



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG-GCBE_v

**Evolução Cromossômica em Ctenoluciidae (Characiformes) com
ênfase na diferenciação de cromossomos sexuais**

José Francisco de Sousa e Souza



Manaus- Amazonas

Junho de 2023

José Francisco de Sousa e Souza

**Evolução Cromossômica em Ctenoluciidae (Characiformes) com
ênfoque na diferenciação de cromossomos sexuais**

Orientadora: Eliana Feldberg, Dra. – INPA

Coorientador: Marcelo de Bello Cioffi, Dr. - UFSCAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como requisito para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus- Amazonas

Junho de 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

S729e Souza, José Francisco de Sousa e
Evolução Cromossômica em Ctenoluciidae (Characiformes) com
ênfase na diferenciação de cromossomos sexuais / José Francisco de
Souza e Souza; orientadora: Eliana Feldberg; coorientador Marcelo de
Bello Cioffi. - Manaus: [s.l.], 2023.

2.0 MB
102 p. : il. color.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Genética,
Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de
Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Ctenoluciidae . 2. Characiformes. I. Feldberg, Eliana. II. Cioffi,
Marcelo de Bello III. Título

CDD 597

ATA DE DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO

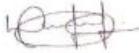
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 28 de abril de 2023, às 14h00 (Horário Brasília) de modo híbrido, reuniu-se a Banca Julgadora da DEFESA PÚBLICA DO CURSO DE DOUTORADO, composta pelos seguintes Doutores, membros titulares: Daniele Matoso; Rafaela Priscila Ota; Roberto Laridondo Lui; Rafael Kretschmer e Roberto Ferreira Artoni, tendo como membros suplentes: Milena Ferreira e Natalia Dayane Moura Carvalho, afim de proceder a arguição da Defesa Pública da Tese de Doutorado do discente **JOSÉ FRANCISCO SOUSA E SOUZA**, intitulada: "EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NA FAMÍLIA CTENOLUCIIDAE (CHARACIFORMES) COM ENFOQUE NA DIFERENCIAÇÃO DE CROMOSSOMOS SEXUAIS". O estudo foi conduzido sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Feldberg, do INPA e Coorientação do Dr. Marcelo de Bello Cioffi, da UFSCar.

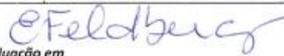
Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

<input type="checkbox"/> Aprovado por maioria	<input type="checkbox"/> Reprovado
<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado por unanimidade	
Menção (se meritório):	
<input type="checkbox"/> Aprovado com "Distinção" (por maioria)	
<input type="checkbox"/> Aprovado com "Distinção e Louvor" (por unanimidade)	

A ATA Foi lavrada e assinada pelos Professores Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

TITULARES	ASSINATURAS
Daniele Aparecida Matoso - UFAM	
Rafaela Priscila Ota - UFGD	
Roberto Laridondo Lui - UNIOESTE/Paraná	
Rafael Kretschmer - UFPEL/RS	
Roberto Ferreira Artoni - UEPG	
SUPLENTES	
Milena Ferreira - UniNorte Laureate	
Natalia Dayane Moura Carvalho - UFAM/COARI	

ELIANA FELDBERG, Dra.
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
 Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - PPG GCBEV
 PO. Nº 162 - 23.08.2021-INPA/MCTI




Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 62 "Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEV.

Sinopse

No presente trabalho, cinco das sete espécies de Ctenoluciidae, foram estudadas por meio de análises citogenômicas (*Ctenolucius hujeta*, *Boulengerella cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*). Comparações intra e interespecíficas foram realizadas pela citogenética convencional e mapeamento de DNAs repetitivos (DNAr 5S e DNAr 18S, *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e sequências microssatélites), Pintura Cromossômica (WCP) e Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Os resultados evidenciaram conservadorismo do (2n) em todas as espécies, no entanto, diferenças macro e microestrutural são observadas entre as espécies e entre os gêneros *Boulengerella* e *Ctenolucius*. A associação de DNAs repetitivos e retroelementos *Rex* aos DNAr 18S e 5S desempenharam importante papel na formação de *hotspot* cromossômicos, o que possibilitou a ocorrência de rearranjos cromossômicos e a transposição de DNAr. A análise de CGH não evidenciou sequências sexo-específicas. Assim, propomos que o heteromorfismo, evidenciado no par nucleolar (em machos) das espécies de *Boulengerella*, decorra da expressão diferencial do DNAr 18S, influenciado pelo acúmulo de diferentes sequências de repetição simples (SSR) nesta região.

Palavras chave: DNAs repetitivos, Retroelementos, CGH, Pintura cromossômica, peixes neotropicais.

Dedico esta tese *in memoriam* a Orides dos Santos Soares Junior (1991- 2021), um excelente professor de matemática, um amigo querido, que infelizmente foi uma das inúmeras vítimas da pandemia de Covid-19, a todos que tiveram sua vida interrompida vítimas dessa pandemia, e aos que lutaram incansavelmente para encontrar uma cura, a vocês dedico minha Tese e minha eterna gratidão.

“Quando a oportunidade encontra uma pessoa preparada, ser incrível é possível.”

— Andrew Aumarick

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 (INPA).

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste estudo. Aos financiamentos fornecidos pelos projetos: Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA II (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2). Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com implementação de avanços técnicos (AUXPE – Pró-Amazônia, CAPES 3297/2013/Processo nº 23038.009446/2013-09). Citogenética clássica e molecular em peixes da bacia amazônica frente a diferentes desafios ambientais (Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg, CNPq - Processo Nº 302421/2014-9).

O presente trabalho teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu (FAPEAM-POSGRAD).

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pelo espaço e apoio ao desenvolvimento desta pesquisa. À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq e FAPEAM pelo apoio e aprovação dos projetos que mantiveram o laboratório de genética animal (LGA).

Meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora Dra. Eliana Feldberg, pelo apoio, confiança e por estar sempre presente me auxiliando nessa jornada. Ao meu esposo Emerson Garajau, obrigado imensamente por aceitar atravessar essa longa e difícil jornada que foi chegar até aqui, seu apoio e companheirismo foram essenciais para que eu pudesse concluir esse ciclo. Aos meus pais José Alberto, Maria do Socorro, Maria José e José Pinto de Oliveira, sou muito grato por ter sido duplamente agraciado com pais e mães, tenho muito orgulho de ser filho de vocês, obrigado pelo esforço que vocês fizeram para que eu hoje pudesse estar aqui, com vocês aprendi alguns dos ensinamentos mais sábios da vida, sem dúvidas eu não teria palavras para expressar toda minha gratidão a vocês. Um muito obrigado a dona Raimunda Torres (Ray) para os mais íntimos, dona Raimunda foi uma mãe que ganhei longe de casa, sou imensamente grato a você e a sua família por ter me recebido tão bem e me feito sentir parte da família, minha eterna gratidão pelos ensinamentos e todo suporte durante o mestrado e doutorado.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Marcelo de Bello Cioffi e ao prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, pelo suporte e todo ensinamento ao longo do mestrado e doutorado, o apoio de vocês foi fundamental para que eu pudesse completar este ciclo.

Agradeço aos meus irmãos pelo suporte emocional e por toda ajuda, aos amigos Yasmin Farias, Amanda Batista, Simone Soares, Marck Torres, Fábio Gomes, Valeria Santos, Sidney Seixas, Ajozadaque Silva, por estarem presentes nessa caminhada e por todo suporte e apoio oferecido. Aos meus colegas de laboratório, os que ainda estão presentes e aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui, Léo Gol, Erika Guimarães, Vanessa Figliuolo, Ramon Favarato, Alan Gomes, Alex Viana, Leandro Marajó, Patrik Viana, os pescadores que auxiliaram nas coletas e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização dessa tese.

