insignis*)) (Figura 2).



**Figura 1:** Cladograma da família Prochilodontidae, estimado com base em caracteres morfológicos, proposto por Castro e Vari 2004.



**Figura 2:** Cladograma do gênero *Semaprochilodus*, estimado com base em caracteres morfológicos, proposto por Castro e Vari 2004.

A maioria das espécies que compreendem esta família é amplamente distribuída ao longo das grandes bacias hidrográficas da América do Sul e podem efetuar grandes migrações com propósito reprodutivo (Mago-Leccia 1972). Apresentam tolerância a variações no ambiente em que vivem, tais como mudança de pH, estratificação de temperatura, normóxia e hipóxia, porém estas mudanças ambientais podem alterar o padrão de migração de muitas espécies (Val *et al.* 1984).

Prochilodontidae está entre as famílias mais exploradas com fins pesqueiros, onde contribuem com pelo menos 1/3 da produção total do pescado. Na Amazônia, o peixe é um dos recursos naturais mais abundantes e utilizados já que sua importância está relacionada à alimentação humana, contribuindo com quase 70% da proteína animal consumida pela população amazônica. O aspecto mais relevante da importância do pescado para as populações amazônicas é o grande acesso entre as classes sociais de menor poder aquisitivo (Castro e Vari 2004).

Um dos peixes mais explorados é o jaraqui, gênero *Semaprochilodus*. Por ser o peixe mais consumido na região amazônica, é o que mais sofre com a pesca comercial já que a concentração dos grandes cardumes durante as migrações de desova nas proximidades de Manaus são alvos fáceis da frota de pesca que comercializa pescado nessa cidade (Ruffino e

Isaac 1994). Por conta disso, o jaraqui já apresenta sinais de sobrepesca. Segundo Agostinho *et al.* (2005), os estoques ainda estão se mantendo, talvez pelo fato desta espécie possuir um ciclo de vida curto o que faz com que atinja a idade reprodutiva mais rápido.

A característica migratória do jaraqui ao longo dos vários ambientes amazônicos obriga-o a experimentar diferentes águas com características físico-químicas completamente distintas (Veríssimo 1895; Goulding e Carvalho 1982). As pressões ambientais a que esta e outras espécies de peixes têm sido submetidas levam esse grupo a desenvolver, durante o processo evolutivo, uma grande plasticidade genotípica e, conseqüentemente, fenotípica (Almeida-Val e Farias 1996).

Diversos estudos foram realizados com *Semaprochilodus* spp. da Amazônia central, principalmente relacionados à morfologia (Ribeiro 1983; 1985), reprodução (Araújo-Lima 1984; Vazzoler 1989a e 1989b; Oliveira 1996; Leite 2000; Leite e Araújo-Lima 2002; Oliveira 2003; Lima e Araújo-Lima 2004; Leite *et al.* 2006), fisiologia (Val 1986; Val *et al.* 1998) e genética (Feldberg *et al.* 1987; Teixeira *et al.* 1990; Oliveira *et al.* 2003; Passos *et al.* 2010).

### **I.3 Citogenética da família Prochilodontidae**

Com relação a aspectos citogenéticos, *S. insignis* e *S. taeniurus* possuem número diploide igual a 54 cromossomos cujo cariótipo apresenta 20 pares de cromossomos metacêntricos e sete pares de cromossomos submetacêntricos. A única diferença encontrada na macroestrutura cariotípica entre as duas espécies é a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em *S. taeniurus*. Em peixes os cromossomos sexuais heteromórficos podem estar ausentes ou diferenciados. Sistemas de cromossomos sexuais onde o macho é heterogamético são denominados XX/XY, já quando a fêmea é heterogamética o sistema é denominado ZZ/ZW (Ezaz *et al.* 2006). Para alcançar o estado de cromossomos sexuais heteromórficos, estes cromossomos sofrem várias etapas de diferenciação ao longo de milhares de anos, evoluindo a partir de um par de cromossomos autossômico ancestral. Esta hipótese foi criada a partir da observação de sistemas de cromossomos sexuais em diversas etapas da evolução, desde sistemas onde o X e o Y (ou o Z e o W), por exemplo, são dificilmente distinguíveis morfologicamente até sistemas completamente heteromórficos (Muller 1964). Na origem dos cromossomos sexuais, dois fatores principais auxiliam na diferenciação entre os cromossomos denominados “proto-par” sexual por meio da perda de recombinação: a amplificação de sequências repetitivas e

rearranjos cromossômicos. Rearranjos como translocações e inversões causam a redução ou supressão de *crossing-over* em regiões próximas ao ponto de quebra. Nestas regiões onde o *crossing-over* ficou reduzido ou ausente, existe uma tendência de acúmulo de sequências de DNA satélite em tandem e de elementos transponíveis. Regiões de acúmulo de DNA satélite (heterocromáticas) são conhecidas pela ausência de *crossing-over*. Devido a inserções destes elementos e DNA satélite, as regiões vizinhas adjacentes a região sem recombinação, também estariam restritas ao *crossing-over* (Charlesworth *et al.* 2005).

Com relação à região organizadora de nucléolo (RON) as duas espécies apresentam marcação intersticial no braço curto do segundo par cromossômico submetacêntrico. A heterocromatina constitutiva se distribui na forma de grandes blocos heterocromáticos localizados na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento (Feldberg *et al.* 1987).

Os peixes do gênero *Prochilodus* também apresentam um cariótipo padrão, com número diploide  $2n=54$  cromossomos de dois braços. Em especial, algumas espécies e populações deste gênero, a exemplo de *Prochilodus lineatus*, têm demonstrado uma intensa variação intra e interpopulacional de microcromossomos supranumerários (Pauls e Bertollo 1983; 1990; Dias *et al.* 1998; Cavallaro *et al.* 2000; Jesus e Moreira-Filho 2003; Artoni *et al.* 2006; Vicari *et al.*, 2006, Voltolin *et al.* 2010; 2011).

No gênero *Prochilodus* um único par de cromossomos com RONS ativas tem sido observado em *P. lineatus* (Pauls e Bertollo 1990). No entanto, o emprego da localização *in situ* de genes ribossomais 18S tem indicado a presença de polimorfismos numéricos destes genes não só em *P. lineatus* assim como em outra espécie deste mesmo gênero, *P. marggravii* (Jesus e Moreira-Filho 2003). Em adição, genes 5S indicam uma distribuição cariotípica sintênica para as famílias de DNAr 18S e 5S nestas espécies (Vicari *et al.*, 2006). Ainda, algumas espécies têm demonstrado uma intensa variação numérica intra/interpopulacional devida em relação à presença de microcromossomos supranumerários. (Pauls e Bertollo 1983, 1990; Artoni *et al.* 2006). Esses cromossomos são facilmente identificáveis, apresentando-se como microcromossomos heterocromáticos, podendo variar em número entre 0 - 7 (Pauls e Bertollo 1983; Oliveira *et al.* 1997; Cavallaro *et al.* 2000, Voltolin *et al.* 2011). Jesus *et al.* (2003) obtiveram e descreveram dados citológicos para duas famílias de DNA satélite em *Prochilodus lineatus*, sendo uma delas verificada em todos os microcromossomos B. Ao empregar estas duas sequências de DNAs repetitivos no mapeamento físico por FISH em

outra população de *P. lineatus* Artoni *et al.* (2006) propuseram a origem isocromossômica para estes elementos acessórios no genoma da espécie.

Apesar da citogenética clássica responder muitas questões relacionadas à evolução cariotípica de *Semaprochilodus*, técnicas mais sensíveis, como a identificação de sequências específicas de DNA nos cromossomos através de sondas, tendem a revelar polimorfismos intra e interespecíficos não detectados por ferramentas de citogenética clássica.

#### **I.4 Citogenética molecular**

Com o aumento de informações sobre os cromossomos cresceu a necessidade de se conhecer mais sobre a organização do DNA nos cromossomos metafásicos e interfásicos. Esta questão levou alguns geneticistas a investigarem a organização molecular da cromatina dando início aos estudos citogenéticos moleculares (Guerra 1988).

O método de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), descrito por Pinkel *et al.* (1986) permite a detecção de sequências específicas em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos através da hibridização de sequências complementares (sondas). Esta técnica proporciona a interação entre conhecimentos da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular e consiste basicamente na hibridização de um fragmento de DNA ou RNA situado dentro da célula do organismo que está sendo estudado. Esta técnica é muito usada no mapeamento de genomas, na detecção de sequências únicas e, principalmente, de sequências de DNA repetitivo. O padrão de FISH em cromossomos metafásicos, usando sequências repetitivas em tandem, é apontado como um excelente marcador físico para a identificação de cromossomos (Friebe *et al.* 1993; Brasileiro-Vidal e Guerra 2002).

Em peixes a hibridização fluorescente *in situ* tem permitido novas interpretações da diversidade, principalmente sobre a origem dos cromossomos sexuais e supernumerários e sobre a organização genômica de segmentos cromossômicos específicos (centrômero, telômero e sítios ribossomais) (Galetti Jr e Martins 2004).

Nos vertebrados, os genes de cópia única correspondem de 2 - 10% do genoma, sendo o restante formado por regiões repetitivas (Horvath *et al.* 2001). Os eucariotos possuem dois tipos de DNA altamente repetitivos: sequências de DNA repetitivos em tandem e sequências de DNA repetitivo dispersas. As sequências de DNA repetitivo em tandem incluem: os DNAs satélite, enquanto que as sequências repetitivas dispersas englobam os elementos transponíveis (Phillips e Reed 1996; Martins 2007)

As sequências repetitivas são divididas em não-codificantes e codificantes, embora já sejam conhecidos elementos transponíveis e DNA satélites que podem ser transcritos. As sequências “não-codificantes” são representadas pelos DNAs satélites, minisatélites, microsatélites (Levinson e Gutman 1987) e elementos transponíveis (Feschotte 2004). Já as sequências codificantes são compostas pelas famílias multigênicas, das quais os genes mais estudados são as histonas e os RNAs ribossomais (Long e David 1980; Pendás *et al.* 1994).

As sequências “não-codificantes” são divididas de acordo com a organização: em tandem ou dispersos. A classificação das sequências organizadas em tandem ocorre de acordo com o tamanho das unidades de repetição. O primeiro grupo é representado pelo DNA satélite (DNAsat), o qual possui unidades que alcançam de 100 a 1000 nucleotídeos, variando em localização e quantidade dentro do cromossomo, representando o componente principal da heterocromatina e localizado preferencialmente em regiões pericentroméricas e teloméricas. Geralmente o DNAsat é espécie específico, mas existem grupos de espécies que compartilham a mesma família de DNA (Timberlake 1978).

O segundo grupo compreende o DNA moderadamente repetitivo, possuindo unidades que variam de 10 a 100 pb de tamanho, sendo denominados minisatélites (Jeffreys *et al.* 1985). Acredita-se que possuam função como intermediário no início de pareamento em alguns genomas eucarióticos (Sumner 2003; Martins *et al.* 2011).

Outro grupo de DNA repetitivo é conhecido como microsatélite e é formado por repetições curtas de 1 a 6 bp (Weber e May 1989). Possuem participação na organização da cromatina, replicação do DNA, recombinação e regulação da atividade genética. Apresentam também importância em estudos de genética de população, conservação, epidemiologia, entre outros, sendo amplamente utilizados como marcadores genéticos (Sumner 2003; Martins *et al.* 2011).

Os elementos móveis diferem de outras sequências do genoma devido à sua capacidade de mobilização, que pode gerar duplicação e polimorfismos no sítio de sua inserção e apresentar variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (Hart *et al.* 1992; Capy *et al.* 1998; Almeida e Carareto 2005). A classificação desses elementos é feita de acordo com o tipo intermediário de transposição, sendo definidos como pertencentes à classe I, aqueles que utilizam a transcriptase reversa para se transporem via um intermediário de RNA (retrotransposons). Existem três tipos de elementos transponíveis nesta classe: elementos longos intercalados (*long interspersed elements*-LINEs), elementos curtos intercalados (*short interspersed elements*-SINEs) e os que possuem longas repetições

terminais (*long terminal repeats*-LTRs). Os pertencentes à classe II incluem todos aqueles que se transpõem diretamente de DNA para DNA (transposons), usando uma enzima (transposase), por eles codificada (Van Sluys *et al.* 2001; Tafalla *et al.* 2006; Martins 2007). A mobilização dos elementos móveis parece não ser ao acaso e pode responder a condições do meio ambiente, influenciando a expressão de genes, ativando ou silenciando-os, quando inseridos próximo ou dentro destes (Burt e Trivers 2006). Recentemente, o projeto *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) mostrou que a fração repetitiva do genoma é rica em elementos funcionais que controlam a atividade gênica em muitos níveis além de possuir função estrutural no genoma, incluindo sítios de ancoragem de proteínas (Dunham *et al.* 2012).

Atualmente admite-se que boa parte da instabilidade do genoma é o fator que garante uma rápida adaptação dos organismos ao ambiente sendo os elementos repetitivos um dos principais responsáveis por esta plasticidade. Estudos recentes demonstram que sequências repetitivas conferem uma adaptação térmica a vários organismos, dentre eles os peixes (Varriale *et al.* 2008). Com relação à ictiofauna amazônica estudos com esta abordagem são inovadores e restringem-se ao acará-disco (*Symphysodon* spp.), onde foi verificado que elementos repetitivos podem estar atuando na adaptação a diferentes biótopos (Gross *et al.* 2010a), a traíra (*Hoplias malabaricus*), onde evidenciaram padrões distintos de estrutura e composição destas sequências entre peixes provenientes de águas pretas e brancas (Santos 2012) e ao tamoatá (*Hoplosternun litoralle*) onde também verificou-se padrões distintos de estrutura e composição destas sequências entre peixes provenientes de ambientes naturais e antropizados (Gross *et al.* 2012).

Desta forma, a identificação e utilização de elementos repetitivos (satélites, microssatélites e elementos transponíveis) no mapeamento físico cromossômico de *Semaprochilodus* spp. pode proporcionar uma melhor visão do genoma das espécies, de como este genoma está organizado e como ocorreu a sua evolução, principalmente os mecanismos evolutivos que estabeleceram a diferenciação cromossômica sexual apenas em *S. taeniurus*. Além disso, o entendimento de como estas sequências se comportam frente a estresses ambientais são indispensáveis para serem empregadas em estudos de genética aplicada.

## **I.5 Objetivos**

### **I.5.1 Objetivo geral**

Identificar e mapear sequências de DNA repetitivo em *Semaprochilodus taeniurus* e *S. insignis*, visando compreender como estes elementos se comportam entre as espécies e em diferentes ambientes aquáticos amazônicos.

### **I.5.2 Objetivos específicos**

Estabelecer o padrão de localização física cromossômica de elementos repetitivos em *S. taeniurus* e *S. insignis*.

Identificar possíveis correlações entre alterações na localização física cromossômica dos elementos repetitivos e os diferentes habitats.

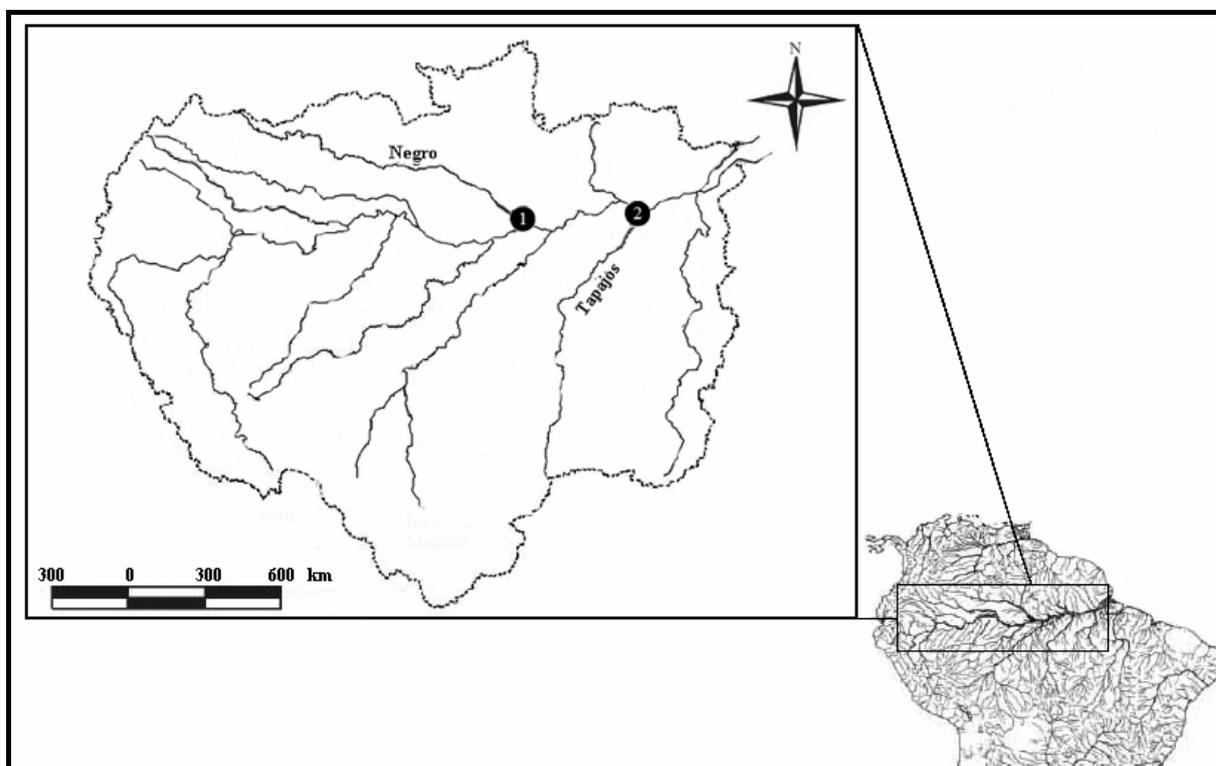
Compreender os mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica sexual de *Semaprochilodus taeniurus*.

Identificar e analisar a fração repetitiva dos genomas *S. insignis* e *S. taeniurus*

## II. Material e Métodos

### II.1 Indivíduos amostrados e locais de coleta

Foram estudados citogeneticamente 22 indivíduos de *Semaprochilodus taeniurus* (12 fêmeas e 10 machos), 20 de *Semaprochilodus insignis* (10 fêmeas e 10 machos) capturados nos rios Tapajós-PA e lago Catalão (confluência dos rios, Negro e Solimões), quatro indivíduos de *Prochilodus nigricans* (3 fêmeas e 1 macho) coletados no lago Catalão (Figura 3). Ainda, cinco indivíduos de *P. lineatus* (2 fêmeas e 3 machos) coletados no rio Tibagi –PR, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).



**Figura 3:** Mapa indicando os locais de coletas. 1) Rio Negro/Lago Catalão; 2) Tapajós/Amazonas.

Os peixes foram coletados com redes de pesca e mantidos vivos em aquário aerado até o momento da realização das preparações citogenéticas. A maioria das análises foi realizada no laboratório de Genética Animal - INPA.

Fragmentos de tecido muscular e tecido renal foram utilizados para extração de DNA genômico e obtenção de suspensão celular, respectivamente. Os peixes analisados foram

numerados, registrados, fixados em formol 10% durante 24h e posteriormente acondicionados em recipientes contendo álcool 70%. Espécimes voucher de *S. insignis*, *S. taeniurus* e *P. nigricans* foram depositados na coleção ictiológica do INPA (Tombamentos: 39001; 39002; 39003 e 39004). Exemplares de *P. lineatus* encontram-se depositados no museu de zoologia da Universidade Estadual de Londrina - PR (UEL 1737).

Todas as coletas foram realizadas com autorização de coleta (ICMBio SISBIO 10609-1/2007) em nome de Eliana Feldberg.

Os métodos utilizados neste estudo não foram descritos neste momento por estarem incluídos no tópico Material e Métodos nos capítulos que se seguem.

### III. Resultados e discussão

Os resultados obtidos neste estudo e a discussão dos dados são apresentados na forma de quatro artigos científicos, mencionados a seguir:

III.1 – Artigo 1 – Estabilidade cariotípica: regra geral para os peixes da família Prochilodontidae? (2012) *Hydrobiologia* 686:147-156.

III.2 – Artigo 2 – Sequências repetitivas: a diversidade oculta da heterocromatina nos peixes prochilodontidae. Submetido para publicação no periódico *BMC Genetics* em 05/10/2012. Primeira revisão efetuada em 17/12/2012.

III.3 – Artigo 3 – Sequências repetitivas associadas com a diferenciação do cromossomo W em *Semaprochilodus taeniurus*. Submetido para publicação no periódico *Genetica* em 03/08/2012. Aceito para publicação em 26/11/2012.

III.4 –Artigo 4 – Dinâmica evolutiva do DNA repetitivo e cromossomos sexuais: *Semaprochilodus* (Characiforme, Prochilodontidae) como modelo. Submetido para publicação no periódico *Sexual Development* em 19/11/2012. Primeira revisão efetuada em 19/12/2012.

### III.1 – Artigo 1 - Estabilidade cariotípica: regra geral para os peixes da família Prochilodontidae?



#### III.1 Capítulo 1

---

Hydrobiologia (2012) 686:147–156  
DOI 10.1007/s10750-012-1006-3

PRIMARY RESEARCH PAPER

### Stable karyotypes: a general rule for the fish of the family Prochilodontidae?

Maria Leandra Terencio · Carlos  
Henrique Schneider · Maria Claudia Gross ·  
Marcelo Ricardo Vicari · Eliana Feldberg

Received: 14 July 2011 / Revised: 9 January 2012 / Accepted: 15 January 2012 / Published online: 1 February 2012  
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

### III.1.1 Resumo

Estudos citogenéticos envolvendo a família Prochilodontidae têm mostrado que estes peixes apresentam número diploide constante e macroestrutura cariotípica conservada. Entretanto, ferramentas da citogenética clássica apresentaram pouco poder resolutivo para revelar a variação intra e interespecífica neste grupo de peixes. Desta forma, este estudo foi focado no mapeamento físico cromossômico comparativo, utilizando DNAr 18S e 5S entre as espécies *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus*. A espécie *Prochilodus nigricans* foi analisada conjuntamente como grupo externo neste estudo. Os resultados obtidos indicam uma conservação de um grande número de marcadores cromossômicos convencionais, no entanto algumas diferenças significativas foram encontradas na distribuição da heterocromatina e no par portador da região organizadora de nucléolo. Na análise citogenética molecular, a localização do DNAr 18S evidenciou um par cromossômico portador destes sítios nas espécies analisadas, caráter conservado para a maioria das espécies desta família. Entretanto, a estabilidade quanto ao número e localização cromossômica do DNAr 5S observada nos Prochilodontidae não foi confirmada para *S. insignis* e *S. taeniurus*. Estas espécies evidenciaram múltiplos sítios DNAr 5S. A amplificação, clonagem e sequenciamento com primers rDNA 5S específicos confirmaram que o fragmento hibridizado se refere a um monômero de DNAr 5S. No entanto, uma das sequências apresentou uma deleção de 11 pb interna à região do transcrito. Possivelmente, esta sequência pode ser derivada por pseudogene. Dessa forma, apesar de muitos trabalhos indicarem que a família Prochilodontidae apresenta uma evolução cariotípica conservada, a aplicação de ferramentas moleculares utilizando segmentos cromossômicos como sonda revelou que esta estabilidade não pode ser estendida ao nível genômico para as espécies *S. insignis* e *S. taeniurus*.