Resumo

Ctenoluciidae é uma família de peixes de água doce, que atualmente compreende dois gêneros: *Ctenolucius* com duas espécies (*C. beani* e *C. hujeta*) e *Boulengerella* com cinco espécies (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius*, *B. maculata* e *B. xyrekes*), as quais apresentam ampla distribuição na América do sul. Apesar de ser um grupo pouco diverso, dados citogenéticos são escassos, e sugerem conservação do número diploide ($2n$) de 36 cromossomos, evidenciado em cinco das sete espécies desta família. Entretanto, este conservadorismo se refere apenas ao $2n$, uma vez que diferenças quanto à distribuição de algumas classes de sequências repetitivas foram marcadores resolutivos, para evidenciar processos diferenciais de evolução cromossômica entre espécies de *Boulengerella*. Destacadamente, um heteromorfismo cromossômico relacionado ao par nucleolar, associado com um acúmulo incomum de sequências teloméricas, sugeriu um possível sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, nas espécies de *Boulengerella* analisadas. Entretanto, a análise de CGH não evidenciou sequências sexo-específicas, levando-nos a propor que o heteromorfismo, evidenciado no par nucleolar (em machos) das espécies de *Boulengerella*, decorra da expressão diferencial do DNAr 18S, influenciado pelo acúmulo de diferentes SSR nesta região. Este estudo traz evidências da evolução cariotípica da família Ctenoluciidae, a partir da caracterização citogenômica de *Ctenolucius hujeta* e espécies de *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*), visando compreender a organização genômica e os mecanismos de evolução cromossômica da família. Para isto, são apresentados dados citogenéticos convencionais e mapeamento de DNAs repetitivos (DNAr 5S e 18S, *Rex* 1, 3 e 6 e sequências microssatélites), Pintura Cromossômica (WCP) e Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Pudemos observar, a partir desses resultados, que o conservadorismo no ($2n$) evidenciado entre *Boulengerella* spp. estende-se a *C. hujeta* e limita-se apenas ao $2n$, com diferenças tanto macro quanto microestrutural entre as espécies e entre os gêneros *Boulengerella* e *Ctenolucius*. A associação de DNAs repetitivos e retroelementos *Rex* aos DNAr 18S e 5S desempenharam importante papel na formação de *hotspot* cromossômicos que influenciaram nos rearranjos cromossômicos evidenciados nesta família.

Palavras chave: DNAs repetitivos, Retroelementos, CGH, Pintura cromossômica, peixes Neotropicais.

Abstract

Ctenoluciidae is a freshwater fish family, which currently comprises two genera: *Ctenolucius* with two species (*C. beani* and *C. hujeta*) and *Boulengerella* with five species (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius*, *B. maculata* and *B. xyrekes*), widely distributed in South America. Despite being a small diverse group, cytogenetic data are scarce, and suggest conservation of the diploid number ($2n$), with $2n=36$ chromosomes, evidenced in five of the seven species of this family. However, this conservatism refers only to $2n$, since differences in the distribution of some classes of repetitive sequences were resolving markers, to show differential processes of chromosomal evolution between *Boulengerella* species. Notably, a chromosomal heteromorphism related to the nucleolar pair, associated with an unusual accumulation of telomere sequences, suggested a possible sex chromosome system of the XX/XY type in the analyzed *Boulengerella* species. However, the CGH analysis did not show sex-specific sequences, leading us to propose that the heteromorphism, evidenced in the nucleolar pair (in males) of *Boulengerella* species, resulted from the differential expression of 18S rDNA, influenced by the accumulation of different SSR in this region. This study brings evidence of the karyotypic evolution of the Ctenoluciidae family, based on the cytogenomic characterization of *Ctenolucius hujeta* and four *Boulengerella* species (named *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* and *B. maculata*), aiming to understand their genomic organization and mechanisms of chromosomal evolution. For this, conventional cytogenetic data and repetitive DNA mapping (5S and 18S rDNAs, *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* and microsatellite sequences), Whole Chromosome Painting (WCP) and Comparative Genomic Hybridization (CGH) are presented. The results highlighted that the conservatism in the ($2n$) evidenced among *Boulengerella* spp. extends to *C. hujeta* and is limited to $2n$ only, with both macro and microstructural differences between species. The association of repetitive DNAs and Rex retroelements to 18S and 5S rDNAs played an important role in the formation of chromosomal hotspots that influenced the chromosomal rearrangements evidenced in this family.

Key words: repetitive DNAs, Retroelements, CGH, Chromosome painting, neotropical fish.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 A família Ctenoluciidae	1
1.2 Cromossomos sexuais em peixes	3
2. Objetivos.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. Material e Métodos	10
3.1. Material	10
3.2. Métodos.....	10
3.2.1. Indução de mitoses	10
3.2.2. Obtenção dos cromossomos mitóticos.....	10
3.2.3. Detecção das Regiões Organizadoras do Nucléolo-RON.....	11
3.2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda-C)	12
3.2.5. Extração de DNA total.....	13
3.2.6. Isolamento de sequências repetitivas por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).	13
Sondas de DNA telomérico (TTAGGG) _n	14
Mapeamento de microssatélites	14
Sondas de Retroelementos	14
Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência - FISH.....	14
Marcação da Sonda - Kit DIG-Nick TM Translation Mix (Roche) e Kit BIO-Nick TM Nick Translation Mix (Roche)	14
Preparação cromossômica (FISH simples ou <i>double FISH</i>)	15
Solução de hibridização – ETAPA EM QUE SE ALTERA A EXTRINGÊNCIA	16
Hibridização	17
Lavagens	17
Detecção do sinal	17
Montagem	18
3.2.7 Classificação dos cromossomos e análises cromossômicas	18
3.2.8 Hibridização genômica comparativa (CGH)	19
Resultados e Discussão	21
Capítulo 1. Análise cromossômica em <i>Ctenolucius hujeta</i> Valenciennes, 1850 (Characiformes): Uma nova peça na evolução cromossômica de Ctenoluciidae.....	22
Capítulo 2: Mapeamento cromossômico de elementos transponíveis e sua implicação no processo de evolução cromossômica em Ctenoluciidae	34

Capítulo 3: DNAs repetitivos e sua contribuição para evolução cariotípica da família Ctenoluciidae (Characiformes)	47
Conclusões Gerais.....	66
Referências Bibliográficas	68

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1. Mapa hidrológico da América do Sul com a distribuição de Ctenoluciidae. Em destaque (amarelo) indica onde espécies de *Ctenolucius* já foram amostradas, e em destaque (verde) corresponde à distribuição das espécies de *Boulengerella*. Fonte: Vari, 1995; 2003.

Capítulo 1

Figura 1. Cariótipo de fêmea e machos de *Ctenolucius hujeta* em coloração convencional com Giemsa (a, b), bandeamento cromossômico C (c, d) e Ag- RON (e).

Figura 2. Cariótipo de macho e fêmea de *C. hujeta* com marcadores cromossômicos moleculares. *Double FISH* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) e *FISH* com sonda de (TTAGGG)_n (vermelho).

Figura 3. *Fiber-FISH* mostrando clusters de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) adjacentes e sobrepostos em fêmeas e machos de *Ctenolucius hujeta*.

Capítulo 2

Figura 1. Mapeamento cromossômico do ET *Rex1* em Ctenoluciidae: a) *Boulengerella cuvieri*, b) *B. lucius*, c) *B. maculata*, d) *Ctenolucius hujeta*.

Figura 2. Mapeamento cromossômico do ET *Rex3* em Ctenoluciidae: a) *Boulengerella cuvieri*, b) *B. lateristriga*, c) *B. lucius*, d) *B. maculata*, e) e f) *Ctenolucius hujeta*.

Figura 3. Mapeamento cromossômico do ET *Rex 6* em Ctenoluciidae: a) *Boulengerella cuvieri*, b) *B. lateristriga* e c) *B. maculata*.

Figura 4. Representação esquemática dos eventos de dispersão mediados pelos *Rex1* e *Rex3* nos Ctenoluciídeos. Nas espécies de *Boulengerella* (a) Condição ancestral, par 18 de machos e fêmeas; (b) Com o acúmulo de sequências teloméricas (TTAGGG)_n em associação ao DNAr 18S na região terminal do par 18 torna esta uma região de hotspot cromossômico, concomitantemente ocorre o recrutamento *Rex1* e *Rex3* para esta região; (c) o acúmulo de DNAs repetitivos e ETs induz o processo de heterocromatinização, como mecanismo de defesa, para evitar a transposição de sequências de DNAr 18S mediada pelos *Rex1* e *Rex3* (d) o acúmulo diferencial de sequências repetitivas entre machos e fêmeas induziu a deleção da constrição secundária de um dos homólogos do par 18 nos machos de *Boulengerella*, e no provável silenciamento desta região nas fêmeas, acarretando no heteromorfismo evidenciado nos machos de *Boulengerella*. Em *Ctenolucius hujeta* (a) condição ancestral par 09 em machos e fêmeas de *C. hujeta*; (b) a

localização sintênica dos DNAr 18S e 5S na região terminal do par 09 induziu o recrutamento de ETs em especial os retroelementos *Rex1* e *Rex3* para esta região; (c) a co-localização de *Rex1* e *Rex3* adjacentes a sequências de DNAr 18S na região terminal do par 09 facilita o processo de transposição de sequências do DNAr 18S através do mecanismo copia e cola; (d) ocorre a transposição de sequência de DNAr 18S para região intersticial do braço curto do par 01 e para o braço curto de um dos homólogos do par 12.

Capítulo 3

Figura 1. Cariótipo de machos e fêmeas de *Boulengerella lateristriga*, *B. maculata*, *B. lucius* e *B. cuvieri* submetidos à FISH com a sonda (GATA)₇. Os sinais de (GATA)₇ são mostrados com rodamina (vermelho) e os cromossomos contra corados com DAPI (azul). A barra= 10 μm, no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Figura 2. Mapeamento cromossômico de diferentes microssatélites em *Boulengerella cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*. Placas metafásicas hibridizadas com as sondas microssatélites d(GAG)₁₀; d(CAA)₁₀; d(CAC)₁₀ e d(CAT)₁₀ (vermelho), mostrando o padrão de distribuição colunas (1-4) respectivamente. As setas indicam a localização do par cromossômico (18). A barra= 10 μm, no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Figura 3. Mapeamento cromossômico de diferentes microssatélites em *Ctenolucius hujeta*. Cariótipo macho e fêmea de *C. hujeta* hibridizados com microssatélites d(GATA)₇ (Parte superior). Placas metafásicas de *C. hujeta* hibridizadas com as sondas microssatélites d(GAG)₁₀; d(CAA)₁₀; d(CAC)₁₀; d(CAT)₁₀, respectivamente, mostrando o padrão destes SSR nos cromossomos (Parte inferior). A barra = 10 μm, no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Figura 4. Hibridização genômica comparativa (CGH) intraespecífica de machos e fêmeas de *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*. Primeira coluna imagens DAPI (azul); segunda coluna padrões de hibridização usando gDNA masculino (vermelho), terceira coluna gDNA feminino (verde), quarta coluna contém as imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e coloração com DAPI. As regiões genômicas comuns são representadas em amarelo. As setas indicam o par cromossômico 18. A barra = 10 μm, no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Figura 5. Hibridização genômica comparativa (CGH) interespecífica nas placas metafásicas femininas de *Boulengerella cuvieri* (vermelho) e *Boulengerella* spp. e *Ctenolucius hujeta* (verde). a) *B. cuvieri* e *B. lateristriga*. Primeira coluna imagens DAPI

(azul); segunda coluna padrões de hibridização usando gDNA feminino (vermelho) de *B. cuvieri*, terceira coluna gDNA feminino (verde) de: (a) *B. lateristriga*, (b) *B. maculata*, (c) *B. lucius* e (d) *C. hujeta*, quarta coluna contém as imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e coloração com DAPI. As setas indicam o par cromossômico 18, as regiões genômicas comuns são representadas em amarelo.

Figura 6. WCP com as sondas LEB-1 (verde) e BOU-1 (vermelho) derivadas do par 1 de *Lebiasina bimaculata* e *Boulengerella maculata*, respectivamente, hibridizadas contra cromossomos metafásicos de *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius*, *B. maculata* e *Ctenolucius hujeta*. Barra = 5µm.

Lista de Quadros e Tabelas

Introdução

Quadro 1. Concentração do DNA na PCR para 8 lâminas (volumes em µL).

Quadro 2. Duas sondas marcadas pelo **Kit Roche** de acordo com o número de lâminas (volumes em µL).

Quadro 3. Sonda marcada pelo Kit Roche de acordo com o número de lâminas (volumes em µL).

Quadro 4. Mix *double* FISH de acordo com o número de lâminas (Volume em µL).

Quadro 5. Mix de montagem de acordo com o número de lâminas (Volume em µL).

Capítulo I

Tabela 1. Dados citogenéticos de espécies de Ctenoluciidae. Souza e Sousa *et al.* 2017^a. Arefjev 1990^b.

Capítulo III

Tabela 1. Descrição das espécies, sexo, quantidade de exemplares utilizados e ponto de coleta dos indivíduos analisados.

Lista de Abreviações e Siglas	
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
2n	Número diploide
AgNO ₃	Nitrato de Prata

Ag-RON	Região organizadora de nucléolo
Ba(OH)₂	Hidróxido de bário
Banda-C	Técnica de detecção da heterocromatina constitutiva
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAPI	4',6-diamidino-2-phenilindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA_r	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
dATP	Desoxiadenosina trifosfatada
dUTP	Desoxiuracila trifosfatada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ETs	Elementos transponíveis
FC	Fórmula Cariotípica
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Fluoresceína isotiocianato
HCl	Ácido Clorídrico
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ITS	Sítios teloméricos intersticiais
KCl	Cloreto de potássio
LDS	Locus de determinação do sexo
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
não-LTR	Sem Longas repetições terminais
NF	Número fundamental
p	Braço curto
q	Braço longo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
primers	Oligos iniciadores
Rex	Retroelemento isolado primariamente de <i>Xiphophorus</i>

RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNAr	Ácido Ribonucléico ribossomal
RON	Região organizadora de nucléolo
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

1. Introdução

1.1 A família Ctenoluciidae

Ctenoluciidae é uma família de peixes actinoptérgios de água doce, que atualmente compreende dois gêneros: *Ctenolucius* Gill, 1861, com duas espécies (*C. beani* (Fowler, 1907) e *C. hujeta* (Valenciennes, 1850)) e *Boulengerella* Eigenmann, 1903, com cinco espécies (*B. cuvieri* (Agassiz, 1829), *B. lateristriga* (Boulenger, 1895), *B. lucius* (Cuvier, 1816), *B. maculata* (Valenciennes, 1849) e *B. xyrekes* (Vari, 1995)), as quais apresentam ampla distribuição no continente americano. As espécies de *Ctenolucius* ocorrem a oeste da cordilheira dos Andes, a partir dos rios costeiros do Oceano Pacífico a oeste do Panamá, passando pelos sistemas fluviais do noroeste e norte da Colômbia, até os afluentes da bacia do Lago Maracaibo no noroeste da Venezuela. Já as espécies do gênero *Boulengerella* ocorrem a leste da cordilheira, podendo ser encontradas nas bacias do rio Orinoco, rio Amazonas, rio Tocantins, nos rios costeiros da Guiana Francesa e nos estados brasileiros do Amapá e Pará (Figura 1) (Vari 1995; 2003).

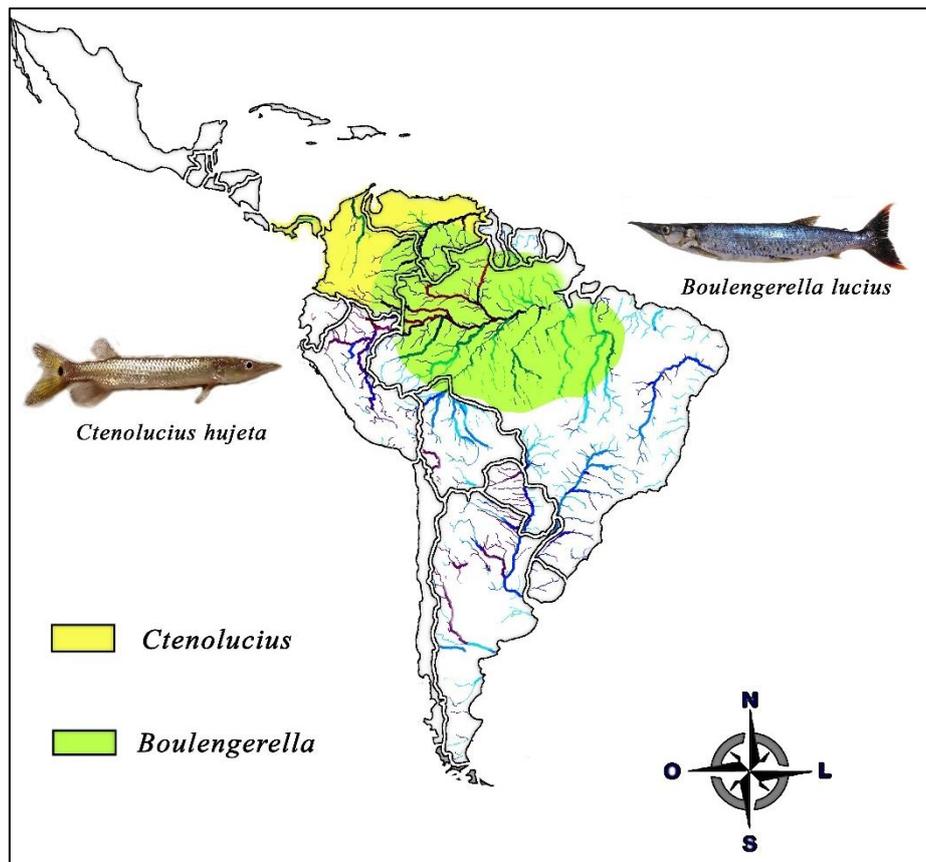


Figura 1. Mapa hidrológico da América do Sul com a distribuição de Ctenoluciidae. Em destaque (amarelo) indica onde espécies de *Ctenolucius* já foram amostradas, e em destaque (verde) corresponde à distribuição das espécies de *Boulengerella*. Fonte: Vari (1995; 2003).