### III.1.2 Introdução

A família Prochilodontidae é compreendida por 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus*. A sistemática desta família é bastante complexa devido à extraordinária estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos adotados para a distinção de suas espécies (Mago-Leccia 1972).

O gênero *Semaprochilodus* é composto por seis espécies conhecidas popularmente como jaraqui, das quais somente *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus* são endêmicas da bacia amazônica central (Castro e Vari 2003). Por terem grande importância no comércio

pesqueiro (Barletta *et al.* 2010), diversos estudos relacionados à morfologia (Ribeiro 1983 e 1985), reprodução (Vazzoler e Amadio 1989; Vazzoler *et al.* 1989), biologia (Leite e Araújo-Lima 2002; Oliveira 2003; Lima e Araújo-Lima 2004; Leite *et al.* 2006), fisiologia (Val *et al.* 1984; Val *et al.* 1998) e genética (Feldberg *et al.* 1987; Teixeira *et al.* 1990; Oliveira *et al.* 2003) já foram realizados nestas espécies.

Com relação a aspectos citogenéticos, o número e a morfologia cromossômica das espécies do gênero *Semaprochilodus* relatam a natureza conservativa de  $2n=54$  cromossomos do tipo meta e submetacêntricos, característico dos Prochilodontidae (Pauls e Bertollo 1990; Oliveira *et al.* 2003). O caráter com maior divergência encontrado até então na macroestrutura cariotípica entre as espécies deste gênero é a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em *S. taeniurus* (Feldberg *et al.* 1987).

Apesar da citogenética clássica responder várias questões relacionadas à evolução cariotípica em muitos grupos de peixes, até o presente momento esta ferramenta apresentou pouco poder resolutivo para revelar a variação intra e interespecífica do gênero *Semaprochilodus*. Entretanto, procedimentos de citogenética molecular como a identificação de sequências específicas de DNA nos cromossomos através de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) podem revelar novas interpretações da diversidade, principalmente sobre a origem dos cromossomos sexuais, supranumerários e sobre a organização genômica de segmentos cromossômicos específicos (Voltolin *et al.* 2010; Gross *et al.* 2010a; b).

O mapeamento físico cromossômico dos genes ribossomais tem sido empregado para ajudar a elucidar questões relacionadas à organização cromossômica e carioevolução em muitos grupos de peixes (Valente *et al.* 2011; Gross *et al.* 2010b; Vicari *et al.* 2010). Desta forma, este estudo foi focado na comparação dos marcadores da citogenética clássica (coloração convencional, padrão de banda-c e localização das regiões organizadoras de nucléolo), das sequências DNAr 5S e no mapeamento físico cromossômico dos sítios DNAr 18S e 5S entre *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus* com o objetivo de analisar a diversificação cariotípica destes marcadores nestas espécies de Prochilodontidae.

### III.1.3 Material e Métodos

Foram amostrados citogeneticamente 10 indivíduos de *Semaprochilodus insignis* (6 fêmeas e 4 machos) e 12 de *Semaprochilodus taeniurus* (7 fêmeas e 5 machos) coletados com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis-10609-1/2007)

na confluência dos rios Negro/Solimões -AM (03°09'57"S/59°54'44"W) e Amazonas/Tapajós-PA (02°33'06"S/55°11'03"W). Como grupo externo para análises de citogenética molecular, quatro indivíduos de *Prochilodus nigricans* (3 fêmeas e 1 macho) foram analisados, sendo estes provenientes da confluência dos rios Negros/Solimões-AM. Os peixes foram anestesiados em água gelada e sacrificados. Os espécimes testemunhos foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética Animal /INPA (10034, 10037, 10047, 10696).

#### III.1.3.1 *Extração de DNA e amplificação das subunidades de DNAr 18S e 5S*

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular preservado em etanol 100% utilizando o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Os DNAr 18S e 5S foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT- 3') e 18Sr (5'-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010b) e 5Sa (5' -TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5Sb (5' -CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3') (Komiya e Takemura 1979), respectivamente. As reações foram conduzidas em um volume final de 25 µl consistindo de 1 µl de DNA genômico (100 ng), 2,5 µl de tampão 10× com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,25 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura para completar o volume. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: DNAr 18S: 1 minuto a 95 °C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). DNAr 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação); 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 59 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final).

#### III.1.3.2 *Clonagem e sequenciamento do DNAr5S*

Os produtos de PCR foram clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) utilizados para transformar células competentes DH5α de *Escherichia coli* (Promega). Os clones das subunidades do DNAr 5S de *S. insignis* e *S. taeniurus* foram purificados usando o kit de purificação GFX PCR (GE Healthcare) e sequenciados usando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3130xl. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1994), incluída no programa BioEdit 7.0 (Hall 1999). As sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências conhecidas por meio da ferramenta BLASTN/*nucleotide sequences* contida no banco público de sequências - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### III.1.3.3 *Obtenção dos cromossomos, detecção das regiões heterocromáticas e regiões organizadoras de nucléolo*

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais utilizando colchicina *in vivo* seguindo o protocolo descrito por (Bertollo *et al.* 1978). A heterocromatina foi detectada utilizando o protocolo descrito por Sumner (1972) e a região organizadora de nucléolo (Ag-RONs) foram detectadas com nitrato de prata (Howell e Black 1980).

### III.1.3.4 *Hibridização fluorescente in situ (FISH)*

Os produtos de PCR referente aos DNAr 18S e 5S foram marcados por *nick translation* com biotina-14-dATP (*Biotin Nick Translation mix*; Invitrogen) e digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation mix*; Roche), seguindo as instruções do fabricante. Os anticorpos avidina-FITC (Sigma-Aldrich), anti-avidina biotina (Sigma-Aldrich) e anti-digoxigenina rhodamine (Roche) foram usados para detecção e amplificação do sinal. Hibridizações fluorescente *in situ* homólogas e heterólogas foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), com alta estrigência (2,5 ng/ $\mu$ l de sonda DNAr 18S e DNAr 5S, 50% formamida, 10% sulfato dextrano, 2XSSC a 37 °C por 18 h). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (2  $\mu$ g/ml), em meio de montagem Vectashield (Vector).

### III.1.3. *Captura e Processamento da imagem*

Os cromossomos hibridizados foram analisados usando o microscópio epifluorescente Olympus BX51. As imagens foram capturas com câmera digital (Olympus DP71), usando o software Image-Pro MC 6.3. As metáfases mitóticas foram editadas no programa Adobe Photoshop CS3 program. Os cromossomos foram medidos no programa de domínio público Image J e classificados de acordo com Levan *et al.* (1964).

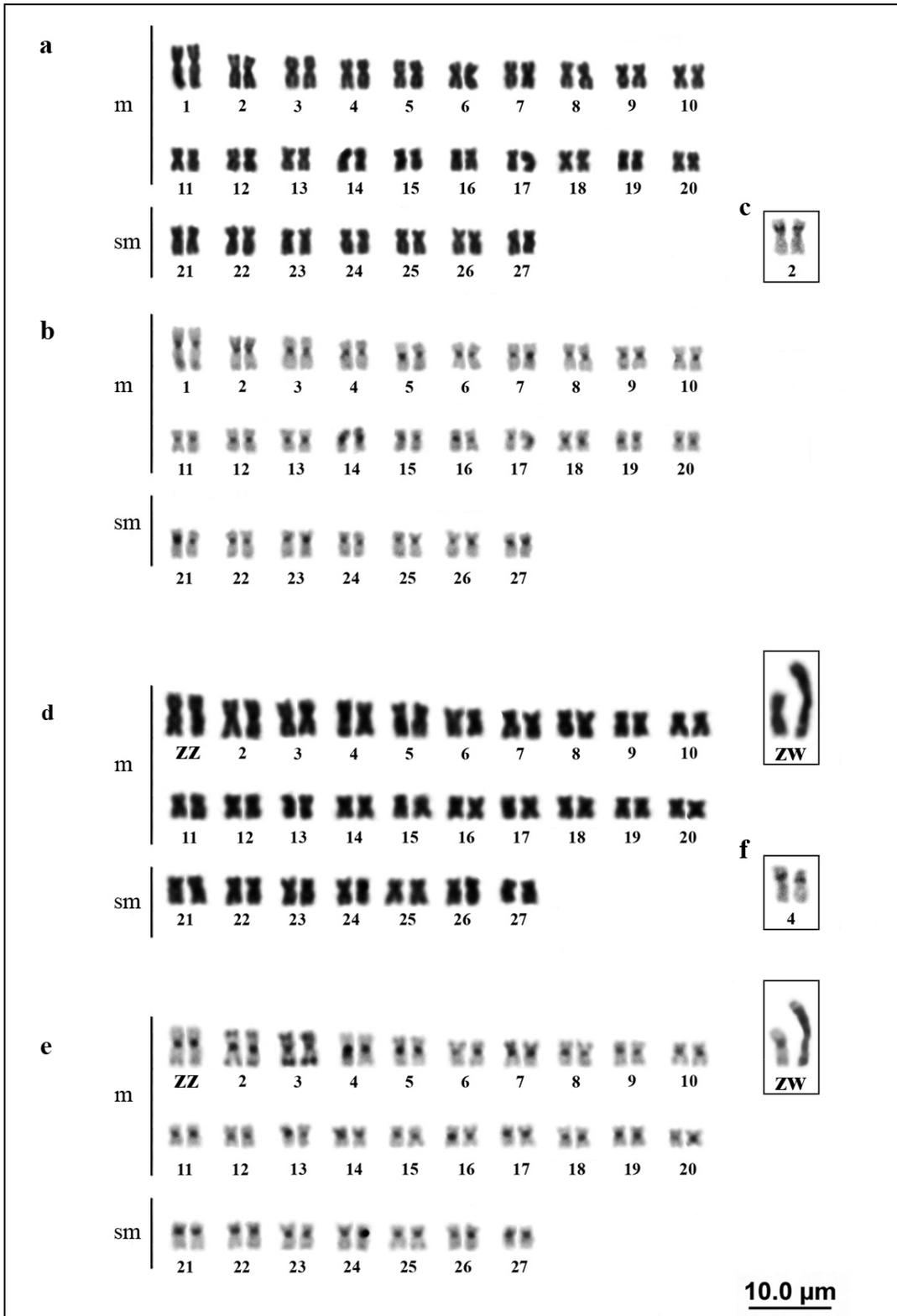
## III.1.4 Resultados

A análise cariotípica de *S. insignis* e *S. taeniurus* revelou um número diploide igual a  $2n=54$  cromossomos (40m + 14 sm), com ausência de polimorfismo cromossômico intraespecífico e presença de cromossomos sexuais diferenciados (ZZ/ZW) somente em *S. taeniurus*. A heterocromatina constitutiva foi detectada na região centromérica da maioria dos cromossomos das duas espécies. Além destas, *S. insignis* apresentou blocos heterocromáticos na região terminal do primeiro par metacêntrico e *S. taeniurus* apresentou grandes marcações biteloméricas nos pares metacêntricos 2 e 3. No cromossomo sexual Z a heterocromatina foi

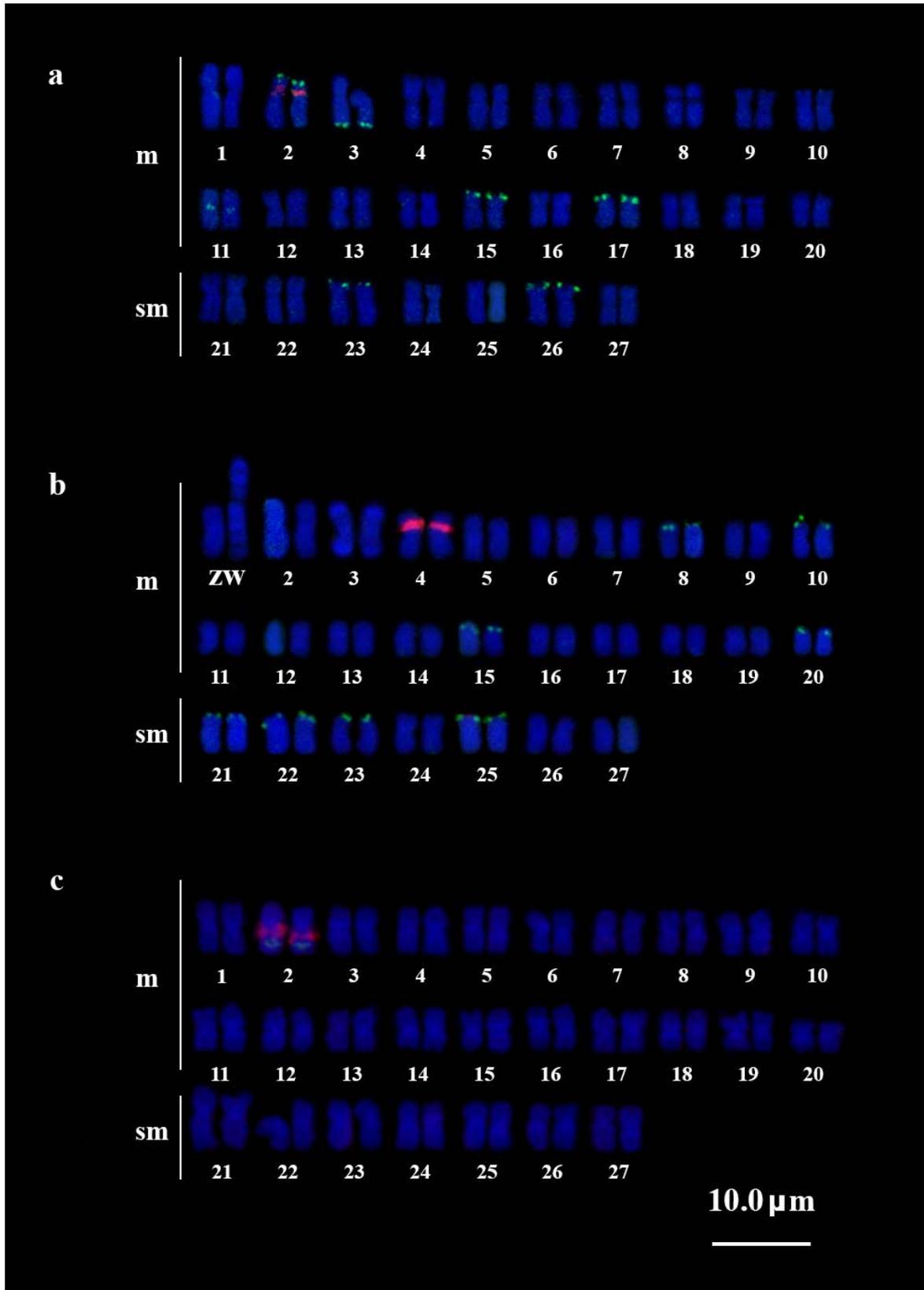
evidenciada somente na região centromérica. Por sua vez, o cromossomo W apresentou um grande bloco heterocromático, que se estende ao longo de ambos os braços cromossômicos. A região organizadora de nucléolo detectada pela prata (Ag-RON) e pela FISH, utilizando sonda de DNAr 18S localizou estes sítios restritos à região intersticial do braço curto do segundo par metacêntrico em *S. insignis* e no braço curto do quarto par metacêntrico em *S. taeniurus* (Figuras 1 e 2, respectivamente).

Em *S. insignis* a FISH com a sonda do DNAr 5S revelou uma grande quantidade de sítios ribossomais. Em cinco pares cromossômicos os sítios DNAr 5S foram localizados na região terminal dos braços curtos (pares 2, 15, 17, 23 e 26), no par 3 o sítio foi localizado na região terminal do braço longo e no par 11 em região intersticial do braço longo. Nesta espécie, o par cromossômico 2 apresentou os sítios de 18S e 5S em sintenia (Figura 2a). *Semaprochilodus taeniurus* apresentou oito pares cromossômicos (pares 8, 10, 15, 20, 21, 22, 23 e 25) portadores de DNAr 5S na região terminal dos braços curtos (Figura 2b).

Para o grupo externo *Prochilodus nigricans* as mesmas sondas DNAr 18S e DNAr 5S foram localizadas sintênicas e adjacentes, na região intersticial dos braços longos do segundo par cromossômico metacêntrico (Figura 2c).

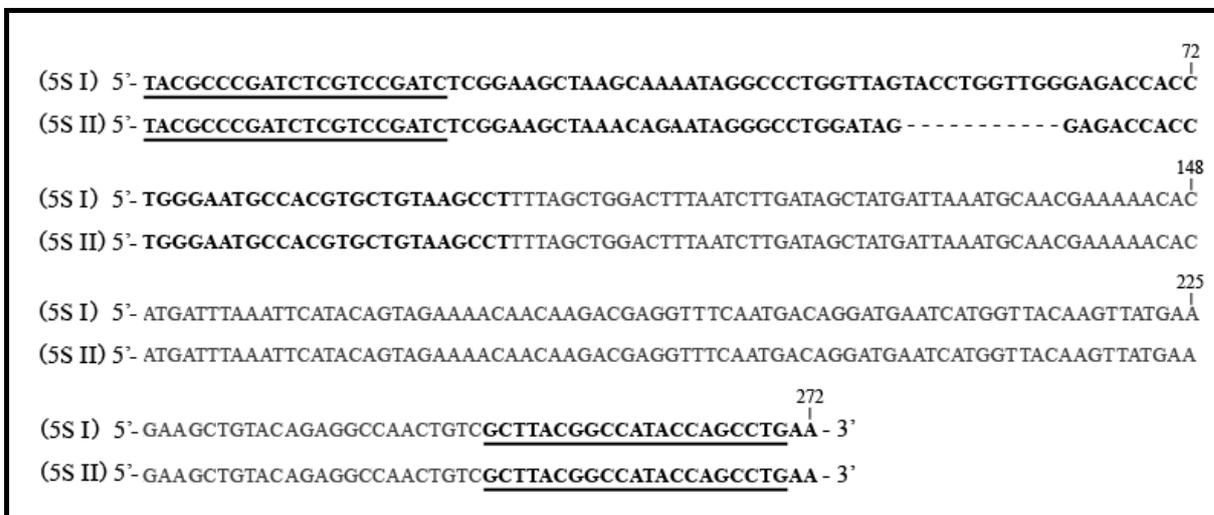


**Figura 1:** Cariótipos de *Semaprochilodus insignis* (a) coloração convencional; (b) bandeamento-C; (c) Ag-RON e *Semaprochilodus taeniurus* (d) coloração convencional; (e) bandeamento-C; (f) Ag-RON. Em destaque: cromossomos sexuais.



**Figura 2:** Cariótipos mostrando os DNAr 18S (sítios vermelhos) e 5S (sítios verdes). (a) *Semaprochilodus insignis*; (b) *Semaprochilodus taeniurus* e (c) *Prochilodus nigricans*.

A amplificação com os *primers* DNAr 5S resultou em fragmentos que foram clonados e sequenciados para as duas espécies de *Semaprochilodus* (número de acesso no GenBank: JQ319031 e JQ319032). As 21 sequências de *S. insignis* e *S. taeniurus* geradas foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados do NCBI e apresentaram alta similaridade com DNAr 5S de *S. insignis* (similaridade= 97%; GQ 403957.1), o que confirma que se trata de monômeros do DNAr 5S. As duas espécies apresentaram sequências de 272 pares de bases, dos quais 120 pb foram referentes à região do transcrito funcional e 152 pb referentes ao espaçador não transcrito (NTS). Um dos clones de *S. taeniurus* (5S II) apresentou a deleção de 11 pares de bases na região funcional do RNAr 5S (Figura 3).



**Figura 3:** Alinhamento da sequência consenso do DNAr 5S de *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus* (5S-I) e uma das sequências que apresentou deleção na parte funcional do gene (5S –II). Em negrito está a região codificante do DNAr 5S, as bases sublinhadas referem-se ao local de anelamento dos primers. Os hífenos indicam as deleções.

### III.1.5 Discussão

Citogeneticamente, os gêneros *Prochilodus* e *Semaprochilodus* apresentam uma macroestrutura cariotípica relativamente estável com  $2n=54$  cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, um par portador do sítio de RON e heterocromatina com distribuição principalmente pericentromérica (Pauls e Bertollo 1990; Oliveira *et al.* 2003; Hatanaka e Galetti Jr 2004). No entanto, alguns marcadores cromossômicos não são compartilhados por todos os representantes da família já estudados, tais como: presença de cromossomos supranumerários em populações de *P. lineatus* (Jesus *et al.* 2003; Artoni *et al.* 2006; Vicari *et al.* 2006) e *P. nigricans* (Venere *et al.* 1999), sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *S. taeniurus* (Feldberg *et al.* 1987) e a sintenia dos DNAr 18S e 5S (Jesus e Moreira-Filho 2003;

Hatanaka e Galetti Jr. 2004; Vicari *et al.* 2006). Ainda, variações populacionais foram relatadas para a presença de cromossomos B em *P. nigricans* da bacia do rio Araguaia (Venere *et al.* 1999) e ausência destes cromossomos na população da bacia amazônica (Pauls e Bertollo 1990; presente estudo) e também para a variação do tamanho do sítio ribossomal maior por duplicações em tandem em *P. lineatus* (Vicari *et al.* 2006).

No gênero *Semaprochilodus*, as duas espécies que ocorrem na Venezuela, *S. kneri* e *S. laticeps*, apresentam cariótipos idênticos em coloração convencional e a região organizadora de nucléolo está presente no braço curto do segundo par cromossômico do complemento (Oliveira *et al.* 2003). As espécies *S. insignis* e *S. taeniurus* encontradas na Amazônia brasileira, diferem das duas anteriores quanto à localização da RON na região intersticial do braço curto do terceiro par de cromossomos do complemento e pela presença de regiões heterocromáticas nos braços curtos de um par submetacêntrico em *S. insignis* e blocos heterocromáticos biteloméricos evidentes em um único par metacêntrico de *S. taeniurus*, ditos serem marcadores específicos por Feldberg *et al.* (1987). Ainda, a presença do sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW somente em *S. taeniurus*, pode ter tido origem em um processo de acúmulo de heterocromatina *in cis* para a diferenciação do cromossomo W e consequente restrição da recombinação a partir do primeiro par cromossômico (Feldberg *et al.* 1987).

Para os indivíduos de *S. insignis* analisados no presente trabalho, o par cromossômico considerado como marcador espécie-específico por Feldberg *et al.* (1987) corresponde ao segundo par cromossômico, que é portador das regiões organizadoras de nucléolo, as quais são positivas para banda C, não sendo encontrada nenhuma evidência de RON no terceiro par do complemento. Para *S. taeniurus* dois pares com heterocromatina bitelomérica foram evidenciados (pares 2 e 3) e a RON está presente no quarto par metacêntrico, contrastando com os dados apontados por Feldberg *et al.* (1987). A hibridização de sondas de DNAr 18S em *Semaprochilodus* reforça estes dados, uma vez que os mesmos foram localizados na região intersticial dos braços curtos do segundo e quarto par cromossômico de *S. insignis* e *S. taeniurus*, respectivamente.

A ocorrência de RON simples corroborada pela FISH é comum aos Prochilodontidae. A hibridização do DNAr 18S em diferentes espécies do gênero *Prochilodus* indica um padrão na localização destes sítios ribossomais restritas aos braços longos do segundo ou quarto par cromossômico na maioria das espécies analisadas (Vicari *et al.* 2006; Grass *et al.* 2007). Muitas vezes o número de cromossomos portadores dos sítios 18S é maior do que o indicado

pelo nitrato de prata, que não evidencia sítios inativos. Em espécimes de *P. argenteus*, a FISH identificou sítios adicionais de DNAr 18S na região telomérica de até 3 cromossomos (Hatanaka e Galetti Jr. 2004), entretanto, em um trabalho anterior Pauls e Bertollo (1990) já haviam identificado um terceiro cromossomo que esporadicamente apresentava RON ativa em outra população de *P. argenteus* e *P. costatus*. A população de *P. lineatus* do rio Mogi Guaçu (São Paulo, Brasil) foi caracterizada por apresentar RON simples, entretanto, a FISH identificou um ou dois sítios adicionais sugerindo um polimorfismo numérico interindividual do DNAr 18S nesta espécie (Jesus e Moreira-Filho 2003). Este primeiro estudo citogenômico envolvendo espécies de *Semaprochilodus* evidenciou que a localização do sítio ribossomal 18S conserva o padrão observado para a maioria das espécies do gênero *Prochilodus*, já que os mesmos foram localizados na região intersticial dos braços curtos do segundo e quarto par cromossômico de *S. insignis* e *S. taeniurus*.

Quanto aos sítios de DNAr 5S, a família Prochilodontidae apresenta um padrão de localização bem característico, sendo que na maioria das espécies desta família um único sítio 5S sempre aparece em sintenia com o sítio ribossomal 18S, geralmente no braço longo de um par metacêntrico grande (Jesus e Moreira-Filho 2003; Hatanaka e Galetti Jr. 2004; Vicari *et al.* 2006). Entretanto, espécimes de *P. argenteus* provenientes do rio São Francisco apresentaram ocasionalmente um terceiro sinal de hibridização correspondendo a um sítio adicional do DNAr 5S (Hatanaka e Galetti Jr. 2004). Esta estabilidade quanto ao número e localização cromossômica do DNA ribossomal 5S observada nos Prochilodontidae, não foi confirmada para *S. insignis* e *S. taeniurus*, os quais apresentaram múltiplos sítios. A hibridização de DNAr 5S em *S. insignis* revelou que esta espécie mantém a sintenia dos genes ribossomais 18S e 5S nos braços curtos do segundo par metacêntrico, entretanto diversos outros sítios foram observados na região terminal e intersticial dos cromossomos. Por sua vez, *S. taeniurus* não apresentou sintenia dos sítios ribossomais e, os sítios 5S evidenciados pela FISH foram localizados na região terminal de oito pares cromossômicos. Segundo Martins and Galletti-Jr (1999) a ausência de sintenia pode ser importante na prevenção de translocações indesejáveis entre os ribossomais 45S e 5S, o que poderia ocorrer facilmente se estes agrupamentos estivessem ligados no mesmo cromossomo. Como alternativa a esta hipótese seletiva, em alguns grupos de peixes observam-se sítios de DNAr maior e menor sintênicos e adjacentes por compartilhar um ancestral comum portador deste caráter. Ainda, é considerado que a sintenia dos sítios ribossomais é um caráter primitivo nos Prochilodontidae (Martins e Galletti-Jr 1999). Nessa via, *S. insignis* apresenta um conjunto de marcadores

cromossômicos possivelmente conservados em relação à *S. taeniurus*, pois além de possuir sítios ribossomais sintênicos, esta espécie não apresenta cromossomos sexuais diferenciados.

A ocorrência de múltiplos sítios de DNAr 5S já foi detectada em algumas espécies de peixes como *Oncorhynchus masou* e *Salvelinus fontinalis* (Fujiwara *et al.* 1998), *Brycon* spp. (Wasko *et al.* 2001) e *Hoplerythinus unitaeniatus* (Diniz e Bertollo 2003), mas até o momento poucas espécies apresentaram tantos sítios de DNAr 5S quanto os que foram verificados nas espécies *S. insignis* e *S. taeniurus*. A existência de múltiplos sítios de DNAr 5S nestas duas espécies não pode ser explicada por falhas no processo de hibridização, uma vez que as sondas foram hibridizadas em condições de alta estringência, além de terem sido efetuadas hibridizações homólogas (sondas de DNA da mesma espécie) e heterólogas (sonda de uma espécie hibridizada em cromossomo de outra), as quais apresentaram os mesmos resultados. Ainda, estas sondas foram hibridizadas em *P. nigricans* e evidenciaram marcação sintênica de DNAr 18S e 5S apenas no segundo par cromossômico (ver figura 2c), confirmando o padrão conservado observado para espécies de *Prochilodus*.

O mapeamento físico cromossômico das sequências de DNAr 5S em diversas espécies de peixes tem evidenciado esses sítios geralmente localizados nos segmentos intersticiais dos cromossomos (revisado por Martins e Wasko 2004; Ferreira *et al.* 2007; Nakayama *et al.* 2008) e esse mesmo padrão também foi observado para mamíferos (Frederiksen *et al.* 1997) e anfíbios (Schmid *et al.* 1987; Lucchini *et al.* 1993). Tal padrão de localização cromossômica intersticial em um único par de cromossomos parece corresponder a uma condição ancestral, a qual tem se mantido na maioria dos grupos. Ainda, acredita-se que esta posição intersticial resultaria em uma proteção destas sequências contra transposições e eventos de permuta (Martins e Galetti Jr. 1999).

O mapeamento físico cromossômico do DNAr 5S de *S. insignis* e *S. taeniurus* evidenciou marcações múltiplas, sendo este um caráter derivado para as espécies do gênero *Semaprochilodus*. O sequenciamento das sondas utilizadas para hibridização indicou que o fragmento refere-se a um monômero de DNAr com 275 pb, porém das 21 sequências analisadas, uma delas apresentou uma deleção de 11 pares de bases na região do transcrito funcional do RNAr 5S, o que sugere que provavelmente alguns sítios indicados pela FISH possam ser referentes a pseudogenes. A origem destes pseudogenes pode ser explicada como uma consequência oriunda de duplicação gênica decorrente de transposição ou duplicação do DNA genômico, que é facilitada pela organização em tandem destes DNAr, pela localização destas sequências na região terminal dos cromossomos e pela associação com elementos

transponíveis (Schweizer e Loidl 1987; Mighell *et al.* 2000; Sumner 2003; Martins e Wasko 2004).

Apesar de muitos trabalhos indicarem que a família Prochilodontidae apresenta uma evolução cariotípica conservada em termos de número e morfologia cromossômica, a aplicação de ferramentas moleculares, utilizando diversos segmentos cromossômicos como sonda tendem a revelar que esta estabilidade não pode ser estendida ao nível genômico, semelhantemente ao que foi encontrado para as espécies analisadas neste estudo. Portanto, uma investigação das famílias de DNA repetitivo e do número de cópias dessas sequências no genoma das espécies *S. insignis* e *S. taeniurus* já está em andamento e acreditamos que poderá contribuir grandemente para a compreensão dos mecanismos básicos evolutivos envolvidos na geração da estrutura do genoma desses organismos, particularmente na mobilização dos sítios ribossomais 5S.

**III.2 – Artigo 2 – Sequências repetitivas: a diversidade oculta da heterocromatina nos peixes prochilodontidae.**



**III.2 Capítulo 2**

---

**Repetitive sequences: the hidden diversity of the heterochromatin in prochilodontidae fish. Enviado para publicação no periódico BMC Genetics em 05/10/2012. Primeira revisão efetuada em 17/12/2012**

### III.2.1 Resumo

A possível origem e diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Semaprochilodus taeniurus*, a única espécie da família Prochilodontidae a apresentar cromossomos sexuais heteromórficos, foi analisado por meio de ferramentas da citogenética clássica (bandeamento-C) e molecular (WCP com sonda W-específica, FISH com sonda telomérica e *Rex1*). A sonda W-específica foi clonada e os fragmentos sequenciados foram identificados por meio da busca nos bancos de sequências do NCBI e GIBI, utilizando as ferramentas BLAST e CENSOR, respectivamente. A heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos autossomos, e nas regiões intersticial, pericentromérica e terminal do cromossomo W, o qual não revelou sítios teloméricos intersticiais após a hibridização fluorescente in situ (FISH) com sonda telomérica. A sonda *Rex1* evidenciou um padrão de distribuição compartimentalizada em alguns cromossomos e mostrou sinais de invasão da região pericentromérica no cromossomo W. A pintura cromossômica (WCP) da sonda W-específica de *S. taeniurus* em seus próprios cromossomos evidenciou marcações em quase todo o cromossomo W, nas regiões centromérica e terminal do cromossomo Z, bem como nos outros cromossomos autossômicos. Entretanto, a WCP cruzada nos cromossomos de *S. insignis*, *Prochilodus lineatus*, e *P. nigricans* não permitiu a identificação do proto-W, mas evidenciou um compartilhamento de DNA repetitivo entre estas espécies. As sequências repetitivas W-específicas sequenciadas mostraram alta similaridade com microssatélites e elementos transponíveis (transposons e retrotransposons) depositados nos bancos públicos de sequências. As diferentes classes de sequências repetitivas identificadas no W sugerem que a degeneração genética neste cromossomo pode ter sido influenciada pela acumulação destes DNAs repetitivos.

### III.2.2 Introdução

Sequências de DNA de múltiplas cópias, também referido como “DNA repetitivo” representam grande parte do genoma dos eucariotos. Estas geralmente são divididas em dois principais grupos: repetições em tandem, que incluem DNA satélites, microssatélites, minissatélites e repetições interespaçadas dispersas, compostas pelos elementos transponíveis (TE) (Timberlake 1978; Charlesworth *et al.* 1994; Jurka *et al.* 2005). Há também famílias gênicas que apresentam repetições de suas sequências, e por isso também podem ser

denominadas como DNA repetitivo, como as codificantes do RNA ribossomal (RNAr) (Long e David 1980). Em peixes, apesar da estrutura e organização desta fração do genoma ainda ser pouco conhecida, admite-se que a maior parte destas sequências repetitivas não codificantes esteja alocada em regiões heterocromáticas (Fischer *et al.* 2004; Martins *et al.* 2011).

Durante muito tempo, sequências repetitivas foram consideradas DNA lixo, DNA egoísta ou DNA parasítico (Doolittle e Sapienza 1980; Orgel e Crick 1980; Nowak 1994) devido à ausência de funcionalidade no genoma. Com o crescente volume de informações, tais sequências tiveram seu papel ampliado na evolução estrutural e funcional do genoma (Shapiro e Vonsternberg 2005; Biémont e Vieira 2006) e envolvimento em rearranjos cromossômicos sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell 2002).

Nos genomas de espécies de Prochilodontidae, regiões heterocromáticas centroméricas foram evidenciadas em todos os 54 cromossomos do complemento de todas as espécies analisadas, bem como nos cromossomos B descritos para *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo 1990; Oliveira *et al.* 2003; Hatanaka e Galetti 2004; Terencio *et al.* 2012a). Porém, *Semaprochilodus insignis* apresenta blocos heterocromáticos adicionais na região terminal do primeiro par metacêntrico, enquanto que *Semaprochilodus taeniurus* apresenta grandes marcações biteloméricas nos pares 2 e 3 metacêntricos. Ainda, esta espécie apresenta um sistema de determinação de sexo do tipo ZZ/ZW, o qual pode ter originado por um processo de acumulação de heterocromatina, a qual diferenciou o cromossomo W com consequente restrição da recombinação no primeiro par cromossômico (Terencio *et al.* 2012a).

Assim, é evidente que as regiões heterocromáticas desempenham um papel importante na diferenciação deste grupo de peixes apesar da macroestrutura cariotípica dos Prochilodontidae ser considerada relativamente estável por muitos autores. Contudo, a composição genética destas regiões é pouco conhecida, restringindo-se apenas a informações sobre presença de grande quantidade de sequências repetitivas de DNA nos cromossomos B de *Prochilodus lineatus* e no cromossomo sexual W de *Semaprochilodus taeniurus*, sendo que para este último as sequências foram identificadas e classificadas como microssatélites, transposons e retrotransposons (Camacho *et al.* 2000; Terencio *et al.* 2012b).

Considerando que as regiões de heterocromatina são fundamentais no processo evolutivo, este trabalho teve como objetivo caracterizar sequências de DNA moderada e altamente repetitivas que compõem os genomas de *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus* através da clonagem e sequenciamento de DNA e identificar as regiões de homologia desta

fração do genoma em três espécies de peixes da família Prochilodontidae (*S. insignis*, *S. taeniurus* e *P. lineatus*) por meio da cross-FISH com sonda *C<sub>o</sub>t-1* DNA.

### III.2.3 Material e métodos

Foram analisados citogeneticamente 10 espécimes de *Semaprochilodus insignis* (6 fêmeas e 4 machos) e 12 de *Semaprochilodus taeniurus* (7 fêmeas e 5 machos), capturados com autorização de coleta (ICMBio SISBIO 10609-1/2007 na região de confluência dos rios Negro/Solimões (AM) e Amazonas/Tapajós (PA). Além disso, também foram analisados 5 espécimes de *Prochilodus lineatus* (2 fêmeas e 3 machos) provenientes do rio Tibagi (PR). Os peixes foram anestesiados com água gelada e mortos. Os espécimes testemunhos foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética Animal (10034, 10037, 10047, 10696). As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais utilizando colchicina *in vivo* (Bertollo *et al.* 1978).

#### III.2.3.1 Isolamento do DNA repetitivo via cinética de ressociação

Amostras enriquecidas de DNA repetitivo de *S. insignis* e *S. taeniurus* foram obtidas por meio da cinética de ressociação (*C<sub>o</sub>t-1* DNA - DNA enriquecido por sequências moderada e altamente repetitivas), de acordo com o protocolo descrito por Zwick *et al.* (1997), e recentemente adaptado por Ferreira e Martins (2008). Amostras de DNA (50 µl de 100-500 ng/µl de DNA em 0,3 M NaCl) foram autoclavadas (121°C) por 5 minutos para obter fragmentos entre 100 a 2000 pares de base. Em seguida as amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos, colocadas no gelo por 10 segundos e subsequentemente aquecidas a 65°C por 1 minuto para reanelamento. Após isso, as amostras foram incubadas a 37°C por 8 minutos com uma unidade da enzima S1 nuclease cuja função é digerir o DNA fita simples. A fração repetitiva destas amostras foi recuperada por congelamento em nitrogênio líquido e posterior extração de DNA, utilizando fenol - clorofórmio. Os fragmentos resultantes foram utilizados como sonda para hibridização fluorescente *in situ*, clonagem e sequenciamento.

#### III.2.3.2 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

As sondas referentes às sequências repetitivas de *S. taeniurus* e *S. insignis*, isoladas por *C<sub>o</sub>t-1* DNA foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e Biotina-16-dUTP (Dig-Nick Translation mix e Biotin-Nick Translation mix; Roche) respectivamente, pela reação de *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante. Os anticorpos anti-digoxigenina rodamina e streptavidina (Life Technologies) foram usados para detectar o sinal. As hibridizações

fluorescentes *in situ* (FISH) foram empregadas em cromossomos mitóticos seguindo o protocolo descrito por (Pinkel *et al.* 1986). Hibridizações homólogas e heterólogas foram realizadas em alta estrigência (2,5 ng/μl de DNA, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano, e 2XSSC a 37°C por 18 h). Os cromossomos foram contra corados com DAPI (2 μg/ml), em meio de montagem Vectashield (Vector).

#### III.2.3.3 Captura e Processamento da imagem

Os cromossomos hibridizados foram analisados em microscópio epifluorescente Olympus BX51 e capturados com câmera digital (Olympus DP71), utilizando o software Image-Pro MC 6.3.

#### III.2.3.3 Clonagem e sequenciamento das sequências repetitivas

Os produtos *C<sub>ot</sub>-I* DNA foram clonados usando o kit de clonagem pMOS Blue Blunt Ended (GE Healthcare), purificados através do kit GFX (GE Healthcare) e sequenciados no ABI 3130 utilizando o kit Big Dye (Applied Biosystems). O alinhamento das sequências foi feito através da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1994), incluída no programa BioEdit 7.0 (Hall 1999). Os clones gerados foram submetidos a um BLASTN para detectar similaridade com sequências de domínio público contidas no bando de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como com o banco de dados do Repbase (Jurka *et al.* 2005) do Instituto de Pesquisa e Informação Genética (Giri) (<http://www.girinst.org/repbase/>) por meio do software CENSOR (Kohany *et al.* 2006).

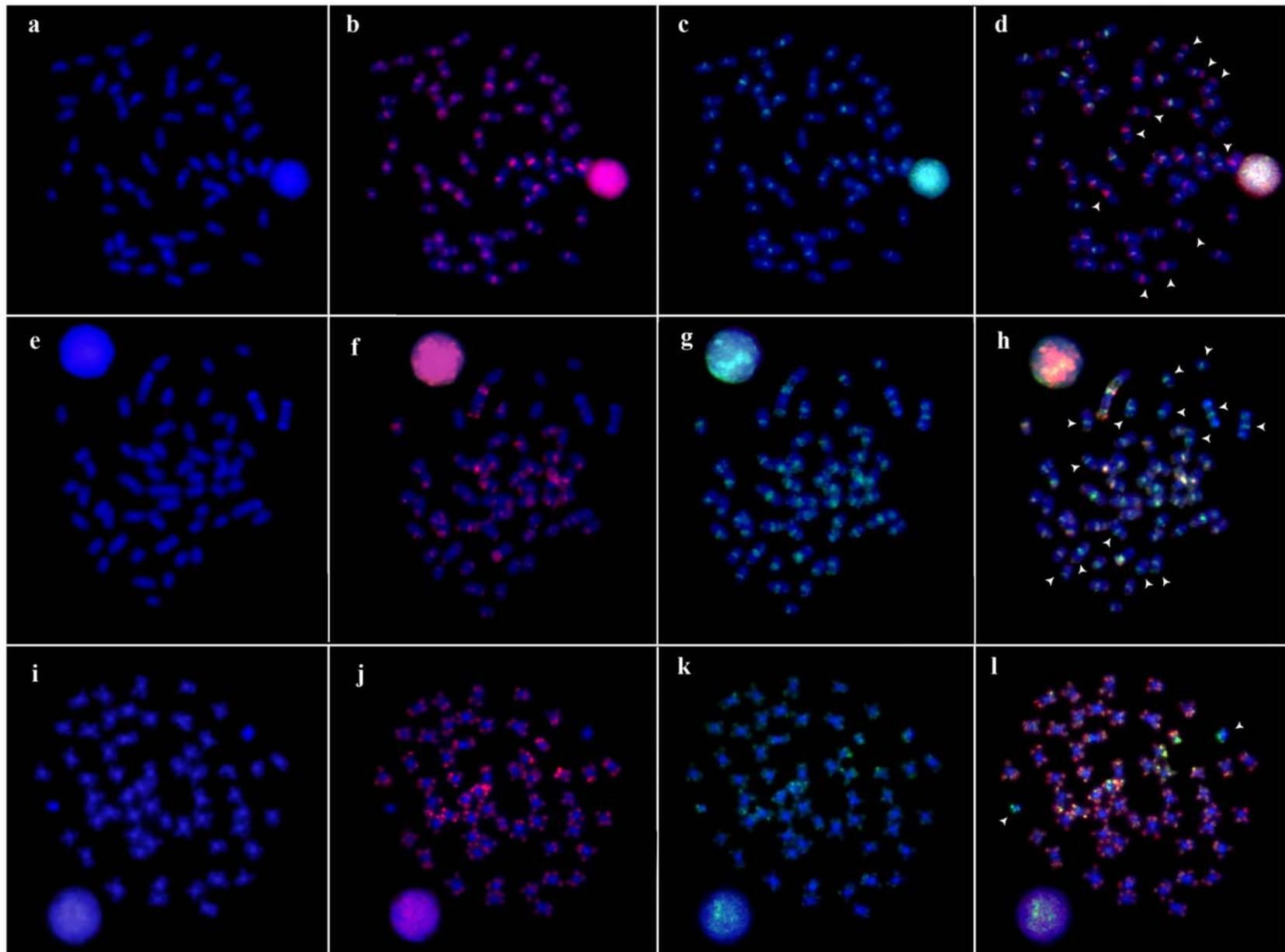
### III.2.4 Resultados

A hibridização da sonda *C<sub>ot</sub>-I* DNA de *S. insignis* em seus próprios cromossomos evidenciou que a fração repetitiva do genoma foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos e na região terminal de vários cromossomos (Figura 1a, b). A hibridização cruzada da sonda *C<sub>ot</sub>-I* DNA de *S. taeniurus* nos cromossomos de *S. insignis* revelou marcações na região centromérica, porém as marcações são menores que as evidenciadas com as sondas homólogas (Figura 1c). Ainda, nenhuma marcação terminal foi evidenciada com a sonda heteróloga em *S. insignis*, o que indica que esta espécie apresenta pares cromossômicos (Figura 1d, cabeças de seta) portadores de sequências repetitivas espécie-específicas, que não são compartilhados por *S. taeniurus* (Figura 1a, b, c, d).

A hibridização da sonda *C<sub>ot</sub>-I* DNA de *S. taeniurus* em seus próprios cromossomos revelou que as sequências repetitivas são abundantes no genoma desta espécie e estão

localizadas em diversas regiões (centroméricas, intersticiais e terminais) de todos os cromossomos do complemento (Figura 1e, 1g). A cross-FISH utilizando a sonda *Cot-1* DNA de *S. insignis* revelou sinais de sintenia em diversas regiões cromossômicas (Figura 1f). *Semaprochilodus taeniurus* também apresentou sítios de DNA repetitivo espécie-específicos localizados na região centromérica e terminal de 14 cromossomos (Figura 1h, setas), não havendo hibridizações nestas porções da sonda *Cot-1* DNA de *S. insignis* (Figura 1e, f, g, h).