O naturalista francês Georges Cuvier descreveu a primeira espécie da atual família Ctenoluciidae como *Hydrocynus lucius*. O gênero *Hydrocynus* abrigava seis espécies, distribuídas na América do Sul e África, mas que, atualmente, foram alocadas em diferentes famílias de Characiformes (Cuvier, 1816; Greenwood *et al.* 1966 e Vari, 1995). Treze anos após a descrição de *Hydrocynus lucius*, Jean Louis Rodolphe Agassiz propôs a criação de um táxon que abrangia o que hoje são considerados ctenoluciídeos, nomeado *Xiphostoma* em Spix e Agassiz (1829), sendo *Hydrocynus lucius* alocada neste gênero, passando a ser nomeada *Xiphostoma lucius*. Ainda, descreveram uma segunda espécie para o gênero, a qual foi nomeada *Xiphostoma cuvieri*, no entanto, o termo *Xiphostoma* já era usado para designar os Hemípteros (Vari, 1995). Sendo assim, análises taxonômicas subsequentes diferiram sobre quais gêneros e espécies nominais deveriam ser reconhecidos como membros da atual família Ctenoluciidae. Pelo menos cinco gêneros e dez espécies foram propostos, sendo essas divergências taxonômicas em parte, devido às limitações inerentes a muitos dos estudos como a limitação de amostras, o que dificultava uma avaliação fidedigna em relação à validade de várias espécies, que compunham a atual família Ctenoluciidae. Durante a última revisão taxonômica da família, realizada pelo ictiólogo norte-americano Richard P. Vari (1995), apenas uma nova espécie foi descrita para a família a qual foi nomeada *Boulengerella xyrekes*.

Os Ctenoluciídeos são conhecidos por apresentar corpo cilíndrico, nadadeira dorsal localizada na metade posterior do seu corpo, a qual está normalmente sobreposta à linha vertical da origem ou final da nadadeira anal, além de possuírem mandíbula e focinho alongados, motivo pelo qual são popularmente conhecidos como “bicuda” na Amazônia (Vari 1995; Queiroz *et al.* 2014). Essas características corporais fazem dos ctenoluciídeos exímios predadores, podendo preda insetos e/ou pequenos peixes, habitam águas lênticas, de correntezas e rasas, sendo comumente encontrados em águas claras ou negras. Devido ao seu hábito de predador visual, não são adaptados para natação contínua por longos períodos, geralmente atacam suas presas com ataques rápidos, saindo do repouso (também chamado de predação de emboscada ou início rápido), podendo ainda saltar para fora d’água, para aumentar as chances de captura de suas presas ou ainda para fugir de predadores (Queiroz *et al.* 2014; Kogan *et al.* 2015).

Apesar da morfologia bastante conservada na família, os Ctenoluciídeos apresentam diferenças em tamanho, sendo as espécies de *Ctenolucius* de pequeno a médio porte, podendo medir de 23 à 28 cm de comprimento e as espécies de *Boulengerella* de médio

a grande porte, variando de 24 cm em *B. lateristriga* a aproximadamente 1m de comprimento em *B. cuvieri* (Vari, 1995; Buckup *et al.* 2007), estando por esse motivo no ranking dos maiores Characiformes do novo mundo. Espécies de *Boulengerella*, em especial *B. cuvieri*, são comumente caçadas na pesca esportiva, devido seu tamanho e pela capacidade de saltar para fora d'água, sendo que os demais integrantes da família possuem grande importância na pesca artesanal e comercial de subsistência (Santos *et al.* 1984; Castro 1986; Vari 1995; 2003). Ainda, no comércio ornamental, sobretudo as espécies *Ctenolucius hujeta*, *Boulengerella maculata* e *B. lucius* (Queiroz *et al.* 2014).

Apesar de Ctenoluciidae ser um grupo pouco diverso, dados citogenéticos são escassos, limitando-se a Arefjev (1990) e Sousa e Souza *et al.* (2017), os quais verificaram uma conservação do número diploide (2n) para a família, uma vez que cinco das sete espécies da família apresentam um 2n=36 cromossomos. Sousa e Souza *et al.* (2017) observaram um heteromorfismo entre machos e fêmeas, relacionado à constrição secundária, em quatro espécies de *Boulengerella*. Este heteromorfismo foi confirmado pela detecção da região organizadora do nucléolo (Ag-RON), onde as fêmeas apresentam marcações do mesmo tamanho em ambos homólogos e os machos têm sempre uma marcação maior que a outra. O mesmo heteromorfismo também está relacionado à presença de um bloco de heterocromatina C-positiva, detectadas por procedimentos de bandamento C. Ainda em relação a este par cromossômico, nas espécies de *Boulengerella* foi observado um acúmulo incomum de sequências teloméricas em região não terminal, em sintonia com sítios de DNAr 18S (Sousa e Souza *et al.* 2017). Este heteromorfismo entre machos e fêmeas, ligado à constrição secundária foi sugerido pelos autores como indicativo de um provável sistema de cromossomos sexuais nascentes do tipo XX/XY em diferenciação.

1.2 Cromossomos sexuais em peixes

O estudo do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais em peixes amplia nosso conhecimento para além dos detalhes específicos encontrados em vertebrados. A diversidade ecológica e biológica dos peixes nos fornece exemplos únicos de mecanismos de determinação do sexo, podendo ainda ser possível investigação experimental, testar conceitos teóricos, desde mecanismos evolutivos até processos bioquímicos (Delvin e Nagahama 2002).

Os cromossomos sexuais são uma característica comum em eucariotos, especialmente em espécies animais onde o sexo é determinado pela genética (Bachtrog *et al.* 2014). Para que o sexo seja determinado geneticamente, uma alteração, muitas vezes referida como gene mestre determinante do sexo, surge e obtém controle sobre a cascata de determinação do sexo, alteração essa, que pode surgir através de mutação pontual em um gene, eliminando uma função ou criando uma nova função (Kamiya *et al.* 2012; Myosho *et al.* 2012), uma duplicação gênica (Yoshimoto *et al.* 2008 ; Harkess *et al.* 2017), uma deleção (Smith *et al.* 2009) ou mudanças regulatórias (Herpin *et al.* 2010).

O modelo clássico de diferenciação dos cromossomos sexuais proposto por Bull (1983) e Charlesworth (1991) sugere que o processo de diferenciação desses cromossomos se inicia com a inserção de um locus determinante do sexo (LDS) em um dos homólogos, de um par autossômico. A interação do LDS com outros genes antagonistas reduz áreas de homologia entre esses cromossomos e esta supressão induz o surgimento de rearranjos cromossômicos, em regiões sexo-determinante (Bachtrog, 2006). Estes rearranjos fazem com que mutações adicionais promovam a amplificação de sequências de DNAs repetitivos, induzindo a heterocromatinização do cromossomo Y (ou W) e, por consequência, o surgimento de mutações deletérias que promovem a degeneração deste cromossomo, promovendo a sua diferenciação morfológica (Charlesworth e Charlesworth 1997; Charlesworth *et al.* 2005; Bachtrog 2006).

Devido à degeneração e perda desse gene, o cromossomo Y (ou cromossomo W) compartilha poucas regiões homólogas com o cromossomo X (ou cromossomo Z), dificultando o pareamento desses cromossomos durante a meiose. Para compensar a perda dessas regiões homólogas, a célula utiliza regiões de recombinação conhecidas como regiões pseudo-autossômicas, isso evita o desequilíbrio causado pela perda do conteúdo genético do cromossomo Y (ou W), facilitando o alinhamento desses cromossomos durante a fase meiótica e evitando que mutações se originem devido erros durante a divisão celular entre essas regiões de homologia (Mangs e Morris 2007; Veerappa *et al.* 2013).

Cromossomos sexuais heteromórficos, originados a partir de um par de autossomos homólogos, já foram observados em mamíferos (Lahn e Page 1999), serpentes (Vicoso *et al.* 2013), aves (Wright *et al.* 2012; 2014) e peixes (Kamiya *et al.* 2012; Natri *et al.* 2013), sendo confirmados pela análise do conteúdo gênico compartilhado entre os cromossomos (X–Y) e (Z–W), os quais mostraram ser ortólogos,

ou seja derivaram de um ancestral comum por um evento de especiação. Embora, em algumas espécies, a origem dos cromossomos sexuais heteromórficos realmente segue o modelo proposto por Bull (1983) e Charlesworth (1991), evidências crescentes apontam que alguns sistemas surgem de forma independente, não compartilhando ancestralidade (Furman *et al.* 2020).

A ictiofauna Neotropical de água doce é considerada a mais diversificada e rica em número de espécies do mundo, representando 10% das espécies de vertebrados conhecidos (Vari e Malabarba, 1998; Albert *et al.* 2011). Corroborando esta diversidade, estudos citogenéticos nesta fauna vêm evidenciando grande diversidade cromossômica, como polimorfismos, poliploidia, cromossomos supranumerários, diferentes sistemas de cromossomos sexuais, entre outros (Oliveira *et al.* 2009). Somado a essa diversidade, em peixes temos uma grande variedade de sistemas de cromossomos sexuais, sendo, atualmente, nove sistemas descritos: XX/XY , $XX/X0$, ZZ/ZW , $ZZ/Z0$, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 , $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$, $X_1X_1X_2X_2/X_1Y_1X_2Y_2$ e ZZ/ZW_1ZW_2 (revisado em Sember *et al.* 2021). Vale ressaltar que cromossomos sexuais heteromórficos foram evidenciados em apenas 6% das espécies de peixes Neotropicais, analisadas citogeneticamente (Sember *et al.* 2021).