Nos cromossomos de *Prochilodus lineatus* tanto a sonda *Cot-1* DNA de *S. insignis* quanto a sonda de *S. taeniurus* apresentaram sinais positivos de hibridização na região terminal de todos os cromossomos do complemento. Os cromossomos supranumerários, ou Bs (Figura 1, setas) só apresentaram sinais de hibridização com a sonda *Cot-1* DNA de *S. taeniurus*. Em um dos Bs foi detectado o mesmo padrão de marcação evidenciado nos cromossomos autossômicos, enquanto que no outro, somente um dos braços cromossômicos apresentou sinais de hibridização (Figura 1 i, j, k, l).



**Figura 1:** FISH da fração repetitiva do genoma de três espécies da família Prochilodontidae. (a) cromossomos de *S. insignis* contracolorados com DAPI. (b) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *S. insignis* hibridizada em seus próprios cromossomos. (c) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *S. taeniurus* hibridizada nos cromossomos de *S. insignis*. (d) *Double-FISH* (e) cromossomos de *S. taeniurus* contracolorados com DAPI. (f) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. insignis* hibridizada nos cromossomos de *S. taeniurus*. (g) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. taeniurus* hibridizada em seus próprios cromossomos. (h) *Double-FISH*. (i) Cromossomos de *P. lineatus* contracolorados com DAPI. (j) Sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. insignis* hibridizada nos cromossomos de *P. lineatus*. (k) sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA do genoma de *S. taeniurus* hibridizada nos cromossomos de *P. lineatus*. (l) *Double-FISH*.

A clonagem e sequenciamento da fração repetitiva do genoma (*C<sub>ot</sub>-1* DNA) de *S. insignis* e *S. taeniurus* permitiram a identificação de 48 fragmentos de tamanhos variados, (GenBank: JX848379 - JX848393) que apresentaram alta similaridade com sequências repetitivas depositadas nos bancos públicos de DNA, classificadas como microssatélites, transposons e retrotransposons. Em *S. insignis* 73% das sequências repetitivas apresentaram alta similaridade com microssatélites, 17% com DNA transposons e 10% com retrotransposons (tabela 1). Em *S. taeniurus* 80% apresentaram alta similaridade com microssatélites, 5% com transposons e 15% com retrotransposons (tabela 2). Ainda, 50 clones referentes a fragmentos gênicos, DNAs repetitivos e pseudogenes também foram identificados, entretanto não foram incluídos neste trabalho nem depositados no banco público de sequências do NCBI por serem inferiores a 200pb. O depósito de sequências inferiores a este número de pares de bases não é permitido.

**Tabela 1:** Homologia nucleotídica dos clones da fração *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *Semaprochilodus insignis* com sequências depositadas no NCBI e GIRI.

clones	Sequências repetitivas	Similaridade	Identidade
Sin1	DNA transposon	EnSpm-3_DR (RepBase/GIRI*)	70%
Sin2	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN756399.1)	92%
Sin3	Microssatélite	<i>Hypostomus gymnorhynchus</i> (GenBank HM545164.1)	83%
Sin4	Non-LTR retrotransposon	HERO-2_DR (RepBase/GIRI*)	78%
Sin5	Microsatellite/Retrotransposon	<i>Colossoma macropomum</i> (HM579956.1) SINE_2 (RepBase/GIRI*)	79%-75%
Sin6	DNA transposon	Mariner/Tc1 (RepBase/GIRI*)	76%
Sin7	DNA transposon	ERV2 Endogenous Retrovirus (RepBase/GIRI*)	77%
Sin8	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN733372.1)	100%
Sin9	Non-LTR retrotransposon	Rex1 (RepBase/GIRI*)	73%
Sin10	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN771242.1)	91%
Sin11	DNA transposon	<i>Labeo rohita</i> Tc1-like (GenBank AY083617.1)	77%
Sin12	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN761177.1)	100%
Sin13	Microssatélite	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (GenBank AJ270780.1)	89%
Sin14	DNA transposon	Helitron-2_DR (RepBase/GIRI*)	83%
Sin15	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN785563.1)	83%
Sin16	Microssatélite	<i>Salmo salar</i> CAG-repeat (GenBank Y11457.1)	87%
Sin17	Microssatélite	<i>Eleutheronema tetradactylum</i> (GenBank AB697177.1)	80%
Sin18	Microssatélite	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (GenBank AY039630.1)	86%
Sin20	Microssatélite	<i>Prochilodus lineatus</i> (GenBank AY285824.1)	84%
Sin21	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN745523.1)	89%
Sin22	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN757227.1)	90%
Sin23	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN737559.1)	92%
Sin38	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN755429.1)	100%
Sin39	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN744936.1)	92%
Sin41	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN746351.1)	95%
Sin42	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN757934.1)	81%
Sin48	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN731077.1)	70%

\* Database Repbase (<http://www.girist.org>)

**Tabela 2:** Homologia nucleotídica dos clones da fração *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *Semaprochilodus taeniurus* com sequências depositadas no NCBI e GIRI.

clones	Sequências repetitivas	similaridade	identidade
Ste1	Microssatélite	<i>Prochilodus mariae</i> (GenBank JF832400.1)	87%
Ste2	Microssatélite	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> (GenBank GU799242.1)	82%
Ste3	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN779618.1)	96%
Ste4	DNA transposon	Tc1_FR2(RepBase/GIRI*)	82%
Ste5	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN756719.1)	87%
Ste6	Microssatélite	<i>Cynoglossus semilaevis</i> (GenBank EU907150.1)	96%
Ste7	Microssatélite	<i>Prochilodus mariae</i> (GenBank JF832400.1)	84%
Ste8	Non-LTR retrotransposon	L2-2_DRe(RepBase/GIRI*)	86%
Ste9	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN21488.1)	96%
Ste10	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN731879.1)	100%
Ste11	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN28181.1)	87%
Ste12	Microssatélite	<i>Prochilodus mariae</i> (GenBank JF 832400.1)	80%
Ste13	Microssatélite	<i>Salmo salar</i> (GenBank AJ402727.1)	100%
Ste14	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN80674.1)	95%
Ste15	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN721488.1)	96%
Ste16	Adeovirus	Bovine Adenovirus type2	99%
Ste17	Non-LTR retrotransposon	SINE3/ 5S (RepBase/GIRI*)	82%
Ste18	Microssatélite	<i>Brycon amazonicus</i> (GenBank JQ993450.1)	89%
Ste19	Microssatélite	<i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN759566.1)	87%
Ste20	Non-LTR retrotransposon	Rex1-9_XT( RepBase/GIRI*)	75%
Ste21	Non-LTR retrotransposon	L2	82%

\* Database Replibase (<http://www.girist.org>)

### III.2.5 Discussão

#### III. 2.5.1 *Diversidade de DNAs repetitivos nos genomas de S. insignis e S. taeniurus*

A grande quantidade de sequências repetitivas é uma característica comum dos genomas eucarióticos os quais apresentam cerca de 2-10% de genes cópia única. A fração repetitiva do genoma pode ser classificada como sequências repetitivas em tandem (DNAs satélites, minisatélites, microsatélites) ou dispersas (elementos transponíveis - ET). Entretanto, alguns ETs podem ser organizados em blocos nos cromossomos (Charlesworth *et al.* 1994, Horvath *et al.* 2001, Martins *et al.* 2011). Dados acumulados de estudos recentes indicam que as sequências repetitivas influenciam de forma significativa na evolução dos genomas, particularmente através do controle da atividade gênica e pelo envolvimento com rearranjos cromossômicos (Valente *et al.* 2011).

Embora algumas sequências repetitivas sejam compartilhadas entre as duas espécies de *Semaprochilodus*, os resultados do sequenciamento dos clones indicaram que diferentes classes de sequências repetitivas compõem os genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus*. A maioria dos clones apresentou alta similaridade com microsatélites encontrados nos genomas de outras espécies de peixes da ordem Characiformes (*Colossoma macropomum*) bem como da família Prochilodontidae (*Prochilodus mariae*). Os microsatélites são abundantes em uma ampla variedade de organismos, sendo sua presença comum tanto nos genomas de procariotos quanto eucariotos. Entre as diversas funções atribuídas a esta classe de sequências repetitivas está sua participação na organização da cromatina, na replicação do DNA e na recombinação e regulação da atividade gênica (Martins *et al.* 2011, Li *et al.* 2002). Em peixes, por exemplo, *Steindachneridion scripta*, *Rineloricaria latirostris* (Vanzela *et al.* 2002) e *Danio rerio* (Shimoda *et al.* 1999) essas repetições são mais abundantes nas regiões centromérica e telomérica dos cromossomos. Estudos futuros envolvendo o mapeamento de sequências microsatélites em cromossomos das espécies da família Prochilodontidae poderão fornecer informações que auxiliem a compreender o papel destas sequências na evolução cromossômica deste grupo de peixes.

Parte dos clones apresentaram alta similaridade com elementos transponíveis (transposons e retrotransposons) (Tabelas 1 e 2) identificados nos genomas de outras espécies de peixes, tais como *Xiphophorus maculatus* (Volf *et al.* 2000; Bohne *et al.* 2012), *Leporinus elongatus* (Marreta *et al.* 2012), *Oryzias hubbsi* (Takehana *et al.* 2012).

Acreditamos que as sequências repetitivas identificadas no presente estudo estão envolvidas no cenário evolutivo dos genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus*. Esta possibilidade é sugerida quando observamos um dos clones (Ste17) identificado no genoma de *S. taeniurus* o qual apresentou 82% de homologia com o retrotransposon *SINE3* o qual, de acordo com Kapitonov e Jurka (2003) originou-se a partir do DNAr 5S. Considerando que as outras espécies da família Prochilodontidae possuem somente um par de cromossomos portadores dos sítios ribossomais, a presença deste *SINE3* reforça a hipótese formulada anteriormente na qual os múltiplos sítios de DNAr 5S observados em *S. insignis* e *S. taeniurus* podem tratar-se de pseudogenes ou sequência repetitiva derivada do DNAr 5S (Terencio *et al.* 2012a). Em *Gymnotus paraguayensis* é sugerido que a multiplicação dos sítios de DNAr 5S possa ter sido causada pelo envolvimento de um elemento transponível, já que a região não transcrita (NTS) apresentou 90% de identidade com o transposon *Tc1-like* (Silva *et al.* 2011).

Em *S. insignis* alguns clones exibiram 83% de similaridade com o elemento transponível *Helitron*. Em milho este ET parecem estar ativos produzindo continuamente elementos não autônomos responsáveis pela inserção e/ou duplicação de segmentos gênicos em novos locais do genoma (Morgante *et al.* 2005). Em peixes, cópias intactas deste elemento foram identificadas na região de determinação de sexo do genoma de *Xiphophorus maculatus* e foi sugerido que estes permanecem ativos no genoma desta espécie, bem como de outras espécies relacionadas, e que devem estar envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais neste grupo de peixes (Zhou *et al.* 2006).

*Tc1/mariner*, identificado nos genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus*, é um dos transposons mais abundante na natureza sendo encontrados nos genomas de fungos, plantas, ciliados e animais, incluindo nematódeos, artrópodes, peixes, anfíbios e humanos. Entretanto, a maioria destes elementos são cópias remanescentes de um transposon ativo que após colonizar os genomas se tornou inativo devido vários eventos de mutação (Plasterk *et al.* 1999, Ivics *et al.* 1996).

O retroelemento *Rex1* também foi detectado na fração repetitiva dos genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus*. A família *Rex* é bem estudada no grupo composto pelos peixes, nos quais diferentes linhagens foram descritas (Volf *et al.* 2000). Em ciclídeos Neotropicais são encontrados dispersos ou distribuídos em *clusters* nos cromossomos das espécies (Mazzuchelli e Martins, 2009; Gross *et al.* 2009; Teixeira *et al.* 2009; Valente *et al.* 2011; Schneider *et al.* 2012a). Em *S. taeniurus* este elemento apresenta distribuição

compartimentalizada em alguns autossomos e claros sinais ao longo de toda a extensão do cromossomo W (Terencio *et al.* 2012b).

O elemento *Line2* foi detectado somente na fração repetitiva do genoma de *S. taeniurus*, entretanto isto não quer dizer que ele não esteja presente no genoma de *S. insignis*, o mesmo pode não ter sido identificado neste estudo, ou alternativamente pode ter sido eliminado do genoma desta espécie. A FISH mostrou que o *Line2* está organizado em pequenos *clusters* dispersos por todos os cromossomos de *Oreochromis niloticus* e apresenta maior concentração próximo à região terminal dos cromossomos (Oliveira *et al.* 1999). Em mamíferos o elemento *Line* é preferencialmente acumulado em regiões ricas em G dos cromossomos e em alguns casos, nos cromossomos sexuais (Wichman *et al.* 1992; Martins *et al.* 2011).

### III. 2.5.2 Organização do DNA repetitivo nos cromossomos de peixes

As sequências repetitivas compreendem a maior fração da porção heterocromática dos genomas e são facilmente identificadas pela técnica da banda-C. Em peixes da família Prochilodontidae esta técnica revelou que esta fração do genoma não é abundante e está localizada principalmente na região centromérica dos cromossomos e menos frequentemente, na região terminal do braço longo de alguns pares cromossômicos (Feldberg *et al.* 1987; Vicari *et al.* 2006; Terencio *et al.* 2012a). Entretanto, grandes blocos heterocromáticos podem ser observados nos cromossomos supranumerários (cromossomos B) de *Prochilodus* spp. (Vicari *et al.* 2006; Voltolin *et al.* 2011) e no cromossomo W de *Semaprochilodus taeniurus* (Feldberg *et al.* 1987; Terencio *et al.* 2012a). Em *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus*, a FISH utilizando sonda espécie-específica da fração repetitiva dos genomas confirmou parcialmente o padrão heterocromático evidenciado pela técnica de banda-C. Os resultados revelaram sinais positivos na região centromérica de todos os cromossomos, entretanto, marcações terminais também foram observadas, confirmando a presença destas sequências nesta região, embora a heterocromatina não seja observada. Estudos indicam que sequências repetitivas localizadas fora da região heterocromática podem influenciar significativamente na evolução dos genomas, particularmente por influenciar a atividade de alguns genes, como por exemplo, os elementos transponíveis que podem adquirir funções regulatórias e/ou funcionais trazendo vantagens para o genoma hospedeiro. Recentemente, o sequenciamento de genomas tem revelado frequentemente cópias curtas e truncadas de sequências repetitivas ao longo da fração eucromática dos genomas de muitos eucariotos (Fischer *et al.* 2002; Biémont e Vieira 2006; Yuan e Wessler 2001; Torres *et al.* 2011). Entretanto, esta observação não

necessariamente indica que estas sequências repetitivas são expressas, pois elas tendem a ser silenciadas e subsequentemente perdidas por deterioração molecular. Em outras palavras, estas sequências se tornam inativas e passam progressivamente a acumular mutações, inserções e deleções até serem completamente perdidas pelo genoma hospedeiro (Fernández-Medina *et al.* 2012). A presença de DNAs repetitivos em regiões eucromáticas foi observada em muitos grupos, tais como insetos (Cabral-de-Mello *et al.* 2011), peixes (Teixeira *et al.* 2009; Valente *et al.* 2011) e lagartos (Pokorná *et al.* 2011).

A hibridização cruzada de *S. insignis* e *S. taeniurus* mostrou padrões similares à hibridização espécie-específica, sugerindo que grande parte do genoma destas espécies tem se mantido conservada ao longo da evolução, podendo apresentar um papel funcional neste processo. Porém, também revelou que estas espécies apresentam sítios centroméricos e terminais espécie-específicos não revelados pela hibridização heteróloga.

Em *Prochilodus lineatus*, a FISH cruzada usando a fração *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *S. insignis* e *S. taeniurus* revelou sinais de hibridização somente na região subterminal de todos os cromossomos. Este padrão de marcação é oposto ao padrão heterocromático revelado pela técnica de banda-C onde os blocos heterocromáticos são observados principalmente na região centromérica dos cromossomos (Pauls e Bertollo 1990; Venere *et al.* 1999; Cavallaro *et al.* 2000; Artoni *et al.* 2006; Vicari *et al.* 2006; Voltolin *et al.* 2011). Estes dados indicam que a fração repetitiva da heterocromatina centromérica de *P. lineatus* é diferente das outras duas espécies (*S. insignis* e *S. taeniurus*) e que as sequências repetitivas compartilhadas estão localizadas na porção subterminal nos cromossomos desta espécie. Este mesmo padrão foi revelado em três espécies de *Prochilodus* utilizando o microsatélite (AATTT)<sub>n</sub> (Hatanaka *et al.* 2002) e sonda W de *S. taeniurus* (Terencio *et al.* 2012b) como sonda.

Uma característica comum às espécies do gênero *Prochilodus* é a presença de cromossomos supranumerários no cariótipo. Diversos estudos envolvendo cromossomos B indicam que eles são ricos em sequências repetitivas e, em certos casos, podem apresentar genes funcionais [Camacho 2005, Ruiz-Estévez *et al.* 2012]. A população de *P. lineatus* analisada no presente estudo revelou de 0-2 cromossomos B que apresentaram padrões distintos de hibridização. A sonda *C<sub>ot</sub>-1* DNA de *S. insignis* não revelou sinais de hibridização em nenhum dos BS, possivelmente porque a fração repetitiva do genoma de *S. insignis* não é compartilhada com os cromossomos B de *P. lineatus*. Uma hipótese que explicaria este fato seria de que estas sequências repetitivas podem ter sofrido uma rápida diferenciação e evolução no genoma de *S. insignis*, ocasionando a perda de homologia com as sequências nos

Bs de *P. lineatus*. Por outro lado, a sonda *C<sub>ot</sub>-1 DNA* de *S. taeniurus* foi positiva, revelando compartilhamento de sequências desta espécie e os cromossomos B de *P. lineatus*. Alguns estudos sugerem que os cromossomos B poderiam influenciar na determinação de sexo em peixes (Noieto *et al.* 2012; Yoshida *et al.* 2011), entretanto, nenhum relacionamento entre a ocorrência de cromossomos B e a determinação sexual tenha sido observada em *P. lineatus*. Recentemente, os cromossomos B desta mesma população de *P. lineatus* demonstraram sinais positivos de hibridização utilizando sonda W-específica de *S. taeniurus*, indicando compartilhamento de sequências repetitivas entre estas duas espécies (Terencio *et al.* 2012b)

O resultado do sequenciamento indicou que diferentes classes de sequências repetitivas compõem os genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus* e que estas, de alguma forma, podem ter papel funcional no processo de evolutivo dos genomas dessas espécies. Ainda, a fração repetitiva dos genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus* exibiram alto grau de similaridade tanto em estrutura quanto localização dos sítios de hibridização. Entretanto, apresentaram baixo grau de similaridade com *P. lineatus*, especialmente no que diz respeito aos cromossomos B, cuja origem ainda não está elucidada. Acreditamos que a análise comparativa incluindo outras espécies da família Prochilodontidae poderá fornecer novos dados acerca da organização dos genomas e evolução neste grupo de peixes.

**III.3 – Artigo 3 – Sequências repetitivas associadas com a diferenciação do cromossomo W em *Semaprochilodus taeniurus*.**



**III.3 Capítulo 3**

---

**Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome evolution in *Semaprochilodus taeniurus*. Genetica Springer. Aceito para publicação em 26/11/2012**

### III.3.1 Resumo

A possível origem e diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Semaprochilodus taeniurus*, a única espécie da família Prochilodontidae a possuir um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, foi investigada por meio de ferramentas da citogenética clássica (bandeamento-C) e molecular (hibridizações cruzada com sonda W-específica, FISH com sonda telomérica e Rex1). Fragmentos W-específicos foram clonados, identificados mediante sequenciamento de DNA e comparados com sequências de DNA disponíveis nos bancos do NCBI e GIRI por meio das ferramentas BLAST e CENSOR, respectivamente. A heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos autossômicos e nas regiões terminal, intersticial e pericentromérica do cromossomo W, o qual não revelou sítios teloméricos intersticiais após a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda telomérica. O Retrotransposon Rex1 revelou um padrão de distribuição compartimentalizado em alguns cromossomos autossômicos e mostrou sinais de hibridização na região centromérica com invasão da região pericentromérica no cromossomo W. A pintura cromossômica da sonda W-específica de *S. taeniurus* em seus próprios cromossomos revelou hibridização completa no cromossomo W, sítios centroméricos e terminais no Z assim como em outros cromossomos autossômicos. A hibridização cruzada desta sonda em *S. insignis*, *Prochilodus lineatus* e *P. nigricans* não revelou o proto-W, mas mostrou sinais positivos de hibridização de DNA repetitivo. A identificação das sequências W-específicas mostrou alta similaridade com microssatélites e elementos transponíveis. As diferentes classes de DNA repetitivo identificadas no cromossomo W de *S. taeniurus* sugerem que a degeneração genética deste cromossomo possa ter ocorrido devido ao acúmulo destes DNA repetitivos.

### III.3.2 Introdução

A família Prochilodontidae é composta por peixes migradores de grande importância comercial, onde a maioria das espécies apresenta ampla distribuição geográfica e são encontradas em todas as bacias hidrográficas da América do Sul (Mago-Léccia 1972). Compreendem 21 espécies agrupadas em três gêneros: *Ichthyoelephas*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus* (Castro e Vari 2004).

Com relação aos aspectos citogenéticos os peixes que compreendem a família Prochilodontidae apresentam número e morfologia cromossômica conservados de  $2n=54$  cromossomos do tipo meta e submetacêntricos, levando muitos autores a considerar esta família como um grupo cariotipicamente estável. Entretanto, esta aparente conservação não é visualizada em nível citogenômico em duas espécies do gênero *Semaprochilodus* (Terencio *et al.* 2012a).

Apesar da maioria das espécies da família Prochilodontidae não apresentar heteromorfismo de cromossomos sexuais, a espécie *Semaprochilodus taeniurus* apresentou um sistema com heterogametia feminina ZZ/ZW (Feldberg *et al.* 1987; Pauls e Bertollo 1990; Oliveira *et al.* 2003; Terencio *et al.* 2012a). O processo de evolução dos cromossomos sexuais tem atraído considerável atenção ao longo dos anos, principalmente no que se refere às forças evolutivas que atuam na restrição ao crossing-over, levando eventualmente à formação de cromossomos heterólogos (Ellegren 2011). Acredita-se que a heterocromatina tem um papel fundamental nessa diferenciação dos proto-sexuais por abrigar grande quantidade de sequências repetitivas, que têm sido propulsoras na diferenciação de cromossomos sexuais em alguns grupos de organismos, inclusive em peixes como *Hoplias malabaricus* (Cioffi e Bertollo 2010), *Characidium* spp. (Machado *et al.* 2011), *Oryzias javinucos* (Takehana *et al.* 2012) e membros da família Parodontidae (Schemberger *et al.* 2011).

Assim, diversas ferramentas citogenômicas vêm sendo empregadas como auxiliares no entendimento da origem e evolução dos sistemas cromossômicos sexuais em diversos grupos de organismos, especialmente peixes. Dentre elas, destaca-se a microdissecção cromossômica, a qual que permite a identificação de sequências sexo-específicas por meio da clonagem e/ou à hibridização cruzada através da pintura de cromossomos inteiros (WCP).

Este trabalho objetivou gerar uma sonda W-específica da espécie *S. taeniurus* e investigar as possíveis origens e diferenciação deste sistema por meio de ferramentas citogenéticas clássicas e moleculares, incluindo a hibridização cruzada da sonda W em três espécies pertencentes à família Prochilodontidae: *S. insignis*, *Prochilodus lineatus* e *P. nigricans*, e o sequenciamento dos clones W-específicos para investigar a composição genômica deste cromossomo.

### III.3.3 Material e Métodos

Espécimes de *Semaprochilodus insignis*, *S. taeniurus*, *Prochilodus nigricans* e *P. lineatus* capturados com autorização do ICMBio SIBBIO (10609-1/2007), foram analisados neste estudo (Tabela 1). Os peixes foram anestesiados em água gelada e mortos. Espécimes testemunho foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética Animal do INPA (10034, 10037, 10047, 10696).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais segundo o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1978). A heterocromatina constitutiva foi evidenciada pela técnica de bandeamento-C (Sumner 1972).

**Tabela 1:** Exemplares e locais de captura das espécies analisadas. (F) fêmeas e (M) machos.

Espécies	Localidade	Material analisado	F	M	Total
<i>S. taeniurus</i>	Rios Negro/Solimões (AM)	Cromossomos/DNA	7	5	12
	Rios Amazonas/Tapajós (PA)				
<i>S. insignis</i>	Rios Negro/Solimões (AM)	Cromossomos	6	4	10
	Rios Amazonas/Tapajós (PA)				
<i>P. nigricans</i>	Rios Negro/Solimões (AM)	Cromossomos	3	1	4
<i>P. lineatus</i>	Rio Tibagi (PR)	Cromossomos	1	3	4

### III.3.3.1 Microdissecção

O cromossomo W de *S. taeniurus* foi microdissectado utilizando um microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com um micro manipulador mecânico (Narishige). Para isso, cinco cromossomos W metafásicos de *S. taeniurus* foram capturados com capilares de vidro com aproximadamente 0,7 µm de diâmetro, transferido para um microtubo e amplificado utilizando o kit de amplificação Genome Plex Single Cell – Whole Genome Amplification WGA4 (Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante.

### III.3.3.2 Clonagem e sequenciamento de sequências W específicas

Os produtos de amplificação do cromossomo W foram clonados usando o kit pMOS Blue Blunt Ended Cloning Kit (GE Healthcare), purificados usando o kit GFX (GE Healthcare) e sequenciados no ABI 3130 usando o kit Big Dye (Applied Biosystems). As sequências geradas foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1994), incluída no programa BioEdit 7.0 (Hall 1999). Os clones gerados foram submetidos a um BLASTN para detectar similaridade com sequências de domínio público contidas no bando de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como com o banco de dados do Repbase (Jurka *et al.* 2005) do Instituto de Pesquisa e Informação Genética (Giri) (<http://www.girinst.org/rebase/>) por meio do software CENSOR (Kohany *et al.* 2006).

### III.3.3.3 Extração de DNA e amplificação do *Rex1* e $(TTAGGG)_n$

O DNA genômico total foi extraído a partir de tecido muscular de *S. taeniurus* seguindo o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook e Russell (2001). O retrotransposon *Rex1* foi amplificado via PCR utilizando os primers RTX1-F1 (5' - TTCTCCAGTGCCTTCAACACC) e RTX1-R1 (5' -TCCCTC AGC AGA AAG AGT CTGCTC) (Volf *et al.* 2000). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 2 µl de DNA genômico (100 ng), 2,5 µl de tampão 10x com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,25 µl of *Taq* DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura. Uma sonda da sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> foi gerada via PCR na ausência de DNA molde, utilizando os iniciadores (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub> (Ijdo *et al.* 1991). As condições de amplificação foram: (a) *Rex1*: 2 minutos a 95°C (desnaturação), 35 ciclos, de 1 minuto a 95°C, 40 segundos a 55°C (anelamento), 2 minutos a 72°C (extensão) e 5 minutos a 72°C (extensão final), e (b) (TTAGGG)<sub>n</sub>: 1 minuto a 95°C, 30segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30segundos a 60°C, 2 minutos a 72°C, e 5 minutos a 72°C.

#### III.3.3.4 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

O produto W- específico de *S. taeniurus* isolado por microdissecção, as sondas *Rex1* e telomérica foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation mix; Roche) pela reação de *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante. O anticorpo anti-digoxigenina rhodamine (Roche) foi usado para detectar o sinal. As hibridizações fluorescentes *in situ* (FISH) foram realizadas seguindo o protocolo para cromossomos metafásicos descritos por Pinkel *et al.* (1986). As hibridizações homólogas e heterólogas foram feitas em alta estrigência (2,5 ng/µl de DNA W- específico, 50% formamida, 10% sulfato dextrano e 2X SSC a 37°C por 18 h). Os cromossomos foram contra corados com DAPI (2 µg/ml), em meio de montagem Vectashield (Vector).

#### III.3.3.5 Captura e processamento da imagem

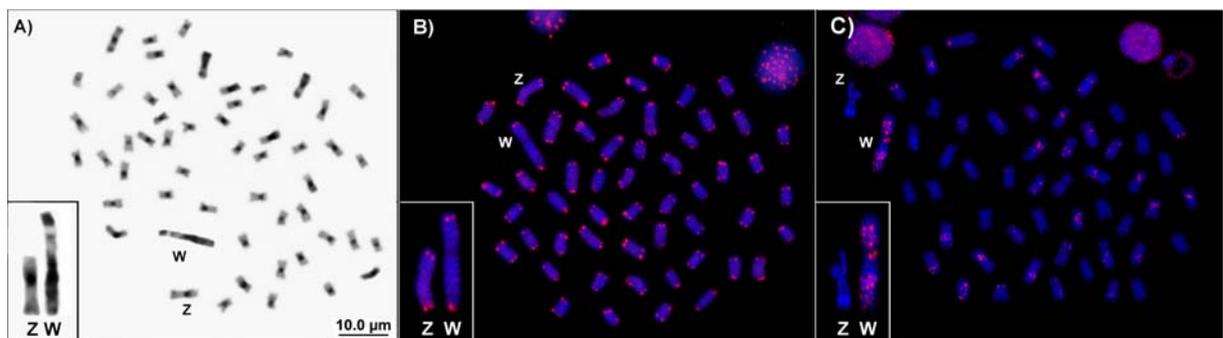
Os cromossomos hibridizados foram analisados em microscópio epifluorescente Olympus BX51 e capturados com câmera digital (Olympus DP71), utilizando o software Image-Pro MC 6.3. As metáfases cromossômicas foram processadas no programa Adobe Photoshop CS3, e os cromossomos foram medidos no programa de domínio público *Image J*.

### III.3.4 Resultados

Em *Semaprochilodus taeniurus* a heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos e nas regiões terminais de quatro cromossomos. No cromossomo Z a heterocromatina também foi localizada na região centromérica e terminal do braço longo, entretanto o W, que é o dobro do tamanho se comparado com o seu homólogo Z nas fêmeas, apresentou grande quantidade de heterocromatina constitutiva tanto nas duas regiões terminais quanto intersticiais e pericentromérica (Figura 1A).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) da sequência repetitiva telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> em *Semaprochilodus taeniurus* evidenciou marcações tipicamente esperadas em ambos os telômeros de todos os cromossomos e sítios teloméricos intersticiais (ITS) não foram encontrados (Figura 1B).

O retrotransposon *Rex1* apresentou padrão de distribuição compartimentalizada nos cromossomos, com sinais de hibridização nas regiões centromérica e terminal de machos e fêmeas. No cromossomo W, sinais positivos foram evidenciados ao longo de sua extensão. No cromossomo Z nenhum sinal de hibridização foi evidenciado (Figura 1C).



**Figura 1:** Cromossomos de *S. taeniurus* após (A) Bandeamento-C; (B) FISH com sonda telomérica; (C) FISH com sonda *Rex1*.

A amplificação do produto genômico referente ao cromossomo W, obtido por meio do kit Genome Plex Single Cell – Whole Genome Amplification (WGA4 - Sigma-Aldrich) gerou um arrasto entre 100-1000 pares de bases na concentração de 1000 ng/μl. A clonagem e sequenciamento do produto W- específico gearam diversos clones que apresentaram alta similaridade com sequências contidas no banco de dados do NCBI. Entretanto, a maioria dos fragmentos é curta (< 200pb) e não foram incluídos neste estudo porque o GenBank não aceita sequências inferiores a 200 bp de comprimento. A análise revelou sequências

repetitivas classificadas como microssatélites, elementos transponíveis e fragmentos gênicos como, por exemplo, o fator de transcrição do gene SOX9 (Tabela 2).

**Tabela 2:** Homologia nucleotídica dos clones W-específicos de *Semaprochilodus taeniurus* com sequências depositadas nos bancos públicos de sequências NCBI e GIRI.

<b>Clones</b>	<b>Número de acesso GenBank</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Identidade</b>
<b>STW4</b>	JX157128	Elemento transponível piggyBac (RepBase/GIRI*)	77%
<b>STW20</b>	JX157129	Microsatélite <i>Megalops atlanticus</i> (GenBank DQ76498.1)	82%
<b>STW21</b>	JX157130	Fator de transcrição SOX9 <i>Takifugu rubripes</i> (AF329945)	93%
<b>STW22</b>	JX157131	Microsatélite <i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN32199.1)	89%
<b>STW23</b>	JX157132	Retrotransposon Rex1-2_XT (RepBase/GIRI*)	70%
<b>STW24</b>	JX157133	Microsatélite <i>Cyprinus carpio</i> (GenBank JN726780.1)	95%

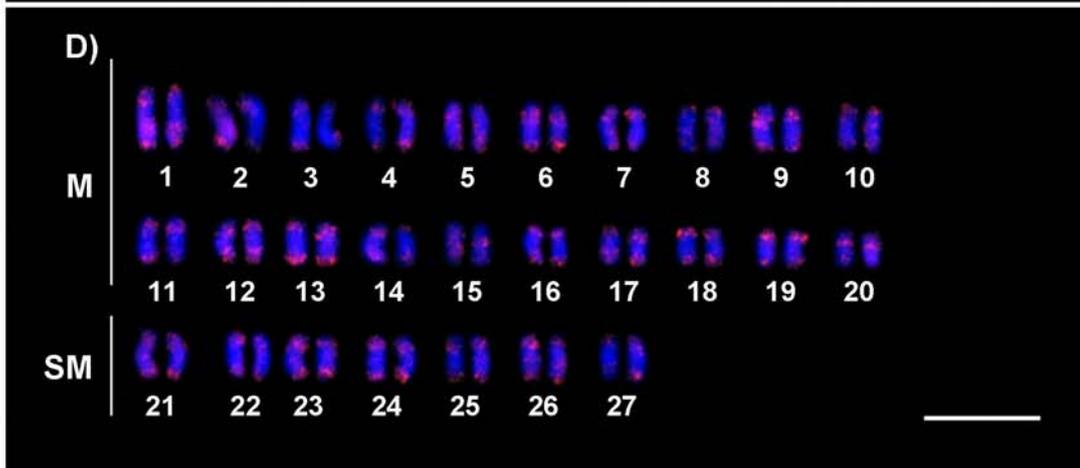
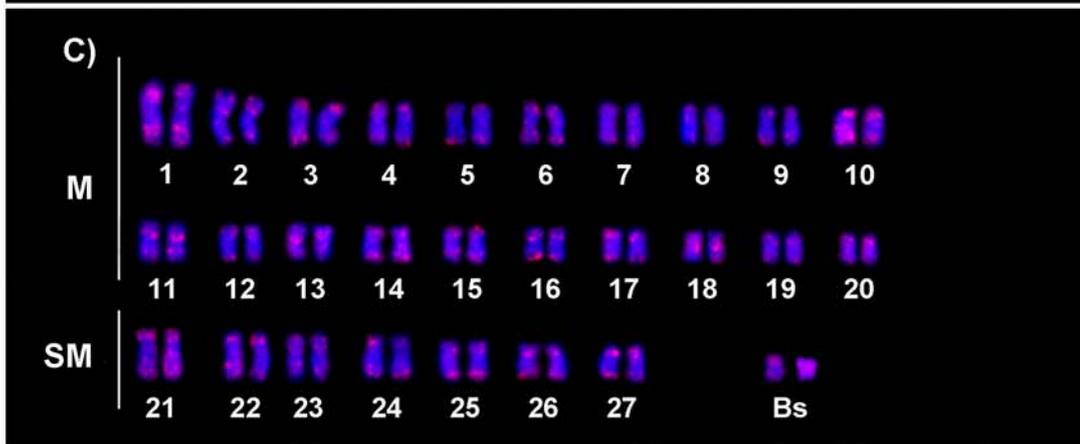
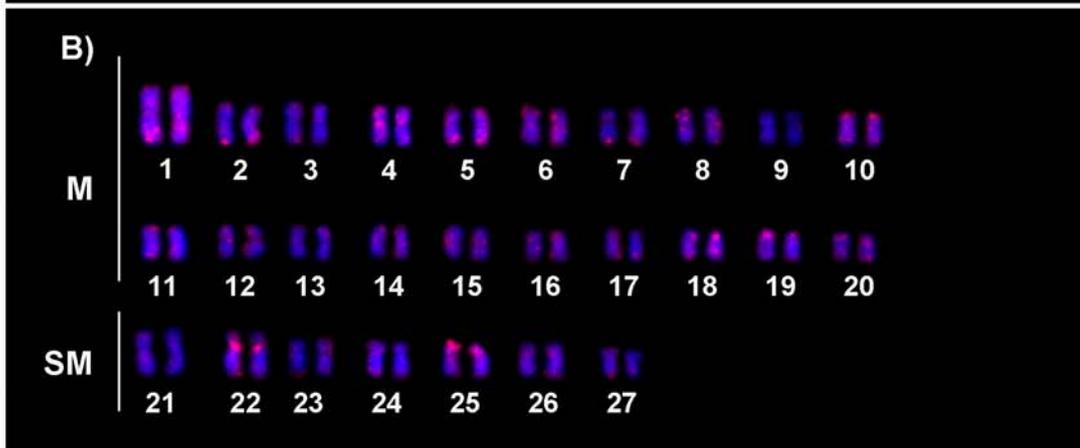
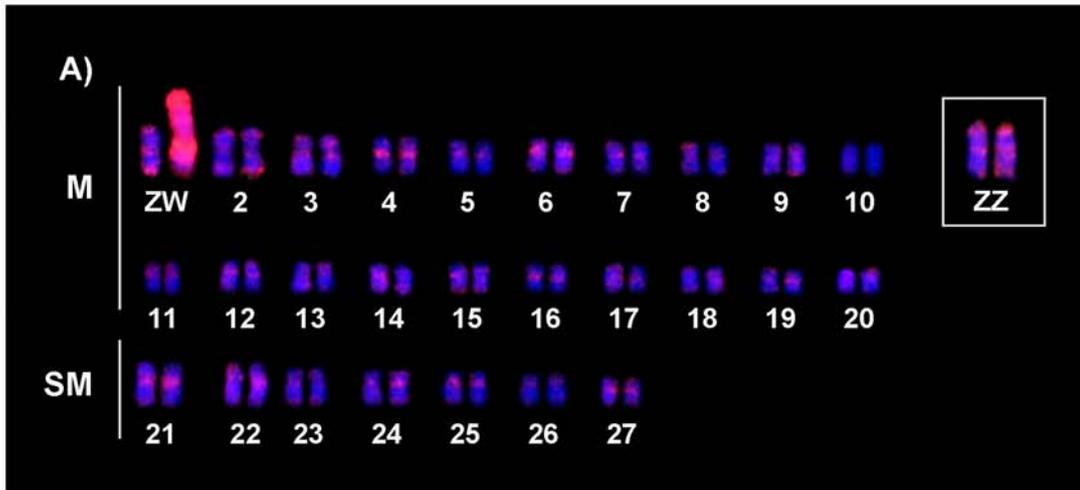
\* Database Repbase (<http://www.girist.org>)

As quatro espécies analisadas apresentaram  $2n=54$  cromossomos organizados em  $40m + 14 sm$  (Figura 2). A WCP com a sonda W-específica em cromossomos metafásicos de *S. taeniurus* revelou sinais positivos na região terminal de alguns pares cromossômicos e na região centromérica de todos os cromossomos autossômicos de machos e fêmeas. O cromossomo sexual Z apresentou grandes marcações positivas nas regiões terminais e centroméricas. O cromossomo W evidenciou sinais positivos em toda sua extensão cromossômica (Figura 2A).

A hibridização cruzada da sonda W-específica de *S. taeniurus* em metáfases de machos e fêmeas de *S. insignis* revelou sinais positivos nas regiões terminais de alguns pares cromossômicos e em toda a extensão do braço curto do par 25. Ao contrário do que foi evidenciado em *S. taeniurus*, sinais positivos nas regiões centroméricas dos cromossomos não foram evidenciados, com exceção dos pares 4 e 22 (Figura 2B).

Em *Prochilodus lineatus* sinais positivos da sonda W-específica de *S. taeniurus* foram visualizados principalmente nas regiões terminais da maioria dos pares cromossômicos. Nos pares cromossômicos 1, 10 e 21 sinais positivos foram evidenciados em quase toda a extensão do braço longo e nos pares 11, 16, 18, 26 e 27 localizaram-se nas regiões centroméricas. Sinais positivos também foram visualizados nos cromossomos B, no primeiro cromossomo os mesmos se concentraram nas regiões terminais e no segundo os sinais revelaram-se dispersos (Figura 2C).

Em *Prochilodus nigricans* sinais positivos da sonda W-específica de *S. taeniurus* foram evidenciados nas regiões terminais da maioria dos pares cromossômicos. Sinais muito evidentes foram encontrados em todos os pares submetacêntricos. Marcações centroméricas foram visualizadas em alguns pares cromossômicos (Figura 2D).



**Figura 2:** Hibridização cruzada da sonda W-específica de *S. taeniurus* em (A) seus próprios cromossomos; (B) *S. insignis*; (C) *Prochilodus lineatus*; (D) *P. nigricans*. Bs = cromossomos B. Bar = 10  $\mu$ m.

### III.3.5 Discussão

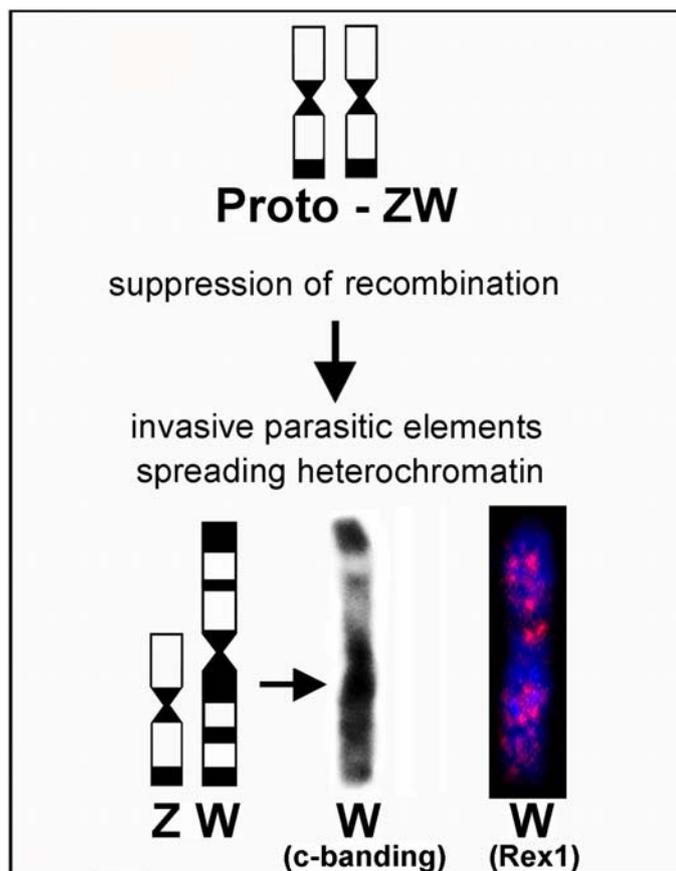
Nas últimas décadas a heterocromatina passou a ser reconhecida como parte fundamental do genoma por desempenhar inúmeras funções relacionadas à segregação cromossômica, organização nuclear e regulação da expressão gênica (Grewal e Jia 2007). Inúmeros trabalhos apontam que esta região contém uma alta densidade de elementos repetitivos, tais como, satélites, microssatélites e elementos transponíveis, concentrados principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos eucarióticos (Skipper 2007). O padrão heterocromático evidenciado na região centromérica dos cromossomos de *S. taeniurus* corroborou os resultados encontrados anteriormente, tanto nos cromossomos autossômicos quanto nos cromossomos sexuais (Terencio *et al.* 2012a). O cromossomo W apresentou um padrão heterocromático distinto do seu homólogo Z, revelando grande quantidade de heterocromatina ao longo de sua extensão cromossômica, característica comum aos organismos que possuem cromossomos sexuais diferenciados (Fig 1A).

Diversas teorias sobre a origem dos cromossomos sexuais têm sido propostas, sendo a degradação parcial ou total do cromossomo sexo-específico (Ohno 1967) e a diferenciação a partir de um par autossômico (Muller 1964) as mais aceitas em muitos grupos distintos de organismos.

A diferenciação dos pares autossômicos pode ocorrer por dois mecanismos principais. O primeiro sugere o envolvimento de rearranjos cromossômicos com consequente heteromorfismo (Charlesworth *et al.* 2005). Em peixes da família Parodontidae um evento de inversão reorganizou os DNAs repetitivos terminais para a região proximal dos cromossomos proto-sexuais e estes sítios por sua vez, foram amplificados nos braços curtos cromossômicos, levando à diferenciação do cromossomo W (Schemberger *et al.* 2011). No presente estudo, nenhuma marcação intersticial com sonda telomérica foi evidenciada em *S. taeniurus*, que pudesse corroborar rearranjos de fusão e/ou inversão cromossômica na origem do cromossomo W, o qual apresenta o dobro de tamanho quando comparado com o Z. Entretanto, cromossomos originados a partir de rearranjos podem ter os sítios intersticiais

perdidos durante os processos de erosão molecular (Carvalho *et al.* 2012). O fato de todas as espécies da família Prochilodontidae apresentarem o mesmo número cromossômico e fórmula cariotípica também sugere a ausência de rearranjos cromossômicos na origem do cromossomo W.