O componente genético que leva a efeitos variáveis na determinação do sexo em peixes não é totalmente conhecida, mas é sabido que em cromossomos sexuais heteromórficos (W ou Y) é comum evidenciar a associação de DNAs repetitivos (Volf *et al.* 2007; Vicari *et al.* 2008; Yano *et al.* 2014), sendo estes, frequentemente observados totalmente ou parcialmente heterocromáticos e menor que o cromossomo Z ou X, devido a processos de degeneração que ocorrem ao longo da evolução deste cromossomo (Bachtrog 2013). O mapeamento de sequências de DNAs repetitivos em cromossomos sexuais vem ampliando nosso conhecimento em relação à origem, evolução e composição dos diversos sistemas de cromossomos sexuais evidenciados em peixes.

1.3 DNAs repetitivos como ferramenta para estudos evolutivos

DNAs repetitivos são sequências de DNA que se repetem várias vezes no genoma, constituindo grandes frações que foram consideradas como DNA egoísta (Orgel e Crik 1980) ou DNA “lixo” (Schmidt e Heslop-Harrison 1998) por não apresentarem funções biológicas determinadas. Essas sequências vêm sendo amplamente estudadas em diferentes táxons e contribuindo para uma melhor compreensão da complexidade do

genoma, sendo associadas a algumas doenças (Kazazian *et al.* 1988), no reparo e regulação de alguns genes (Messier *et al.* 1996), na diferenciação de cromossomos sexuais, entre outros (Parise-Maltempo *et al.* 2007; Pokorná *et al.* 2011; Terencio *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2013a; b).

DNAs repetitivos são subdivididos em duas classes: dispersos no genoma (representado pelos elementos transponíveis (TEs) e organizados *in tandem* formado por DNAs satélites, minissatélites e microssatélites, e além de famílias multigênicas como os DNAs ribossomais (DNAr) e as histonas (Walsh e Stephan 2001; Sumner 2003).

Em peixes, as famílias multigênicas mais estudadas são as ribossomais 45S e 5S. A família 45S transcreve os RNAs 18S, 5,8S e 28S, que estão separados por um espaçador transcrito (ITS) e a unidade que transcreve o RNA 5S separado por um espaçador não transcrito (NTS) (Long e Dawid 1980). Essas sequências têm sido amplamente utilizadas na citogenética de peixes, contribuindo na identificação de cromossomos específicos, cromossomos homólogos, rearranjos cromossômicos e cromossomos sexuais (Gornung, 2013).

As sequências denominadas satélites, minissatélites e microssatélites são classificadas conforme o número de repetições de pares de bases que apresentam (Jurka *et al.* 2003). Haaf *et al.* (1993) foram os pioneiros na descrição de DNA satélite em Actinopterygii, essas sequências são frequentemente evidenciadas em regiões telomérica e centromérica, desempenhando importante papel na formação e estruturação dos centrômeros (Ferree e Prasad 2012). Análises filogenéticas em diferentes grupos de peixes, utilizando sequências repetitivas, têm auxiliado na resolução de complexo de espécies (Mantovani *et al.* 2004; Vicari *et al.* 2008; Kantek *et al.* 2009), na determinação da origem de cromossomos supranumerários (Mestriner *et al.* 2000; Ziegler *et al.* 2003; Artoni *et al.* 2006) e na caracterização e diferenciação dos cromossomos sexuais (Centofante *et al.* 2002; Vincente *et al.* 2003; Vicari *et al.* 2006; Yano *et al.* 2017).

Os minissatélites, também conhecidos como repetições de sequência simples, são sequências de aproximadamente 10 a 60pb, ricas em GC, abundantes no genoma eucarioto, sendo comumente localizados em regiões heterocromáticas (telômeros, centrômeros e cromossomos sexuais) em genomas de peixes (Vanzela *et al.* 2002; Cioffi *et al.* 2011; Terencio *et al.* 2013; Yano *et al.* 2017).

Os microssatélites, por sua vez, são repetições dinucleotídicas de 1 a 5 pb em tandem, formados em grande parte por AC (Chistiakov *et al.* 2006), apresentam uma alta

taxa de mutação, quando comparados com outras partes do DNA, sendo um excelente marcador no estudo de ancestralidade, localizando-se, preferencialmente, nos telômeros, centrômeros e em cromossomos sexuais (Cioffi e Bertollo 2012). Em *Poecilia reticulata*, por exemplo, foi possível detectar o microsatélite (GACA)_n na região heterocromática do cromossomo Y desse grupo (Nanda *et al.* 1990); entre os Erythrinidae pelo menos 12 classes de microsatélites já foram identificadas, as quais mostram sinais fortes nos cromossomos sexuais de espécies dessa família (Cioffi *et al.* 2011). A distribuição de 6 microsatélites em *Semaprochilodus taeniurus* foi abundante nos cromossomos sexuais, sendo esta observação interessante porque ela reflete o grau de degradação genética na diferenciação do cromossomo proto-sexual, que evoluiu para o par heteromórfico ZW, encontrado nesta espécie (Terencio *et al.* 2013)

Os elementos transponíveis são conhecidos pela sua capacidade de se mover pelo genoma, podendo criar cópias de si mesmos durante o processo de mobilização, e se inserir em novas regiões, podendo induzir a formação de polimorfismos cromossômicos, duplicações, deleções, variação na estrutura e expressão de genes (Orgel e Crick 1980; Oliver e Greene 2009; Cioffi e Bertollo 2012). Os elementos transponíveis estão divididos em duas classes, que diferem no mecanismo de transposição: classe I (retrotransposon) e Classe II (transposon) (Finnegan 1989; Wicker *et al.* 2007; Kapitonov e Jurka 2008; Piégu *et al.* 2015).

Os retrotransposons se caracterizam por usarem uma molécula de RNA para originar uma fita de DNA, por meio da transcriptase reversa e usar a enzima integrase para inserir a nova fita no genoma, em um mecanismo conhecido como “copia e cola”, responsável por inserir cópias do retroelemento no genoma (Bohene *et al.* 2008). Existem dois tipos principais de retrotransposons, repetições terminais longas (LTRs) e repetições terminais não longas (não-LTRs) classificados com base na sequência e no método de transposição (Eickbush e Jamburuthugoda 2008).

Os retrotransposons LTR possuem extensas repetições nas extremidades 5' e 3' que flanqueiam a sequência central, conhecida como fase de leitura aberta (ORF), responsável pela síntese de proteínas necessárias para a transcrição e integração da sequência de cDNA, após a transcrição reversa. Já, as sequências não-LTR utilizam promotores internos para promover a transposição, sendo subdivididos em *LINES* (Elementos Intercalados Longos), que se caracterizam pela capacidade de transcrever inversamente uma molécula de RNA na dupla fita de DNA durante sua locomoção, a qual

é inserida no genoma através da enzima integrase (Levin e Moran 2011) e *SINEs* (Elementos Intercalados Curtos), que diferem dos *LINEs* pelo comprimento e por não apresentam regiões codificantes, mas, adquirem a maquinaria enzimática necessária para a transposição por meio dos *LINES* (Bohne *et al.* 2008).

Os ETs do tipo *Rex* (*Rex1*, *Rex3*, *Rex6*), correspondem a elementos não-LTR mais abundantes entre os peixes, descritos no genoma de espécies de *Xiphophorus* (Volf *et al.* 1999; 2000; 2001). Embora esses três retrotransposons sejam geralmente analisados juntos, nenhuma evidência foi relatada sobre sua relação evolutiva. O *Rex1* está intimamente relacionado ao clado *CR1* dos elementos LINE e aos elementos *Babar* de *Batrachocottus baikalensis* e possui como principal característica sequências de codificação de endonuclease apurínica / apirimidínica (AP) localizadas a montante (ou a jusante) do domínio de codificação RT (Volf *et al.* 2000). O *Rex3* pertence à família RTE de retroelementos do tipo não-LTR e possui como característica padrão a presença de domínios da Transcriptase Reversa (RT), sem regiões flanqueadoras LTR (Volf *et al.* 1999). *Rex6* é membro da família *R4* especializada na inserção de genes de RNAr, é um retroelemento não-LTR, que possui em sua estrutura uma RT e uma endonuclease semelhante a uma enzima de restrição (Volf e Schartl 2001).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar citogeneticamente espécies da família Ctenoluciidae, para entender as modificações cromossômicas/genômicas ocorridas em sua evolução e verificar a ocorrência de um provável sistema sexual (XX/XY), sugerido por Sousa e Souza *et al.* (2017) para espécies de *Boulengerella*.