O segundo mecanismo proposto para a diferenciação de pares autossômicos em sexuais pressupõe a redução gradual da frequência de recombinação (Brooks 1988). Alguns trabalhos mostram que a recombinação é fortemente reduzida quando há inserção de retrotransposons no genoma, já que regiões eucromáticas passam a ser remodeladas em heterocromáticas para evitar a amplificação destes elementos (Steinemann e Steinemann 2005). É possível que em *S. taeniurus* a supressão da recombinação entre os cromossomos proto-sexuais tenha propiciado o acúmulo de heterocromatina no cromossomo W como estratégia de defesa contra elementos invasivos, os quais são muito frequentes em regiões genômicas não recombinantes (Dasilva *et al.* 2002; Steinemann and Steinemann 2005; Caputo *et al.* 2011) (Figure 3). Desta forma, acreditamos que o cromossomo W tenha aumentando significativamente o seu tamanho devido o acúmulo de DNA repetitivo, dentre eles o retroelemento Rex1, causando a degradação gradual da atividade gênica, tendo como consequência a diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Esta hipótese tem fundamento uma vez que os fragmentos W-específicos evidenciaram alta similaridade com sequências repetitivas classificadas como microsatélites, transposons e retrotransposons (Tabela 2). Dados gerados em estudos anteriores indicam que estas sequências tiveram influência significativa na evolução de genomas, particularmente no controle de atividade gênica (Valente *et al.* 2011). Os transposons e retrotransposons já foram identificados nos cromossomos sexuais de muitas espécies de peixes como em *Xiphophorus maculatus* (Volf *et al.* 2000; Bohne *et al.* 2012), *Leporinus elongatus* (Marreta *et al.* 2012), *Oryzias hubbsi* (Takehana *et al.* 2012), e *Semaprochilodus taeniurus* no presente estudo. Um dos fragmentos W específicos mostrou alta similaridade com a uma região parcial do fator de transcrição do gene SOX9 de *Takifugu rubripes*. O SOX9 é um gene relacionado à determinação do sexo em muitos organismos.



**Figura 3:** Provável origem do cromossomo W em *Semaprochilodus taeniurus*.

A sonda W-específica hibridizou em regiões heterocromáticas nos pares autossômicos de *S. taeniurus*, sugerindo que estes cromossomos compartilham outras sequências repetitivas como, por exemplo, o retroelemento Rex1 mapeado neste estudo. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que sinais homeólogos ao W foram evidentes nas regiões subterminais dos cromossomos das demais espécies analisadas e estes domínios subtelo méricos representam regiões satélites dinâmicas com alta taxa evolutiva (Torres *et al.* 2011).

Além de a pintura cromossômica comparativa indicar a presença de DNAs repetitivos no cromossomo sexual W de *S. taeniurus* que são compartilhados entre *S. insignis*, *P. lineatus* e *P. nigricans* revelou também a existência de DNA repetitivo centromérico em *S. taeniurus*, que não foi compartilhado com as demais espécies estudadas, possivelmente tratando-se de um DNA repetitivo espécie-específico. A divergência de sequência entre diferentes espécies provavelmente ocorre por mecanismos de evolução em concerto (Arnheim 1983; Canapa *et al.* 2002; Grewal e Jia 2007; Vicari *et al.* 2010), o que justifica *S. taeniurus* apresentar marcações na maioria dos centrômeros e as outras espécies não.

Em *S. insignis*, *P. lineatus* e *P. nigricans* os sinais W-específicos foram evidenciados principalmente nas regiões cromossômicas terminais, não coincidentes com as regiões heterocromáticas reveladas pelo bandeamento C. Nestas espécies os blocos heterocromáticos estão localizados principalmente nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos (Venere *et al.* 1999; Vicari *et al.* 2006; Artoni *et al.* 2006; Terencio *et al.* 2012a).

A presença de elementos repetitivos, principalmente os microssatélites, é muito comum nas adjacências dos telômeros dos cromossomos de peixes e indicam que estas sequências repetitivas de DNA devem ter um papel importante na evolução dos genomas (Gross *et al.* 2010a; Jurka *et al.* 2011; Oliver e Greene 2011). Provavelmente, os sinais W-específicos positivos revelados nas regiões cromossômicas terminais das espécies *S. insignis*, *P. lineatus* e *P. nigricans* possam representar satélites e/ou microssatélites específicos desta região. Este mesmo padrão de marcação telomérica foi verificado em três espécies do gênero *Prochilodus* submetidos ao mapeamento cromossômico com a sonda do microssatélite (AATTT)<sub>n</sub> (Hatanaka *et al.* 2002).

Os cromossomos B detectados em *P. lineatus* evidenciaram sinais positivos da sonda W-específica indicando a ocorrência de famílias de DNAs repetitivos. Jesus *et al.* (2003) isolaram e caracterizaram duas famílias de DNA satélite (SATH 1 and SATH2) presentes no genoma de *P. lineatus*. Entretanto, somente SATH2 apresentou sinais de hibridização nos cromossomos B. A presença de DNAs repetitivos da sonda W que detém localização terminal em *P. lineatus* e também são visualizados nos cromossomos B indica que outras classes de DNAs repetitivos diferentes da família SATH podem ocorrer nestes cromossomos. Ainda, alguns estudos sugerem que os cromossomos B podem influenciar na origem dos sistemas de determinação de sexo em peixes, entretanto isto não foi verificado em *P. lineatus* (Yoshida *et al.* 2011; Noleto *et al.* 2012).

Assim, a pintura cromossômica da sonda W-específica possibilitou a identificação do cromossomo Z em *S. taeniurus*, mas não a identificação de proto-W em *S. insignis*, *P. lineatus* e *P. nigricans*. Sendo o gênero *Semaprochilodus* um grupo derivado na família Prochilodontidae, acreditamos que o sistema de cromossomos sexuais presentes em *S. taeniurus* deve ter surgido recentemente nesta espécie, uma vez que nenhum proto-W pode ser identificado na hibridização cruzada entre as espécies analisadas.

**III.4 – Artigo 4 – Dinâmica evolutiva do DNA repetitivo e cromossomos sexuais: *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) como modelo.**



**III.4 Capítulo 4**

---

**Dinâmica evolutiva do DNA repetitivo e cromossomos sexuais: *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) como modelo. Enviado para publicação no periódico Sexual Development em 19/11/2012. Primeira revisão efetuada em 19/12/2012.**

### III.4.1 Resumo

Em geral, os genomas dos peixes são compostos, em sua maioria por múltiplas famílias de sequências repetitivas em tandem que devido à sua elevada abundância e rápida mudança evolutiva são consideradas componentes determinantes nos processos de especiação. Estudos anteriores revelaram que a fração repetitiva dos genomas de *S. taeniurus* e *S. insignis* apresenta grande quantidade de sequências repetitivas, incluindo transposons e retrotransposons. Estas informações se tornam importantes uma vez que de todas as espécies que compreendem a família Prochilodontidae somente *S. taeniurus* apresenta um sistema de cromossomos sexuais (ZW), que se acredita ter evoluído como consequência da ação de sequências repetitivas. Desta forma, neste trabalho nós apresentamos um extensivo mapeamento físico cromossômico de sequências repetitivas (microssatélites e elementos transponíveis), visando comparar a posição, abundância e contribuição destas sequências na dinâmica evolutiva dos genomas de *S. taeniurus* e *S. insignis*. Os resultados revelados pela FISH indicaram que as sequências repetitivas são mais abundantes no genoma de *S. taeniurus* e também ocorrem em regiões eucromáticas no genoma das duas espécies, indicando que algumas destas sequências possivelmente desempenhem algum papel funcional no genoma. Além disso, grandes clusters de sequências repetitivas conhecidas foram evidenciados nos cromossomos sexuais Z e W de *S. taeniurus*. Esta informação se faz importante uma vez que o acúmulo de sequências repetitivas nas regiões ricas em genes poderia refletir na diferenciação entre os proto-sexuais, evoluindo no par heteromórfico ZW observado em *S. taeniurus*.

### III.4.2 Introdução

O conhecimento adquirido acerca dos peixes teleósteos em diversas linhas de pesquisa tem revelado várias características peculiares a respeito da evolução e especiação neste grupo (Pokorná *et al.* 2011; Schemberger *et al.* 2011; Takehana *et al.* 2012; Gontan *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2012a). Em geral os genomas eucarióticos, entre eles os dos peixes, são compostos em sua maioria por múltiplas famílias de sequências repetitivas em tandem (microssatélites, minisatélites e DNAr) e dispersas (elementos transponíveis), as quais são consideradas componentes determinantes nos processos de especiação devido a sua elevada abundância e rápida mudança evolutiva (Fischer *et al.* 2004; Volff 2005). Um exemplo disso são os DNAs satélites que estão organizados em blocos de milhares de cópias no genoma, ocorrendo principalmente nas regiões centromérica e telomérica dos cromossomos, indicando que desempenham um papel importante na estrutura, estabilidade e segregação cromossômica (Ferree e Prasad 2012). Os elementos móveis ou transponíveis são considerados os propulsores da evolução dos genomas em diversos grupos, isto porque ao contrário das

sequências satélites que costumam ser mais abundantes nas regiões heterocromáticas, apresentam padrão de distribuição mais uniforme, ocorrendo frequentemente em regiões eucromáticas (Eickbush e Furano 2002). Em peixes Neotropicais foram identificadas todas as classes conhecidas destes elementos e acredita-se que são responsáveis por inúmeros rearranjos cromossômicos, como observado nos gêneros *Gymnotus* (Silva *et al.* 2011), *Cichla* (Valente *et al.* 2011) e *Symphysodon* (Gross *et al.* 2010a). Deste modo, os DNAs repetitivos têm sido amplamente aplicados como marcadores físicos cromossômicos em estudos comparativos para localização de rearranjos cromossômicos, identificação e caracterização de cromossomos sexuais e análises de evolução cromossômica em peixes Neotropicais (Gross *et al.* 2010a; Schemberger *et al.* 2011; Machado *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2012a; Terencio *et al.* 2012a; 2012b; 2012c).

O gênero *Semaprochilodus* é composto por seis espécies de peixes (*S. brama*, *S. insignis*, *S. kneri*, *S. laticeps*, *S. taeniurus* e *S. varii*) endêmicas da bacia amazônica e são muito importantes no comércio pesqueiro amazônico (Castro e Vari 2003). Análises moleculares e citogenômicas (Passos *et al.* 2010; Terencio *et al.* 2012a; 2012b; 2012c) revelaram que a fração repetitiva dos genomas de *S. taeniurus* e *S. insignis* apresenta grande diversidade de tipos de sequências repetitivas, tais como transposons e retrotransposons. Estas informações se tornam importantes uma vez que de todas as espécies que compreendem a família Prochilodontidae somente *S. taeniurus* apresenta um sistema de cromossomos sexuais (ZW) que se acredita ter evoluído como consequência da ação de sequências repetitivas, uma vez que a clonagem e sequenciamento do cromossomo W indicaram a presença de vários elementos móveis que se encontram ativos no genoma de outras espécies de peixes (Terencio *et al.* 2012c).

Desta forma, neste trabalho nós apresentamos um extensivo mapeamento físico cromossômico de sequências repetitivas, tais como microssatélites e elementos transponíveis identificados anteriormente (Passos *et al.* 2010; Terencio *et al.* 2012b; 2012c) com o objetivo de comparar a posição e abundância das diferentes classes destas sequências nos genomas de *S. taeniurus* e *S. insignis* (a qual não apresenta um sistema cromossômico de determinação sexual) e contribuir para a compreensão da dinâmica evolutiva dos genomas destas espécies. Além disso, discutimos sobre a influência destas sequências na evolução do sistema de determinação de sexo (ZW) em *S. taeniurus*, uma vez que estas parecem estar associadas com a diferenciação do par sexual nesta espécie.

### III.4.3 Material e Métodos

Dez espécimes de *Semaprochilodus insignis* (6 fêmeas e 4 machos) e doze de *Semaprochilodus taeniurus* (7 fêmeas e 5 machos), capturados com autorização do ICMBio SISBIO (10609-1/2007) na região de confluência entre os rios Negro/Solimões (AM) e Amazonas/Tapajós (PA), foram analisados. Os peixes foram anestesiados com água gelada e mortos. Espécimes testemunhos foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética Animal (10034, 10037, 10047 e 10696). As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais utilizando o tratamento de colchicina *in vivo* seguindo o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1978). A heterocromatina foi evidenciada por meio da técnica de bandeamento-C descrita por Sumner (1972).

#### III.4.3.1 Sequências repetitivas

Seis microssatélites, quatro dinucleotídeos e dois imperfeitos, isolados do genoma de *S. insignis* (Passos *et al.* 2010) e cinco elementos móveis sequenciados e identificados anteriormente nos genomas de *S. taeniurus* e *S. insignis* foram mapeados por meio da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) em metáfases cromossômicas de *S. insignis* e *S. taeniurus* (Table 1). O retroelemento Rex3 foi recuperado via PCR utilizando os primer RTX3-F3 5'CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG e RTX3-R3 5'TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volff *et al.* 1999).

**Tabela 1:** Sequências repetitivas hibridizadas nos cromossomos de *S. insignis* e *taeniurus*.

Clone	Classe de sequência	Motivo de repetição	GenBank
SinH05	Microsatellite	(CA) <sub>22</sub>	HM147858
SinC01	Microsatellite	(GA) <sub>20</sub>	HM147844
SinG08	Microsatellite	(GT) <sub>17</sub>	HM147856
SinC08	Microsatellite	(CT) <sub>26</sub>	HM147847
SinG09	Microsatellite	(CT) <sub>14</sub> GT(CT) <sub>5</sub> (CG) <sub>2</sub> (CT) <sub>9</sub>	HM147857
SinG02	Microsatellite	(CT) <sub>9</sub> CA(GT) <sub>7</sub> CG(GT) <sub>19</sub>	HM147855
Sin07	DNA transposon	ERV2	JX848381
Ste4	DNA transposon	Tc1_FR2	*
Ste21	Non-LTR Retrotransposon	L2_2	*
Ste20	Non-LTR Retrotransposon	Rex1-9_XT	*
-	Non-LTR Retrotransposon	Rex_3	

\*Terencio *et al.* (2012c)

#### III.4.3.2 *Hibridização Fluorescente in situ (FISH)*

As sondas repetitivas de *S. taeniurus* e *S. insignis* foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e Biotina-16-dUTP (Dig-Nick Translation mix; Roche) por meio da reação de *nick-translation* seguindo as instruções do fabricante. Os anticorpos anti-digoxigenina rodamina e streptavidina (Life Technologies) foram utilizados para detectar o sinal. As hibridizações foram empregadas em cromossomos metafásicos seguindo o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986). Hibridizações homólogas e heterólogas foram realizadas em alta estringência (2,5 ng/ $\mu$ l de DNA, formamida 50%, sulfato dextrano 10% e 2XSSC a 37°C por 18 h). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (2  $\mu$ g/ml) e as lâminas montadas com Vectashield (Vector).

#### III.4.3.3 *Microscopia/Processamento da imagem*

As lâminas foram analisadas no microscópio epifluorescente Olympus BX51 e as melhores metáfases foram capturadas com câmera digital (Olympus DP71), utilizando o software Image-Pro MC 6.3.

### III.4.4 Resultados

#### III.4.4.1 *Hibridização de sequências repetitivas de DNA em S. taeniurus*

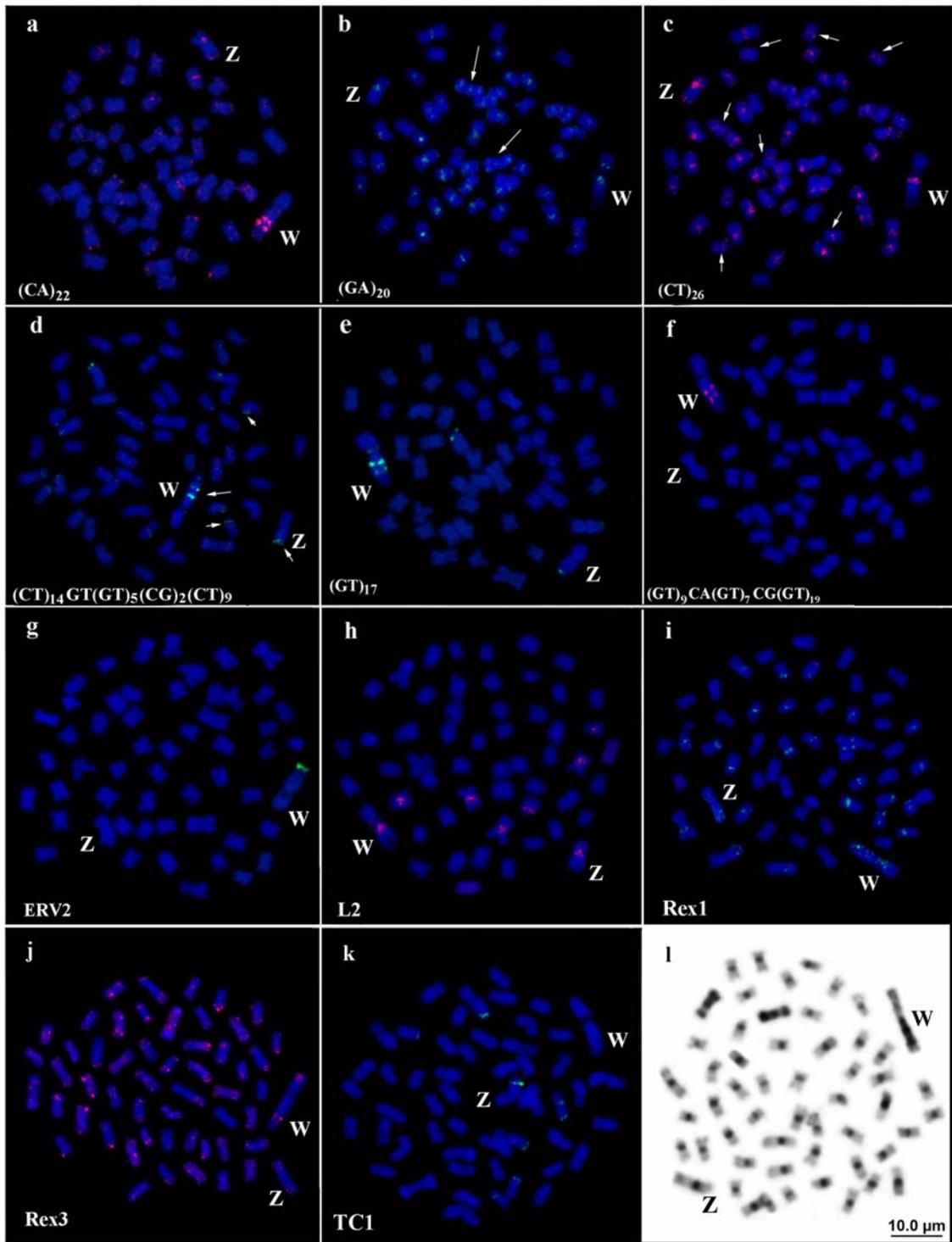
Os resultados revelados pela FISH em metáfases de *S. taeniurus* indicaram sinais positivos de hibridização de todas as sequências repetitivas testadas, entretanto estes sítios apresentaram variação quanto a localização cromossômica (Figura 1).

O microssatélite (CA)<sub>22</sub> foi evidenciado preferencialmente em regiões terminais de vários cromossomos, na região centromérica e telomérica do cromossomo Z, bem como intersticialmente no braço longo do cromossomo W (Figura 1a). O microssatélite (GA)<sub>20</sub> está presente nas regiões centroméricas e/ou intersticiais da maioria dos cromossomos autossômicos, sendo que um par de homólogos apresentou marcações biteloméricas. No cromossomo W foram evidenciadas marcações na região pericentromérica de ambos os braços (Figura 1b). O marcador microssatélite (CT)<sub>26</sub> hibridizou em regiões centroméricas, intersticiais e/ou teloméricas na maioria dos cromossomos, incluindo os cromossomos sexuais (Figura 1c). Marcações conspícuas de hibridização do microssatélite (CT)<sub>14</sub>GT(GT)<sub>5</sub>(CG)<sub>2</sub>(CT)<sub>9</sub> foram evidenciadas no braço longo do cromossomo W e na região telomérica do cromossomo Z. Ainda, sinais brandos desse microssatélite foram evidenciados em marcações terminais e centroméricas de vários cromossomos (Figura 1d). O microssatélite

(GT)<sub>17</sub> foi evidenciado nas regiões centromérica e intersticial do braço longo do cromossomo W, além da região terminal do Z e de um autossomo (Figura 1e). O microssatélite (GT)<sub>9</sub>CA(GT)<sub>7</sub>CG(GT)<sub>19</sub> foi localizado somente na região intersticial do braço longo do cromossomo W (Figura f).

A sequência repetitiva classificada como *Retrovirus endógeno* (ERV2) evidenciou sinais de hibridização somente na região terminal do braço longo do cromossomo W (Figura 1g). O retrotransposon L2 apresentou sinais positivos de hibridização na região centromérica de alguns cromossomos, inclusive nos cromossomos sexuais Z e W (Figura 1h). O retroelemento Rex 1 mostrou-se compartimentalizado na região centromérica ou intersticial de alguns pares de cromossomos, entretanto sua localização foi dispersa nos cromossomos sexuais (Figura 1i). O retroelemento Rex3 apresentou localização dispersa em todos os cromossomos autossômicos, com alguns sinais mais conspícuos em regiões terminais e intersticiais, sendo este padrão evidenciado também nos cromossomos sexuais Z e W (Figura 1j). O elemento transponível Tc1 foi localizado nas regiões centromérica e terminal de alguns cromossomos e na região intersticial do braço longo do cromossomo Z. Nenhum sinal de hibridização foi evidenciado no cromossomo W (Figura 1k).

A técnica de bandeamento C revelou que a heterocromatina encontra-se localizada na região centromérica da maioria dos cromossomos e nas regiões terminais de alguns cromossomos. No cromossomo Z a heterocromatina foi evidenciada na região centromérica e terminal do braço longo. O cromossomo W apresentou grande quantidade de heterocromatina ao longo de sua extensão cromossômica (Figura 1l).



**Figura 1:** Metáfases cromossômicas de *Semaprochilodus taeniurus*, hibridizadas com sequências microssatélites (a – f) e elementos transponíveis (g – k). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI e as sondas marcadas com biotina (verde) e digoxigenina (vermelho). Localização da heterocromatina constitutiva nesta espécie (l).