2.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar citogeneticamente espécies de Ctenoluciidae ainda não estudadas e comparar com dados disponíveis para *Boulengerella* e outros Characiformes.

b) Mapear, em cromossomos metafásicos, classes distintas de DNAs repetitivos, identificando possíveis acúmulos que estejam relacionados ao processo de diferenciação cariotípica em espécies de Ctenoluciidae.

c) Realizar análises de genômica comparativa entre machos e fêmeas de Ctenoluciidae e entre os gêneros a partir de técnicas de biologia molecular, identificando possíveis diferenças cromossômicas, presença ou ausência de regiões sexo-específicas, bem como dados acerca dos processos evolutivos desta família.

3. Material e Métodos

3.1. Material

Foram estudados, citogeneticamente, machos e fêmeas de cinco espécies de Ctenoluciidae. As espécies de *Boulengerella* foram coletadas ao longo da bacia amazônica: *B. lateristriga* (7 machos, 7 fêmeas), coletados em Novo Airão (2°37'28.5"S, 60°58'16.8"W); *B. cuvieri* (6 machos, 8 fêmeas), coletados no Rio Negro, próximo ao lago Catalão (3°10'30.8"S, 59°56'30.3"W); *B. maculata* (7 machos, 8 fêmeas), coletados no Rio Negro, próximo ao lago Catalão e em Anavilhanas (2°33'28.4"S, 60°46'29.7"W); *B. lucius* (6 fêmeas e 6 machos), coletadas à jusante da hidrelétrica de Balbina, no rio Uatumã (1°55'02.2"S, 59°28'23.7"W). Os exemplares de *C. hujeta* (6 machos e 4 fêmeas) foram obtidos no comércio de aquários. Todos os espécimes foram depositados como comprovantes na Coleção de Peixes do INPA seguindo as seguintes numerações: *Boulengerella* (INPA-ICT 053246, 053247, 053248, 053249, e 053250) *Ctenolucius* (INPA-ICT 059514).

3.2. Métodos

3.2.1. Indução de mitoses

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais, uma vez que este tecido possui função hematopoiética nos peixes, ou seja, apresentam células em constante divisão. Para estimular e aumentar o número de células em divisão celular injetamos solução de fermento biológico na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 20mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi incubada em estufa a 40°C por cerca de 20 minutos. Após esse período, com a solução em temperatura ambiente, injetamos 1mL para cada 100g de peso vivo desta solução na região intraperitoneal do animal.

3.2.2. Obtenção dos cromossomos mitóticos

Os peixes foram mantidos em aquários aerados e após 12h de estimulação, foram eutanasiados em uma solução de Eugenol 10%, seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013), para coleta dos tecidos para análise citogenética. A seguir os passos do protocolo de Gold *et al.* (1990) consistiram em:

1. Retirar porções dos rins anterior e posterior com auxílio de pinças e transferir para uma cubeta de vidro contendo 8mL de meio RPMI 1640 CultLab®.
2. Com auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, os tecidos foram dissociados com movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células.
3. Foi adicionado 100µL de colchicina 0,025% para cada 2mL de meio de cultura e o material foi ressuscitado cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur.
4. A suspensão foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos.
5. Após esse período, com auxílio de uma pipeta Pasteur, a suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada por 10 minutos a 1250rpm.
6. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não ressuspender o material (*pellet*) e foi acrescentado cerca de 10mL de solução de KCl 0,075M, o material foi ressuscitado e levado à estufa 37°C por 50 minutos.
7. Passado o período de hipotonização o material foi ressuscitado e a ele foi adicionado 1,5mL de fixador Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) e então centrifugado por 10 minutos a 1250rpm.
8. O sobrenadante foi novamente descartado com auxílio de uma pipeta Pauster, tomando cuidado para não ressuspender o material e foram acrescentados 8 mL de fixador Carnoy, a solução foi ressuscitada e centrifugada por 10 minutos a 1250rpm.
9. O passo 8 foi repetido mais 2 vezes (dependendo da quantidade de material).
10. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação foi adicionado 1,5mL de fixador Carnoy e ressuscitado o material, a solução foi transferida para frascos plásticos do tipo *eppendorf*, e armazenados em freezer a -20°C.

3.2.3. Detecção das Regiões Organizadoras do Nucléolo-RON

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON) foi utilizada a técnica de precipitação de cristais de Prata (Ag-RON), descrita por Howell e Black (1980), com pequenas modificações:

1. Pingar sobre a lâmina, contendo a preparação cromossômica, 2 a 3 gotas de solução coloidal de gelatina (1g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 50mL de água destilada e acrescida de 0,5mL de ácido fórmico).
2. Para cada gota de gelatina, pingar duas gotas de solução aquosa de AgNO_3 (nitrato de prata) a 50%.
3. Cobrir a lâmina com lamínula.
4. Incubar em câmara úmida na estufa a 60°C , por um período de 5 a 8 minutos.
5. Após o tempo apropriado, quando a lâmina atingir uma coloração marrom dourada, lavar em água destilada, permitindo que a lamínula seja retirada naturalmente pela própria água.
6. Deixar secar ao ar.
7. Corar e analisar no microscópio

3.2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda-C)

Para análise da heterocromatina foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com as seguintes adaptações:

1. Incubar as lâminas em ácido clorídrico (HCl) 0,2N a 42°C , por 2 minutos.
2. Lavar rapidamente em água destilada, à temperatura ambiente para remover o HCl.
3. Deixar secar.
4. Incubar as lâminas, por 35 segundos, em solução de hidróxido de bário a 5%, filtrada e recém preparada a 42°C .
5. Interromper a ação do hidróxido de bário, imergindo rapidamente as lâminas em solução de HCl 0,2N (temperatura ambiente) e lavar em água destilada.
6. Deixar secar.
7. Incubar as lâminas em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60°C , por um período de 30 minutos.
8. Lavar várias vezes em água destilada e secar ao ar.
9. Corar com solução de iodeto de Propídio (20 μL de antifade e 1 μL de iodeto), após 25 min conforme Lui *et al.* (2012). Analisar em microscópio.

3.2.5. Extração de DNA total

A extração de DNA foi realizada a partir do protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações, utilizando o Kit de extração Wizard® (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Consistiu em:

1. Preparar um mix, contendo EDTA + Nuclei Lysis Solution (60µL de EDTA 0,5M + 250 µL de Nuclei Lysis Solution) em tubo falcon tipo *eppendorf* e deixar no freezer por pelo menos 10min, até ficar turvo.
2. Dissociar aproximadamente 20mg de tecido muscular e transferir para um tubo tipo *eppendorf* estéril de volume de 1,5mL.
3. Após dissociar e secar o tecido, adicionar 300µL da solução preparada no passo 1 acrescida de 15µL de proteinase K (10ng/µL), homogeneizar e levar ao termo bloco a 55°C por cerca de 3h, sob agitação de 1100rpm até dissolver todo o tecido.
4. Após o tecido ser dissolvido, adicionar 100µL de Protein Precipitation Solution, homogeneizada em vórtex por 30s até ficar espumante e levar ao freezer por 5 min.
5. Passados os 5 min, homogeneizar a solução e centrifugar por 10 min à 13000rpm a 4°C.
6. Retirar o sobrenadante (que contém o DNA) com auxílio de uma micropipeta e transferir para novos tubos tipo *eppendorf*; adicionar 300µL de isopropanol gelado, homogeneizar a solução e centrifugar por 10 min a 13.000 rpm a 4°C.
7. Descartar o sobrenadante, que contém o isopropanol, pois o material de interesse (DNA) está em forma de *pellet*, adicionar 300µL de etanol 70% gelado, homogeneizar e centrifugar por 10 min a 13.000 rpm a 4°C.
8. Descartar o máximo de sobrenadante possível, com cuidado para não descartar o DNA (*pellet*), levar os tubos *eppendorf* à estufa a 37°C por aproximadamente 15 min., até todo etanol evaporar.
9. Por fim, adicionar 50µL de água miliQ, homogeneizar e deixar *overnight* a 4°C.

3.2.6. Isolamento de sequências repetitivas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para obtenção de sondas de DNAr 5S e 18S foi utilizado o DNA genômico, extraído do músculo das espécies analisadas de Ctenoluciidae. As sondas foram obtidas

por amplificação por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme Saiki *et al.* (1988), utilizando os *primers*:

- a) **DNAr 5S**: f (5' -TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5S r (5' – CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3') (Martins e Galetti 1999).
- b) **DNAr 18S**: f (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT- 3') e 18S r (5'-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010).

Sondas de DNA telomérico (TTAGGG)n

A sonda de DNA telomérico (TTAGGG)n foi obtida por PCR, utilizando os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅, na ausência de um DNA molde (Ijdo *et al.* 1991).