#### III.4.4.2 Hibridização de sequências repetitivas de DNA em *S. insignis*

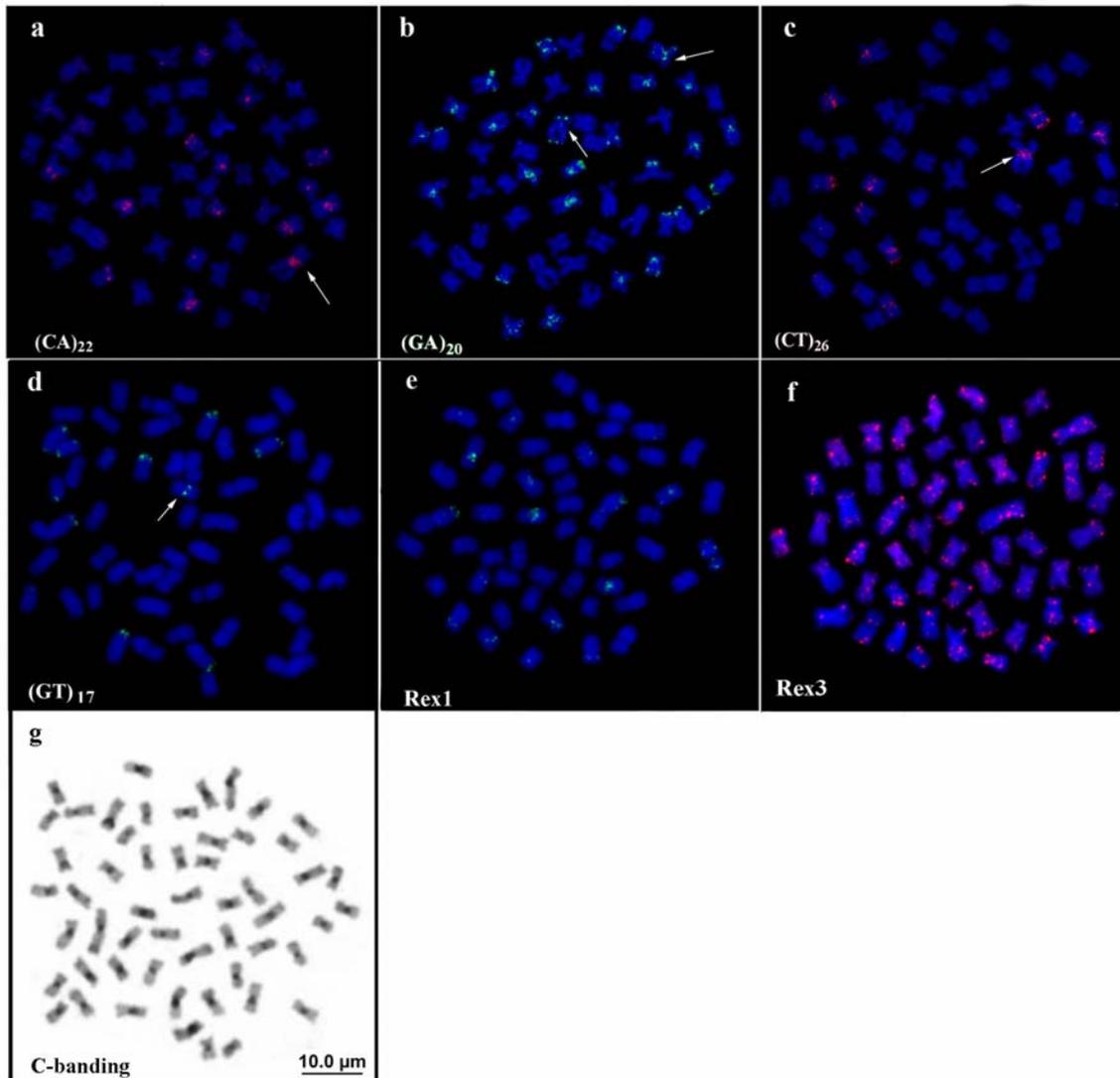
Em *S. insignis* nem todas as sequências repetitivas evidenciaram sinais positivos de hibridização (Tabela 2).

**Tabela 2:** Quadro comparativo de sequências hibridizadas em *S. insignis* e *S. taeniurus* += sinais de hibridização; - = ausência de hibridização.

Similaridade ou motivo de repetição	<i>S. taeniurus</i>	<i>S. insignis</i>
(CA) <sub>22</sub>	+	+
(GA) <sub>20</sub>	+	+
(GT) <sub>17</sub>	+	+
(CT) <sub>26</sub>	+	+
(CT) <sub>14</sub> GT(CT) <sub>5</sub> (CG) <sub>2</sub> (CT) <sub>9</sub>	+	-
(CT) <sub>9</sub> CA(GT) <sub>7</sub> CG(GT) <sub>19</sub>	+	-
ERV2	+	-
Tc1_FR2	+	-
L2	+	-
Rex1-9_XT	+	+
Rex 3	+	+

O microssatélite (CA)<sub>22</sub> foi evidenciado principalmente na região centromérica de vários cromossomos inclusive em um dos homólogos metacêntrico grande (seta) e na região terminal de um único par cromossômico (Figura 2a). O microssatélite (GA)<sub>20</sub> foi evidenciado nas regiões centroméricas e/ou intersticiais de vários cromossomos sendo que um par de homólogos (setas) apresentou marcações biteloméricas e centromérica (Figura 2b). O marcador microssatélite (CT)<sub>26</sub> hibridou em regiões centroméricas e/ou teloméricas em 10 pares de cromossomos, bem como em um dos homólogos metacêntricos grande na região centromérica (Figura 2c – seta). O (GT)<sub>17</sub> foi revelado nas regiões terminais de nove cromossomos e na região centromérica de somente um cromossomo (2d).

Nesta espécie, somente os retrotransposons Rex1 e Rex3 puderam ser identificados pela técnica de FISH. O elemento transponível Rex1 apresentou distribuição compartimentalizada na região centromérica da maioria dos cromossomos e na região terminal de dois cromossomos maiores, referentes ao primeiro par metacêntrico. Por outro lado, o retroelemento Rex3 apresentou um padrão de distribuição dispersa, sendo evidenciado em todas as regiões cromossômicas da maioria dos cromossomos do complemento. A técnica de bandeamento C evidenciou que a heterocromatina encontra-se localizada na região centromérica da maioria dos cromossomos e na região pericentromérica e terminal de alguns poucos cromossomos (Figura 31).



**Figura 2:** Metáfases cromossômicas de *Semaprochilodus insignis* hibridizadas com sequências microssatélites (a – d) e elementos transponíveis (e, f). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI e as sondas marcadas com biotina (verde) e digoxigenina (vermelho) (a – k). Localização da heterocromatina constitutiva nesta espécie (g).

### III.4.5 Discussão

#### III.4.5.1 Distribuição de sequências repetitivas nos cromossomos autossômicos

A comparação do padrão heterocromático e o mapeamento físico cromossômico das sequências repetitivas entre *S. taeniurus* e *S. insignis* evidenciou que estas ocorrem mais frequentemente em regiões heterocromáticas, entretanto sítios de hibridização também foram identificados em regiões eucromáticas, indicando que algumas destas sequências possivelmente desempenhem algum papel funcional no genoma. Recentemente, a Enciclopédia de Elementos de DNA (ENCODE) mostrou que a região do genoma conhecida

como não codificante é rica em elementos funcionais que podem ser transcritos em RNA, atuar na ancoragem de proteínas, controlar e influenciar a atividade gênica, inclusive de genes distantes, e até atuar na conformação estrutural das moléculas (The ENCODE Project Consortium 2012).

De maneira geral, a hibridização cromossômica dos microssatélites evidenciou que estes se acumulam mais intensamente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos autossômicos em ambas espécies. Entretanto, a análise comparativa revelou que algumas destas sequências ocorrem em regiões distintas nos cromossomos destas espécies. Em *S. taeniurus* o microssatélite (CA)<sub>22</sub> foi evidenciado principalmente nas regiões terminais dos cromossomos, enquanto que em *S. insignis* foram preferencialmente encontrados na região centromérica dos mesmos. Essa informação é interessante uma vez que *S. taeniurus* apresentou grandes marcações terminais, não observadas em *S. insignis*, na FISH utilizando sonda *Cot-1* DNA (cinética de ressociação) (Terencio *et al.* 2012c). Estes resultados indicam que estas sequências podem estar envolvidas na formação estrutural do centrômero e telômero os quais são caracterizados por apresentar grande quantidade de sequências repetitivas em tandem e podem ser considerados *hotspots* de inserção ou retenção de sequências repetitivas, influenciando na frequência de rearranjos cromossômicos nestas regiões. DNAs satélites centromérico já foram identificados em várias espécies de peixes. (Canapa *et al.* 2002; Eichler e Sankoff 2003).

Em *S. insignis* os microssatélites (CA)<sub>22</sub> e (CT)<sub>26</sub> foram evidenciados na região centromérica de apenas um dos homólogos do primeiro par metacêntrico. Estas marcações discordantes em homólogos podem ser em decorrência de eventos de duplicações destas sequências em apenas um dos homólogos, o que possibilitaria a identificação destes clusters pela FISH.

A distribuição de elementos transponíveis no genoma da maioria dos organismos é uniforme, ocorrendo tanto em regiões eucromáticas quanto em heterocromáticas (Volff *et al.* 2003; Fischer *et al.* 2004). O mapeamento físico cromossômico desta classe de sequências repetitivas corroborou esta afirmativa, além de evidenciar padrões distintos de abundância e localização nas diferentes espécies. Os elementos transponíveis L2 e Tc1 só evidenciaram sinais de hibridização nos cromossomos autossômicos de *S. taeniurus*, indicando que estes elementos apresentam um maior número de cópias integrando o genoma desta espécie. Por outro lado, os retrotransposons Rex1 e Rex3 foram identificados no genoma das duas espécies e apresentaram o mesmo padrão de distribuição, sendo que o Rex1 apresenta blocos de

compartimentalização na região centromérica de alguns poucos cromossomos e o Rex3 na região subterminal e terminal da maioria dos cromossomos. Esta informação é interessante porque reflete um caráter conservado na evolução destes elementos no genoma das duas espécies. A compartimentalização observada nas regiões centromérica e terminal podem sugerir duas coisas: (1) os eventos de transposição são mais frequentes na região heterocromática; (2) há uma eliminação massiva destas sequências repetitivas nas regiões ricas em genes (Fischer *et al.* 2004). Recentemente, a hibridização dos retroelementos Rex1, Rex3 e Rex6 em ciclídeos Neotropicais também evidenciou um padrão conservado neste grupo de peixes (Schneider *et al.* 2012a).

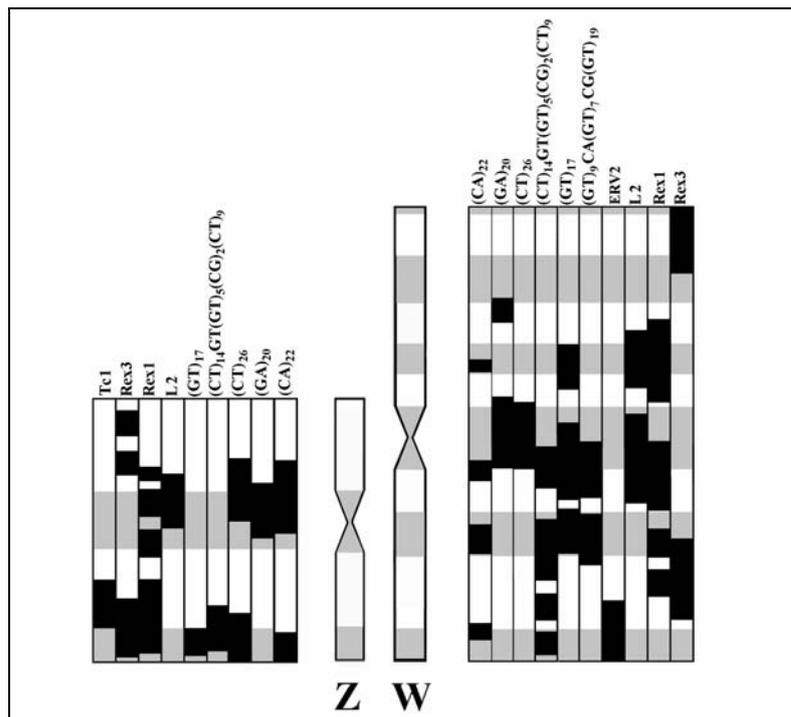
O genoma dos peixes contém uma infinidade de famílias de retrotransposons que são muito estudados por conta do impacto que eles podem causar nos genomas como, rearranjos cromossômicos, diferenciação de cromossomos sexuais e por consequência, especiação (Ozouf-Costaz *et al.* 2004). Entretanto, alguns TEs, por exemplo, os retrotransposons teloméricos de *Drosophila* são aparentemente benéficos para o hospedeiro e acredita-se que durante a evolução muitos destes elementos podem ter sido domesticados assumindo novas funções celulares no genoma (Fischer *et al.* 2004; Biemont e Vieira 2006). Estudos com elementos repetitivos dispersos em genomas de insetos também já demonstraram que estes, após a fase de invasão, tendem a ser silenciados e posteriormente sofrem deterioração molecular até serem incorporados no genoma hospedeiro. Na fase de deterioração molecular o elemento se torna inativado e progressivamente acumula mutações como inserções e deleções em taxas neutras, até perder completamente sua identidade ou ser perdido do genoma hospedeiro (Fernández-Medina *et al.* 2012).

No geral, a análise comparativa realizada neste trabalho evidenciou que o genoma de *S. taeniurus* é mais rico em heterocromatina e sequências repetitivas, as quais podem ter contribuído fortemente na diferenciação genômica destas espécies.

#### III.4.5.2 Distribuição de sequências repetitivas nos cromossomos sexuais de *S. taeniurus*

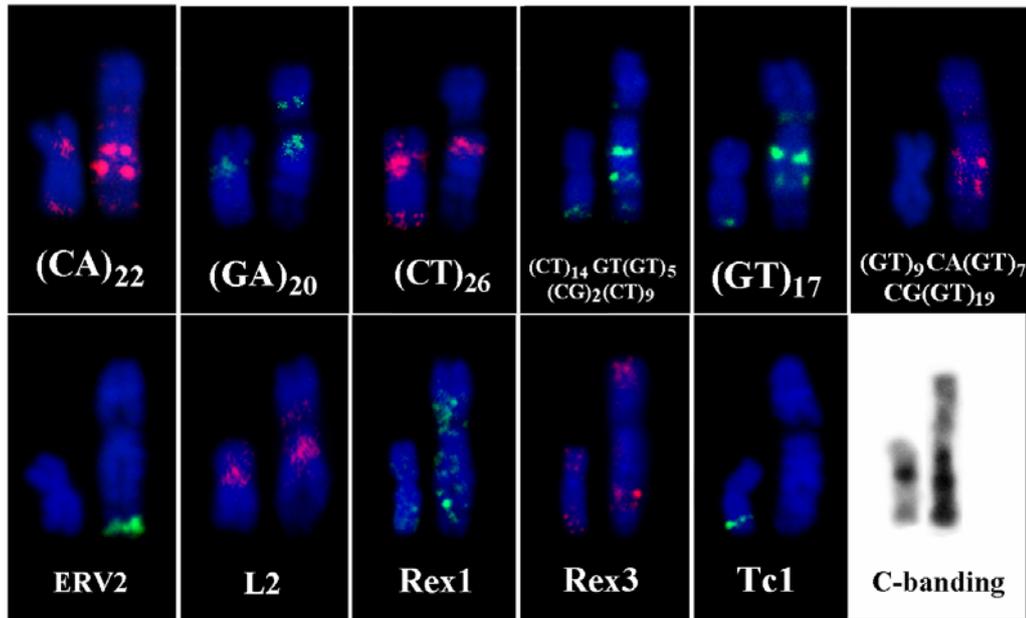
*Semaprochilodus taeniurus* é a única espécie da família Prochilodontidae a apresentar um sistema cromossômico (ZZ/ZW). Morfologicamente, o cromossomo W é bem maior que o seu homólogo Z e contém grande quantidade de heterocromatina (Feldberg *et al.* 1987; Terencio *et al.* 2012a). O cromossomo W de *S. taeniurus* apresenta grande quantidade de sequências repetitivas em tandem e dispersas, sugerindo que estas sequências podem ter contribuído para a evolução do sistema sexual nesta espécie (Terencio *et al.* 2012b; 2012c).

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam essa hipótese, uma vez que grandes clusters de sequências repetitivas conhecidas foram evidenciados no par sexual, principalmente no W. Ainda, apesar da maioria destas sequências ocorrerem em regiões heterocromáticas, a análise comparativa indicou que algumas delas invadem regiões eucromáticas (Figura 3). O acúmulo dessas sequências repetitivas nas regiões ricas em genes poderia refletir na redução gradual do crossing-over entre os proto-sexuais, evoluindo no par heteromórfico ZW.



**Figura 3:** Ideograma esquemático dos cromossomos sexuais de *Semaprochilodus taeniurus*, destacando o padrão de distribuição das sequências repetitivas evidenciadas pela FISH. Regiões em cinza representam a localização da heterocromatina constitutiva e em preto as sequências hibridizadas.

O mapeamento físico dos microssatélites nos cromossomos sexuais revelou que estas sequências ocorrem nas regiões centromérica e telomérica do cromossomo Z e mais intensamente nas regiões pericentromérica e intersticial do cromossomo W (Figura 4). Em muitos casos, a acumulação de microssatélites precede a evolução do cromossomo sexual heteromórfico. Ainda, acredita-se que estes elementos tenham um importante papel na evolução dos cromossomos sexuais devido a sua capacidade de adotar conformações incomuns incluindo grampos triplex e tetraplex (Wells *et al.* 2005).



**Figura 4:** Cromossomos sexuais (Z e W) de *Semaprochilodus taeniurus* evidenciando: o padrão de localização das sequências repetitivas hibridizadas pela FISH; a localização da heterocromatina constitutiva (banda-C).

Alguns elementos transponíveis já foram identificados nos cromossomos sexuais de muitos organismos e os resultados sugerem que a mobilização massiva destes elementos pode estar associada com instabilidades genéticas, que evoluíram no par cromossômico heteromórfico. Acredita-se que a acumulação de elementos transponíveis é um evento que ocorre antes da restrição total da recombinação, sendo considerada como a primeira característica no processo de divergência entre os proto-sexuais, já que o aumento de conteúdo de DNA resulta, na maioria das vezes, em heterogametia de um dos cromossomos sexuais (Larin *et al.* 1994; Desset *et al.* 2003; Bartolome' e Maside 2004; Feschotte e Pritham 2007, Gontan *et al.* 2012; Terencio *et al.* 2012b).

Assim, os resultados encontrados neste estudo resultaram em novas informações referentes à estrutura e organização da fração repetitiva do genoma de *Semaprochilodus* spp. e sua influência na evolução dos cromossomos sexuais em *S. taeniurus*. Porém, a investigação genômica de outras espécies de peixes da família Prochilodontidae poderá fornecer outras informações importantes acerca da evolução cariotípica neste grupo de peixes.

#### IV. Conclusões gerais

- As análises citogenômicas empregadas neste estudo em duas espécies de *Semaprochilodus* não revelaram diferenças genéticas entre indivíduos de uma mesma espécie provenientes dos diferentes tipos de água amostrados. Este resultado pode ser reflexo do comportamento e ciclo de vida destes peixes que realizam ciclos de migração reprodutiva.
- Apesar das duas espécies de *Semaprochilodus* apresentarem  $2n=54$  cromossomos, características cromossômicas distintas foram evidenciadas em cada espécie.
- As análises de citogenética clássica corroboraram parcialmente os dados encontrados em estudos anteriores, diferindo somente nos pares portadores das regiões organizadoras de nucléolo (RON).
- A sintenia entre os sítios ribossomais 18S e 5S, comum nos prochilodontídeos, foi observada somente em *S. insignis*. Em *S. taeniurus*, os mesmos foram evidenciados em pares distintos.
- *Semaprochilodus insignis* e *S. taeniurus* apresentaram múltiplos sítios de DNA ribossomal 5S, podendo tratar-se de pseudogenes ou sequências repetitivas originadas deste gene, já que o sequenciamento destas sequências evidenciou cópias com deleções na região codificante.
- Os genomas de *S. insignis* e *S. taeniurus* apresentam grande quantidade de sequências repetitivas, dentre elas transposons e retrotransposons, os quais podem estar envolvidos na dinâmica evolutiva neste grupo de peixes, inclusive na origem dos cromossomos B em *Prochilodus* spp.
- As sequências repetitivas podem estar envolvidas na evolução do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *S. taeniurus*, uma vez que o sequenciamento do cromossomo W microdissectado e o mapeamento físico cromossômico revelaram alta densidade destas sequências neste cromossomo.
- O heteromorfismo do cromossomo W se deu por acúmulo de heterocromatina provavelmente originada como mecanismo de defesa contra elementos invasivos, tais como transposons e retrotransposons identificados neste cromossomo.

## V. Perspectivas

Avanços significativos foram alcançados no entendimento da organização genômica de *S. insignis* e *S. taeniurus*, entretanto, alguns aspectos importantes ainda precisam ser investigados, como:

- A amplificação do fragmento gênico SOX9 identificado no cromossomo W, por meio da *PCR walking* e a utilização deste como sonda, para mapeamento físico cromossômico nas demais espécies de peixes da família Prochilodontidae, visando elucidar os mecanismos envolvidos na evolução do sexo neste grupo de peixes.
- A microdissecção, amplificação e geração de sonda cromossômica do cromossomo Z, a qual poderá revelar os proto-sexuais nas demais espécies da família Prochilodontidae.
- O sequenciamento de última geração (*next generation*) dos cromossomos sexuais Z e W para revelar a composição genômica destes cromossomos, bem como a identificação dos genes envolvidos na determinação sexual nesta espécie.

## VI. Referências Bibliográficas

- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M.; Gomes, L.C. 2005. Conservação da Biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1: 1-8.
- Almeida, L.M.; Carareto, C.M.A. 2005. *Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção deste ciclo?* - Série Monografias SBG. Ribeirão Preto: SBG, 43p.
- Almeida-Val, V.M.F.; Farias, I.P. 1996. Respiration in fish of the Amazon: metabolic adjustments to chronic hypoxia. *In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (eds). Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*, Inpa, Manaus, 257-271pp.
- Araújo-Lima, C.A.R.M. 1984. *Distribuição espacial e temporal de larvas de Characiformes em um setor do rio Solimões/Amazonas próximo a Manaus, AM*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 84pp.
- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families. *In: Nei M and Koehn RK (eds) Genes and Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland, pp 38-61.
- Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Endler, A.L.; Cavallaro, Z.I.; Jesus, C.M.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2006. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277-284.
- Barletta, M.; Jaureguizar, A.J.; Baigun, C.; Foutoura, N.F.; Agostinho, A.A.; Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on Neotropical systems. *Journal of Fish Biology* 76: 2118-2176.
- Bartolomé, C.; Maside, X. 2004. The lack of recombination drives the fixation of transposable elements on the fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research*. 2: 91-100.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521-524.