Mapeamento de microssatélites

Os seguintes microssatélites foram utilizados como sondas: d(GATA)₇, d(CAC)₁₀, d(CAA)₁₀, d(CAT)₁₀, e d(GAG)₁₀. Essas sequências foram marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, por VBC-Biotech (Viena, Áustria), segundo Kubat *et al.* (2008).

Sondas de Retroelementos

- a) **Rex1**: f (5' - TTCTCCAGTGCCTTCAACACC) e *Rex1*: r (5' -TCCCTC AGC AGA AAG AGT CTGCTC) (Volff *et al.* 2000).
- b) **Rex3**: f (5'CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG) e *Rex3*: r (5'TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volff *et al.* 1999).
- c) **Rex6**: f (5-TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC-3) *Rex6*: r (5-GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG-3) (Volff e Scharl 2001).

Hibridização *in situ* por fluorescência - FISH

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi realizada, seguindo protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986).

Marcação da Sonda - Kit DIG-Nick™ Translation Mix (Roche) e Kit BIO-Nick™ Nick Translation Mix (Roche)

A utilização do Kit Roche nos permite marcar a sonda com os anticorpos anti-digoxigenina que evidencia em coloração vermelha e FITC ou Estreptavidina que evidencia em cor verde. O mix para marcação da sonda leva em consideração a concentração do DNA obtido no passo 3.2.5. O Quadro 1 descreve um mix para 8 lâminas a ser usado na marcação da sonda, em função da concentração do DNA obtido na PCR.

Quadro 1. Concentração do DNA na PCR para 8 lâminas (volumes em µL).

	200 ng	300 ng	400 ng	500-600 ng	700 ng	1500ng
DNA (PCR)	7µL	5µL	4µL	3µL	2µL	1µL
H₂O	9µL	11µL	12µL	13µL	14µL	15µL
dNTP mix	4µL	4µL	4µL	4µL	4µL	4µL

O mix deve ser homogeneizado e incubado por 90 minutos a 16°C no termociclador. Em seguida, adicionar 2µL de EDTA 0,5M (para 8 lâminas), centrifugar rapidamente e colocar no freezer -20°C até usar.

Preparação cromossômica (FISH simples ou *double FISH*)

Tratamento das lâminas

1. Incubar as lâminas em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N (temperatura ambiente) por 2 min [descartar].
2. Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente (shaker) [descartar].
3. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar).
4. Incubar as lâminas em 90µL de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1h em câmara úmida. Solução RNase para 8 lâminas (5µL de RNase 10mg/mL e 975µL de 2xSSC).
5. Lavar 3x por 5 min em 2xSSC [descartar].
6. Lavar durante 5 min em PBS 1x [descartar].

Fixação

7. Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 min à temperatura ambiente [descartar]. Solução de formaldeído (10mL de PBS 10x, 5mL de MgCl₂ (1M), 1mL de formaldeído e completar para 100mL com água destilada).
8. Lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker) [descartar].
9. Desidratar as lâminas por 5 min em série alcoólica (70, 85 e 100%).

Pré-hibridização

10. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 3,30 min (Só aquecer a formamida na hora do uso). A água do banho maria deve estar na altura do frasco com a formamida. Após o uso, a formamida retorna ao tubo para ser reutilizada. Solução Formamida 70% (70mL de formamida, 30mL de 2xSSC).

11. Após a desnaturação, as lâminas são desidratadas em série alcoólica (70, 85 e 100%) durante 5 min cada.

Solução de hibridização

Para preparar a solução de hibridização para oito lâminas foram pipetados os seguintes componentes em um tubo de *ependof* 1,5 ml (ver valores Quadro 2). Após pipetar todos os componentes, o mix foi homogeneizado e levado ao Thermo Shaker à 99°C por 10 minutos, para realizar a desnaturação da sonda; passado os 10min., a solução foi passada imediatamente para o gelo e mantida em freezer até o momento do uso.

Solução de hibridização com duas sondas

Quadro 2. Duas sondas marcadas pelo **Kit Roche** de acordo com o número de lâminas (volumes em µL).

Número de lâminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Formamida 100%	25µL	50µL	75µL	100µL	125µL	150µL	175µL	200µL	225µL	250µL
Sulfato de dextrano 50%	10µL	20µL	30µL	40µL	50µL	60µL	70µL	80µL	90µL	100µL
Sonda 1 ROCHE	2,5µL	5µL	7,5µL	10µL	12,5µL	15µL	17,5µL	20µL	22,5µL	25µL
Sonda 2 ROCHE	2,5µL	5µL	7,5µL	10µL	12,5µL	15µL	17,5µL	20µL	22,5µL	25µL
20xSSC	5µL	10µL	15µL	20µL	25µL	30µL	35µL	40µL	45µL	50µL
H₂O	5µL	10µL	15µL	20µL	25µL	30µL	35µL	40µL	45µL	50µL

Solução de hibridização com uma sonda

Quadro 3. Sonda marcada pelo **Kit Roche** de acordo com o número de lâminas (volumes em µL).

LÂMINAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Formamida 100%	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	175 µl	200 µl	225 µl	250 µl
Sulfato de dextrano 50%	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl	100 µl
Sonda ROCHE	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl	12,5 µl	15 µl	17,5 µl	20 µl	22,5 µl	25 µl

20xSSC	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl	30 µl	35 µl	40 µl	45 µl	50µl
H₂O	7,5 µl	15 µl	22,5 µl	30 µl	37,5 µl	45 µl	52,5 µl	60 µl	67,5 µl	75µl

Hibridização

Deve-se pipetar 40µL da solução de hibridização sobre uma lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula. As lâminas com o material voltado para baixo devem ser mantidas em câmara úmida a 37°C *overnight*.

Segundo dia

Lavagens

12. Lavar 1 vez em solução 2XSSC à 42°C durante 5 minutos (Shaker) [descartar].
13. Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução Tween 0,5%, temperatura ambiente (Shaker) [descartar]. Solução de Tween 0,5% (200 ml de 20xSSC pH 7,0, 500 µL de Tween 100% e completar para 1L com água destilada).

Detecção do sinal

14. Incubar as lâminas em tampão NFDM por 15 minutos (não balançar). Solução de NFDM 50 mL (10 mL de 20xSSC pH 7,0, 2,5 g de leite em pó sem gordura e completar para 50 mL com água destilada).
15. Lavar 2x com Tween 5% temperatura ambiente por 5 minutos (Shaker) [descartar].

Para a FISH com duas sondas, fazer um mix para 8 lâminas contendo (2µL de estreptavidina + 998µL NFDM). Para cada lâmina usa-se 20µL de anti-digoxigenina rodamina (1:200) e 100µL da solução (estreptavidina + NFDM) como mostra o Quadro 4.

Quadro 4. Mix *double* FISH de acordo com o número de lâminas (Volume em µL).

Número de Lâminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anti digoxigenina-rodamina	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
estreptavidina + NFDM	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000

Após preparo do mix, colocar sobre a lamínula 100 μ L do mix (antidigoxigenina + estreptavidina/NFDM), inverter a lâmina sobre a lamínula e incubar em câmara úmida à 37°C por 60 minutos.

16. Após o tempo de hibridização deve-se retirar a lamínula com água destilada e lavar as lâminas em solução com Tween 0,5% 3 vezes por 5 minutos (Shaker) em temperatura ambiente [descartar].
17. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada. Ao final, esperar secar.

Montagem

18. Montar a lâmina com solução contendo (20 μ L de antifade + 1 μ L de DAPI) para cada lâmina e cobrir com lamínula, como mostra o Quadro 5.

Quadro 5. Mix de montagem de acordo com o número de lâminas (Volume em μ L).

Número de lâminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antifade	20 μ L	40 μ L	60 μ L	80 μ L	100 μ L	120 μ L	140 μ L	160 μ L	180 μ L	200 μ L
DAPI	1 μ L	2 μ L	3 μ L	4 μ L	5 μ L	6 μ L	7 μ L	8 μ L	9 μ L	10 μ L

Colocar sobre cada lâmina 21 μ L do meio de montagem.

3.2.7 Classificação dos cromossomos e análises cromossômicas

Para a determinação do número e morfologia dos cromossomos foi utilizada a coloração convencional por Giemsa. A classificação cromossômica seguiu a proposta por Levan *et al.* (1964), adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB): RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m); RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm); RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st); RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a). Para o cálculo do número fundamental (NF), número de braços cromossômicos, os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados como portadores de dois braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos como portadores de apenas um braço.

As preparações convencionais (Giemsa, banda C e Ag-RONs) foram analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes. As lâminas de FISH e fluorocromos foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro apropriado. As melhores metáfases foram capturadas, utilizando sistema de captura de

imagens DPController e processadas pelo programa DPManager. Posteriormente, os cariótipos foram montados, utilizando o programa Adobe Photoshop CS3.