- Bohne, A.; Zhou, Q.; Amandine, D.; Schmidt, C.; Scharl, M.; Galiana-Arnoux, D.; Volff, J.N. 2012. Zisupton – A novel superfamily of DNA transposable elements recently active in fish. *Molecular Biology and Evolution* 29(2): 631-645.
- Brasileiro-Vidal, A.C.; Guerra, M. 2002. Citogenética molecular em cereais. In: Brammer, S. P.; Iorczeski, E. J. *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*, Passo fundo, Embrapa 277-298pp.
- Brooks, L.D. 1988. The evolution of recombination rates. In: Michod RE, Levin BR (eds) *The Evolution of Sex*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp 87-105
- Burt, A.; Trivers, R. 2006. *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Cambridge: Harvard University Press, pp 228-300.
- Cabral-de-Mello, D.C.; Moura, R.C.; Melo, A.S.; Martins, C. 2011. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. *Genetica* 139:315-325.
- Camacho, J.P.M.; Sharbel, T.F.; Beukeboom, L.W. 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 355: 163-178.
- Camacho, J.P.M. 2005. “B chromosomes” In: T.R. Gregory. *The evolution of the genome*. San Diego: Elsevier. pp. 223-86.
- Canapa, A.; Cerioni, P.N.; Barucca, M.; Olmo, E.; Caputo, V. 2002. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research* 10: 297-304.
- Capy, P.; Bazin, C.; Higuete, D.; Langin, T. 1998. Eds. *Dynamics and Evolution of Transposable Elements*. Austin/London: Landes Bioscience/Chapman Hall, p. 1-197.
- Caputo V, Giovannotti M, Cerioni PN, Splendiani A, Tagliavini J, Olmo E (2011) Chromosomal study of a lamprey (*Lampetra zanandreae* Vladykov, 1955) (Petromyzonida: Petromyzontiformes): conventional and FISH analysis. *Chromosome Research* 19:481-491.
- Carvalho NDM, Gross MC, Schneider CH, Terencio ML, Zuanon J, Feldberg E (2012) Cytogenetics of Synbranchiformes: a comparative analysis of two *Synbranchus* Bloch, 1795 species from the Amazon. *Genetica* 140:149-158.
- Castro, R.C.M.; Vari, P.P. 2004. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiforme): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Books*, Washington, DC, n.622, p.189.

- Castro, R.M.C.; Vari, R.P. 2003. Family Prochilodontidae. *In*: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J. (Eds). *Check list of the freshwater fishes of south and central America*. Editora da Pontificia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil, 65-70pp.
- Cavallaro, Z.I.; Bertollo, L.A.C.; Perfectti, F.; Camacho, J.P.M. 2000. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research* 8: 627-634.
- Charlesworth, B.; Snegowski, P.; Stephan, W. 1994. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. 2005. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95: 118-128.
- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2010. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105: 554-561.
- Dasilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Roest Crollius H (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci SA* 21:13636-41.
- Desset, S.; Meignin, C.; Dastugue, B.; Vaury, C. 2003. A heterochromatic locus governing the control of independent endogenous retroviruses from *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2: 501-509.
- Dias, L.A.; Foresti, F. Oliveira, C. 1998. Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae). *Caryologia* 2:105-113.
- Diniz, D.; Bertollo, L.A.C. 2003. Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia* 56: 303-311.
- Doolittle, W.F.; Sapienza, C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601-603.
- Dunham, I.; Kundaje, A.; Aldred, S.F.; Collins, P.J.; Davis, C.A.; Doyle, F; et al. (2012). An Integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-64.
- Eichler, E.E.; Sankoff, D. 2003. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 301: 793.
- Eickbush, T.H.; Furano, A.V. 2002. Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. *Current Opinion in Genetics & Development* 12: 669-674.

- Ellegren, H. 2011. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nature Reviews Genetics* 12: 157-166.
- Ezaz, T.; Stiglec, R.; Veyrunes, F.; Graves, J.A.M. 2006. Relationship between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems: Review. *Current Biology* 16:736-743.
- Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O. 1987. Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome* 29: 1-4.
- Fernández-Medina, R.D.; Ribeiro, J.M.C.; Carareto, C.M.A.; Velasque, L.; Struchiner, C.J. 2012. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 13:272
- Ferree, P.M.; Prasad, S. 2012. How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. *Genetics Research International*, volume, article ID430136.
- Ferreira, I.A.; Bertollo, L.A.C.; Martins, C. 2007. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S Hind III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. *Cytogenetic and Genome Research* 118: 78-83.
- Ferreira, I.A.; Martins, C. 2008. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.
- Feschotte, C. 2004. Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. *Molecular Biology and Evolution* 21:1769-1780.
- Feschotte, C.; Pritham, E.J. 2007. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics* 41: 331-368.
- Fischer, C.; Bouneau, L.; Coutanceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volff, J.N.; Ozouf-Costaz, C. 2004. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336: 175-183.
- Fischer, C.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Crnogorac-Jureevic, T.; Weissenbach, J.; Bernot, A. 2002. Conservation of the T-cell receptor alpha/delta linkage in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis*. *Genomics* 79: 241-248.

- Franck, J.P.C.; Harris, A.S.; Bentzen, P.; Denovan-Wright, E. M.; Wright, J.M. 1991. *Organization and evolution of satellite, minisatellite and microsatellite DNAs in teleost fishes*. Oxford Surveys on Eukaryotic Genes, Vol. 7. Oxford University Press.
- Frederiksen, S.; Cao, H.; Lomholt, B.; Levan, G.; Halleberg, C. 1997. The rat 5S rRNA bona fide gene repeat maps to chromosome 19q12→qter and the pseudogene repeat maps to 12q12. *Cytogenetics and Cell Genetics* 76: 101-106.
- Friebe, B.; Tuleen, N.; Jiang, J.; Gill, B.S. 1993. Standart karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. *Genome*, 1: 731-742.
- Fujiwara, A.; Abe, S.; Yamaha, E.; Yamazaki, F.; Yoshida, M.C. 1998. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Research* 6: 463-471.
- Furch, K. 1984. Water chemistry of the Amazon Basin: the distribution of chemical elements among freshwaters. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Junk, Dordrecht: 167-169pp.
- Galetti, Jr, P.M.; Martins, C. 2004. Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. In Guerra. M. (ed) *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto, editora da Sociedade Brasileira de Genética, 61-88pp.
- Gontan, C.; Achame, E.M.; Demmers, J.; Barakat, T.S.; Rentmeester, E.; van Ijcken W., Grootegoed, A.; Gribnau, J. 2012. RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature* 485: 386-390.
- Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest*. Los Angeles, University of California Press, USA. 200pp.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. The Negro and the Trombetas – Black and Clear Waters from Ancient Lands. In: *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 98p.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L. 1982. Life and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1: 107-133.
- Grass, D.E.; Brassesco, M.S.; Markariani, R.; Roncati, H.A.; Sakamoto-Hojo, E.T.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C. 2007. Cytogenetics polymorphism in *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes) from the middle Paraná River; Santa Fe City, Argentina. *Comparative* 2: 113-119.
- Grewal, S.I.S.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8: 35-46.

- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2009. Comparative cytogenetic analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus fishes, Cichlidae): Chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research* 1:43-53.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010a. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetics and Genome Research*, 1: 1-11.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010b. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology* 76: 1117-1127.
- Guerra, M.S. 1988. *Introdução à citogenética geral*. Guanabara, 144pp.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/96/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hart, S.; Koch, K. R.; Woods, D.R. 1992. Identification of indigo-related pigments produced by *Escherichia coli* containing a cloned *Rhodococcus* gene. *Journal Genetics Microbiology* 138: 211-216.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F.; Galetti Jr., P.M. 2002. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetics and Genome Research* 98: 308-310.
- Horvath, J.E.; Bailey, J.A.; Locke, D.P.; Eichler, E.E. 2001. Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. *Human Molecular Genetics*, 10: 2215-2223.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1- step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- Ivics, Z.; Izsvák, Z.; Minter, A.; Hackett, P.B. 1996. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings of the National Academy of Science* 93:5008-5013.

- Jesus, C.M.; Galetti-Jr, P.M.; Valentin, S.R.; Moreira-Filho, O. 2003. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118: 25-32.
- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. 2003. Chromosomal localization of 5S and 18S RNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia* 56: 281–287.
- Junk, W.J.; Furch K. 1993. A general review of tropical South American floodplains. *Wetlands Ecology and Management*, 4:231-238.
- Junk, W.J.; Soares, M.G.M.; Saint-Paul, U. 1997. The fish. In: Junk, W. J. (eds), *The Central Amazon Floodplain*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 385–408.
- Jurka, J.; Bao, W.; Kojima, K.K. 2011. Families of transposable elements, population structure and the origin of species. *Biology Direct* 6:44.
- Jurka, J.; Kapitonov, V.V.; Pavlicek, A.; Klonowski, P.; Kohany, O.; Walichiewicz, J. 2005. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetics and Genome Research* 110: 462–467
- Kapitonov, V.V., Jurka, J. 2003. A novel class of SINE elements derived from 5S rRNA. *Molecular Biology and Evolution* 20(5): 694-702.
- Kidwell, M.G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- Kidwell, M.G.; Lisch, D.R.: Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 2001, 55: 1–24.
- Kohany, O.; Gentles, A.J.; Hankus, L.; Jurka, J. 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinforma* 7: 474
- Komiya, H.; Takemura, S. 1979. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry*, 86: 1067-1080.
- Larin, Z.; Fricker, M.D.; Tyler-Smith, C. 1994. De novo formation of several features of a centromere following introduction of a Y alphoid YAC into mammalian cells. *Human Molecular Genetics* 5: 689-95.
- Leite, R.G. 2000. *Alimentação e fontes autotróficas de energia utilizadas pelas larvas de peixes do rio Solimões/Amazonas e suas áreas inundáveis*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, AM. 118pp.

- Leite, R.G.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 2002. Feeding of the *Brycon cephalus*, *Triportheus elongatus* and *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes, Characiformes) larvae in Solimões/Amazonas River and floodplain areas. *Acta Amazonica*, 32(3): 129-147.
- Leite, R.G.; Silva, J.V.V.; Freitas, C.E. 2006. Abundância e distribuição das larvas de peixes no Lago catalão e no encontro dos rios Solimões e Negro, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 4: 557-562.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Levinson, G.; Gutman, G.A. 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 15:5323-5338.
- Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453:2465.
- Lima, A.C.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 2004. The distribution of larval and juvenile fishes in Amazonian rivers of different nutrient status. *Freshwater Biology* 49: 1-14.
- Long, E.O.; David, I.D. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 49: 727-764.
- Lucchini, S.; Nardi, I.; Barsacchi, G.; Batistoni, R.; Andronico, F. 1993. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 36: 762-773.
- Machado, T.C.; Pansonato-Alves, J.C.; Pucci, M.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. 2011. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genetics* 12: 65.
- Mago-Leccia, F.M. 1972. Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), con una sinops de las especies de Venezuela. *Acta Biologica Venezuelana* 8: 35-96.
- Marreta, M.E.; Faldoni, F.L.C.; Parise-Maltempi, P.P. 2012. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. *Journal of Fish Biology* 80: 630-637.

- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. *In*: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). *Fish Cytogenetics*. Enfield, New Hampshire, USA, Science Publisher, Inc., 421-453pp.
- Martins, C.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Oliveira, S.G. 2011. *In*: Advances in Genetics Research, Vol. 4 Kevin V Urbano (Ed.). Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, USA. Pp. 1-82.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rRNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7: 363-367.
- Martins, C.; Wasko, A.P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. *Focus on Genome Research* 335-363.
- Mazzuchelli, J.; Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 136:461–469.
- Mighell, A.J.; Smith, N.R.; Robinson, P.A.; Markham, A.F. 2000. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters* 468: 109-114.
- Miller, W.J.; McDonald, J.F.; Pinsker, W. 1997. Molecular domestication of mobile elements. *Genetica* 100: 261–270.
- Morgante, M.S.; Brunner, G.; Pea, G.; Fengler, K.; Zuccolo, A. 2005. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nature Genetics* 37:997-1002.
- Muller, H.J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* 1: 2-9
- Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2008. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology* 31: 868–873.
- Noletto, R.B.; Vicari, M.R.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F. 2012. Variable B chromosomes frequencies between males and females of two species of pufferfishes (Tetraodontiformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22: 343-349.
- Nowak, R. 1994. Mining treasures from “junk DNA”. *Science* 263: 608-610.
- Ohno, S. 1967. Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes Springer, Berlin
- Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Levy, S. 2003. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *Semaprochilodus laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 1: 47-52.

- Oliveira, E.C. 1996. *Distribuição das larvas de Mylossoma aureum e M. duriventre (Pisces: Serrasalminidae) no rio Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM. 28pp.
- Oliveira, C.; Saboya, S.M.R.; Foresti, F.; Senhorini, J.A.; Bernardino, G. 1997. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity* 79:473-476.
- Oliveira, C.; Chew, J.S.K.; Foresti, F.P.; Dobson, M.; Wright, J.M. 1999. A LINE-like repetitive element from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: Sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma* 108:457-468.
- Oliveira, E.C. 2003. *Distribuição e abundância do ictioplâncton na área da Estação Ecológica de Anavilhanas, Rio Negro, Amazonas, Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 157pp.
- Oliver, K.R.; Greene, W.K. 2011. Mobile DNA and the TE-Thrust Hypothesis: Supporting evidence from the primates. *Mobile DNA* 2: 8.
- Orgel, L.E.; Crick, F.H. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.
- Ozouf-Costaz, C.; Brandt, J.; Korting, C.; Pisano, E.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.P.; Volff, J.N. 2004. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science* 1: 51-57.
- Pardue, M.L.; Gall, J.G. 1969. Molecular hybridization to radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61: 600-604.
- Parolin, P.; Waldhoff, D.; Rottenberger, S.; Kuhn, U.; Kesselmeier, J.; Schmidt, W.; Piedade, M.T.F.; Junk, W.J. 2004. Central Amazon floodplain forests: tree survival in a pulsing system. *The Botanical Review* 70: 357-380.
- Passos, K.B.; Leão, A.S.A.; Oliveira, D.P.; Farias, I.P.; Hrbek, T. 2010. Polymorphic microsatellite markers for the overexploited Amazonian fish, *Semaprochilodus insignis* (Jardine and Schomburgk 1841). *Conservation Genetic Resources* 2: 231-234.
- Pauls, E.; Bertollo, L.A.C. 1983. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36:307-314.
- Pauls, E.; Bertollo, L.A.C. 1990. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, 81: 117-123.

- Pendás, A.M.; Mórán, P.; Freije, J.P.; Garcia-Vásquez, E. 1994. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic Cell Genetic*, 67:31-36.
- Phillips, R.B.; Reed, K.M. 1996. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- Plasterk, R.H.; Izvák, Z.; Ivics, Z. 1999. Resident alien the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genetics* 15:326-332.
- Pokorná, M.; Kratochvíl, L.; Kejnovský, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of the heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12: 90.
- Ribeiro, M.C.L.B. 1983. As migrações dos jaraquis (Pisces, Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil. Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas.
- Ribeiro, M.C.L.B. 1985. A natural hybrid between two tropical fishes: *Semaprochilodus insignis* x *Semaprochilodus taeniurus* (Teleostei, Characoidei, Prochilodontidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 7: 419-421.
- Ruiz-Estévez M.; López-León, M.D.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M. 2012. B-Chromosome ribosomal DNA is functional in the Grasshopper *ypreocnemis plorans*. *PloS ONE* 5:e36600.
- Ruffino, M.L.; Isaac, V.J. 1994. The fisheries of the lower Amazon: questions of management and development. *Acta Biologica Venezuelana*. 15(2): 37-46.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. I. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY.
- Santos, F.A. 2012. Localização genômica de elementos transponíveis em populações de *Hoplias malabaricus* (Characiformes – Erythrinidae) de ambientes de água branca, água clara e água preta na bacia Amazônica. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém-PA
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schuhli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2011. Differentiation of repetitive DNA sites and

- sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica* 139: 1499-1508.
- Schmid, M.; Vitelli, L.; Batistoni, R. 1987. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma* 95: 271–284.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2012a. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. doi: 10.1007/s11160-012-9285-3
- Schweizer, D.; Loidl, J. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. *Chrom Today* 9: 61–74.
- Shapiro, J.A.; Vonsternberg, R. 2005. Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biological Reviews* 80: 1-24.
- Shimoda, K.; Someya, T.; Morita, S.; Hirokane, G.; Noguchi, T.; Yokono, A.; Shibasaki, M.; Takahashi, S. 1999. Lower plasma levels of haloperidol in smoking than in non-smoking schizophrenic patients. *Therapeutic Drug Monitoring* 21:293-296.
- Silva, M.D.; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F. 2011. Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 4: 303-307.
- Sioli, H. 1950. Das Wasser im Amazonasgebiet. Forsch. Fortschr. In: Lowe-McConnel, R.H.(Ed.). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo, EDUSP, 345-373pp.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main effluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: Sioli, H. (ed). *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Netherlands, W. Junk Publications. 127-166.
- Skipper, M. 2007. Mysteries of heterochromatic sequences unravelled. *Nature Reviews Genetics* 8: 567.
- Slobodkin, L.B.; Rapoport, A. 1974. An optimal strategy of evolution. *Quarterly Review in Biology*, 49: 181-200.
- Steinemann, S.; Steinemann, M. (2005). Retroelements: tools for sex chromosome Evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 134-143.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 74: 304-306.

- Sumner, A.T. (2003). *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing, Hoboken.
- Tafalla, C.; Estepa, A.; Coll, J.M. 2006. Fish transposons and their potential use in aquaculture. *Journal of Biotechnology* 123: 397–412.
- Takehana, Y.; Naruse, K.; Asada, Y.; Matsuda, Y.; Shin-I, T.; Kohara, Y.; Fujiyama, A.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. 2012. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the W chromosomes of the medaka fishes. *Chromosome Research* 20: 71-81.
- Teixeira, A.S.; Raposo, J.C.P.; Jamieson, A. 1990. Transferrin variation in jaraquis, *Semaprochilodus taeniurus* and *Semaprochilodus insignis*, in the Amazon region. *Animal Genetics* 21: 419-422.
- Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. 2009. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 125:224–234.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. 2012a. Stable karyotypes: a general rule for the fish of the family Prochilodontidae? *Hydrobiologia* 686: 147-156.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. 2012b. Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome in *Semaprochilodus taeniurus*. *Genetica* (submitted).
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Carmo, E.J.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Feldberg, E. 2012c. Repetitive sequences: the hidden diversity of the heterochromatin in prochilodontid fish. *BMC Genetics* (submitted).
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Timberlake, W.E. 1978. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. *Science* 202: 973-975.
- Torres, G.A.; Gong, Z.; Iovene, M.; Hirsch, C.D.; Buell, C.R.; Bryan, G.L.; Novák, P.; Macas, J.; Jiang, J. 2011. Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. *Genes Genomes Genetics* 1: 85-92.

- Val, A.L. 1986. Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characoidei, Pisces): Aspectos adaptativos (Ilha da Marchantaria, Manaus, AM). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas 112p.
- Val, A.L. Menezes, G.C.; Wood, C.M. 1998. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *Journal of Fish Biology* 52: 83-93.
- Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research* 133: 34-42.
- Van Sluys, M.A.; Scortecci, K.C.; Costa, A.P.P. 2001. O genoma instável, seqüências genéticas móveis. In: Matioli, S.R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, Holos Editora, São Paulo, 70-81pp.
- Vanzela, A.L.L.; Swarça, A.C.; Dias, A.L.; Stolf, R.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Sbalqueiro, I.J.; Giuliano-Caetano, L. 2002. Differential distribution of (GA)<sub>9</sub>+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia* 67:9-13.
- Varriale, A.; Torelli, G.; Bernardi, G. 2008. Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. *RNA* 14: 1492-1500.
- Vazzoler, A.E.A.M.; Caraciolo-Malta, M.; Amadio, S.A. 1989a. Aspectos Biológicos de peixes amazônicos. XI. Reprodução das espécies do gênero *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) do baixo rio Negro, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 1: 165-173.
- Vazzoler, A.E.A.M.; Caraciolo-Malta, M.; Amadio, S.A. 1989b. Aspectos Biológicos de peixes amazônicos. XII. Indicadores quantitativos do período de desova das espécies do gênero *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) do baixo rio Negro, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 1: 175-181.
- Venere, P.C.; Miyazawa, C.S.; Galetti-Jr., P.M. 1999. New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology* 22: 345-349.
- Veríssimo, J. 1985. A pesca na Amazônia. In: Batista, V.S.; Isaac, V.J.; Viana, J.P.; Ruffino, M.L. (ed). *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira*: 63-141.
- Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F. 2006. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in

- the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology* 4: 621-625.
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology* 76: 1094-1116.
- Volff, J.N. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94: 280-294.
- Volff, J.N., Korting, C., Schartl, M. 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1673–1684.
- Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics* 19: 674-678.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Schartl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1427–1438.
- Voltolin, T.A.; Senhorini, J.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Bortolozzi, J.; Porto-Foresti, F. 2010. B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) *Genetica* 138: 281-284.
- Voltolin, T.A.; Senhorini, J.A.; Foresti, F.; Bortolozzi, J.; Porto-Foresti, F. 2011. Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology* 2: 220-224.
- Wasko, A.P.; Martins, C.; Wright, J.M.; Galetti Jr., P.M. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893–902.
- Weber, J.L.; May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* 3:388-396.
- Wells, R.D.; Dere, R.; Herbert, M.L.; Napierala, M.; Son, L.S. 2005. Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Research* 33: 3785-3798.
- Wichman H.A.; Van Den Bussche, R.A.; Hamilton, M.J.. Baker, R.J. 1992. Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica* 86:287-293.
- Wilkelski, M.; Cooke, S.J. 2006. Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 38-46.

- Wootton, R.J. 1990. *Ecology of teleost fishes*. New York, Chapman and Hall.
- Yoshida, K.; Terai, Y.; Mizoiri, S.; Aibara, M.; Nishihara, H.; Watanabe, M.; Kuroiwa, A.; Hirai, H.; Hirai, Y.; Matsuda, Y.; Okada, N. 2011. B chromosomes have a functional effect on female sex determination in lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genetic* 7(8):e1002203.
- Yuan, Y.W.; Wessler, S.R. 2011. The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proc Natl Acad Sci* 108: 7884-7889.
- Zhou, Q.; Froschauer, A.; Schultheis, C.; Schmidt, C.; Bienert, G.P.; Wenning, M.; Dettai, A.; Volf, J.N. 2006. Helitron transposon on the sex chromosomes of the Platyfish *Xiphophorus maculatus* and Their Evolution in Animal Genomes. *Zebrafish* 3(1):39-52.
- Zwick, M.S.; Hanson, R.E.; McKnight, T.D.; Nurul-Islam-Faridi, M.; Stelly, D.M. 1997. A rapid procedure for the isolation of C<sub>0</sub>t-1 DNA from plants. *Genome* 40: 138-142.