3.2.8 Hibridização genômica comparativa (CGH)

A técnica de CGH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Symonová *et al.* (2015), realizando comparações intra-específicas entre machos e fêmeas das quatro espécies de *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*). Para isso utilizamos os DNAs genômicos correspondentes a machos e fêmeas de cada espécie, obtidos de acordo com protocolo descrito no item 3.2.5. e marcamos o gDNA dos machos com Spectrum Orange-dUTP e das fêmeas com Spectrum Green-dUTP, utilizando Kit Atto.

Para o bloqueio de sequências repetitivas foi utilizado o C0t-1 DNA em todos os experimentos, o qual corresponde à fração de gDNA enriquecida para sequências alta e moderadamente repetitivas, preparado conforme Zwick *et al.* (1997). O mix final para cada lâmina foi composto de 500ng de gDNA de machos, 500ng de gDNA das fêmeas e 15µg de C0t-1 DNA. As sondas foram precipitadas com etanol, seguido da mistura dos *pellets* secos com um buffer de hibridização, contendo formamida 50%, 2xSSC, dodecil sulfato de sódio 10%, sulfato dextrano 10% e buffer Denhardt's (1% Ficoll, 1% polivinilpirrolidona e 1% albumina do soro bovino) com pH corrigido para 7,0.

3.2.9 Microdissecção cromossômica, preparo das sondas e experimentos de Zoo-FISH

O maior par cromossômico (par 1) de *Boulengerella maculata* e *Lebiasina bimaculata* (espécie pertencente a família Lebiasinidae, grupo irmão de Ctenoluciidae) foram microdissectados e utilizados como sondas em análises de pintura cromossômica. Assim, estes cromossomos foram microdissectados a partir de cerca de 20 metáfases de fêmeas, utilizando a metodologia descrita por Yang *et al.* (2009), com pequenas modificações. Os cromossomos foram amplificados em uma solução contendo 100mM de dNTPs, 5mM de *primer* DOP GMW (5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') e tampão de diluição Sequenase (24mM Tris HCl, pH 7,5, 12mM MgCl₂, 30mM NaCl). O processo de amplificação foi realizado em um termociclador (Axygen Therm-1000). Os oito primeiros ciclos de amplificação foram realizados, utilizando a DNA polimerase T7 (USB, Cleveland, EUA), com o seguinte programa: 90 °C /1 min; 25 °C /2 min; 34 °C /2

min. Um passo inicial de desnaturação a 92 °C, por 5 min, foi adicionado a cada ciclo para inativar a atividade da proteinase K; 0,3U de Sequenase foi adicionada a cada ciclo durante a etapa de reanelamento. Em seguida, foram adicionados 50µL de um mix contendo 0,1U Taq polymerase, 0,2mM dNTPs, 20µM DOP primer, 25mM MgCl₂ e 34,23µL de água para PCR, e 33 ciclos de amplificação foram realizados com o seguinte programa: 92 °C /1 min; 56 °C /2 min; 72 °C /2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Posteriormente, ambas as sondas dos cromossomos foram marcadas por PCR. A sonda do cromossomo 1 de *L. bimaculata* (LEB1) foi marcada com Spectrum-Green dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) e a sonda do cromossomo 1 de *B. maculata* (BOU1) com Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove, EUA), em 30 ciclos de DOP-PCR, utilizando 1µL dos produtos iniciais de amplificação por DOP-PCR (Yang *et al.* 2009). Os experimentos de Zoo-FISH foram realizados de acordo com protocolo descrito por Yano *et al.* (2017).

Resultados e Discussão

Os resultados e discussão desta tese são apresentados em três capítulos, em forma de artigos científicos:

Capítulo 1. Análise cromossômica em *Ctenolucius hujeta* Valenciennes, 1850 (Characiformes): Uma nova peça na evolução cromossômica de Ctenoluciidae.

Capítulo 2. Mapeamento cromossômico de elementos transponíveis e sua implicação no processo de evolução cromossômica em Ctenoluciidae.

Capítulo 3. DNAs repetitivos e sua contribuição para evolução cariotípica da família Ctenoluciidae (Characiformes).

Capítulo 1. Análise cromossômica em *Ctenolucius hujeta* Valenciennes, 1850 (Characiformes): Uma nova peça na evolução cromossômica de Ctenoluciidae.

Publicado no periódico Cytogenetic Genome Research

DOI: 10.1159/000515456

Cytogenetic
and Genome
Research

Original Article

Cytogenet Genome Res
DOI: 10.1159/000515456

Received: August 25, 2020
Accepted: February 25, 2021
Published online: June 14, 2021

Chromosomal Analysis of *Ctenolucius hujeta* Valenciennes, 1850 (Characiformes): A New Piece in the Chromosomal Evolution of the Ctenoluciidae

José Souza^a Erika Guimarães^a Vanessa Pinheiro-Figliuolo^a Marcelo B. Cioffi^b
Luiz A.C. Bertollo^b Eliana Feldberg^a

^aLaboratory of Animal Genetics, National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil; ^bDepartment of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

Keywords

Neotropical fish fauna · Fiber-FISH · FISH · rDNA synteny · Pike characins

Abstract

Ctenoluciidae (Characiformes), a family of freshwater fishes, comprises 2 genera, *Ctenolucius* and *Boulengerella*, with 7 recognized species. Up to now, only species of the genus *Boulengerella* have been subjected to cytogenetic studies. Here, we investigated the karyotype and other cytogenetic features of pike characin, *Ctenolucius hujeta*, using conventional (Giemsa staining, C-banding, Ag-NOR staining) and molecular (rDNA, telomeric sequences, and fiber-FISH mapping) procedures. This species has a diploid chromosome number of $2n = 36$, and a karyotype composed of $12m + 20sm + 4a$ and $FN = 68$, similar to that found in *Boulengerella* species. However, differences regarding the number and distribution of several chromosomal markers support a distinct generic status. Colocalization of the 18S and 5S rDNA genes is an exclusive characteristic of the *C. hujeta* genome,

with an interspersed distribution in the chromosomal fiber, an unusual phenomenon among eukaryotes. Additionally, our results support the view that Ctenoluciidae and Lebiainidae families are closely related. © 2021 S. Karger AG, Basel

Introduction

Members of the fish family Ctenoluciidae (Teleostei, Characiformes) are popularly known as pike characins, since they have a characteristically elongated snout and lower jaw. They are widely distributed in rivers and lakes in Brazil, Panama, Colombia, and Venezuela [Vari, 1995, 2003; Queiroz et al., 2014]. The family contains 7 recognized species, distributed in 2 genera: *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius*, *B. maculata*, and *B. xyrekes*) and *Ctenolucius* (*C. hujeta* and *C. beani*) [Vari, 1995, 2003]. *C. hujeta* is a medium-sized predator, reaching up to 25 cm in total length as an adult [Vari, 1995]. According to Vari [1995, 2003], the split of the 2 Ctenolu-

karger@karger.com
www.karger.com/cgr

© 2021 S. Karger AG, Basel

Correspondence to:
José Souza, sousa.josef@gmail.com

Karger

Downloaded by: J. Souza - 410814
200.128.158.1 - 6/15/2021 4:05:15 PM

Resumo

Ctenoluciidae (Characiformes) é uma família de peixes de água doce, que compreende dois gêneros (*Ctenolucius* e *Boulengerella*), com sete espécies reconhecidas. Até agora, apenas espécies do gênero *Boulengerella* foram submetidas a estudos citogenéticos. Aqui, investigamos o cariótipo e outras características citogenéticas do *Pike characin*, *Ctenolucius hujeta*, usando procedimentos convencionais (coloração Giemsa, banda C, Ag-RON) e moleculares (DNAr, sequências teloméricas e mapeamento *fiber-FISH*). Esta espécie possui um número cromossômico diploide de 36, um cariótipo composto por 12m + 20sm + 4a e NF = 68, semelhante ao encontrado nas espécies de *Boulengerella*. No entanto, diferenças em relação ao número e distribuição de vários marcadores cromossômicos suportam um status genérico distinto. A co-localização dos genes DNAr 18S e 5S é uma característica exclusiva do genoma de *C. hujeta*, com uma distribuição intercalada na fibra cromossômica, um fenômeno incomum entre eucariotos. Além disso, nossos resultados apoiam a visão de que as famílias Ctenoluciidae e Lebiasinidae estão intimamente relacionadas.

Palavras chave: peixes neotropicais, *fiber-FISH*, DNAr sintênico, *Pike characin*

Introdução

Os membros da família de peixes Ctenoluciidae (Teleostei, Characiformes) são conhecidos popularmente como *pike characin*, pois possuem como principal característica o focinho e mandíbula alongados. Estão amplamente distribuídos em rios e lagos no Brasil, Panamá, Colômbia e Venezuela (Vari 1995; 2003; Queiroz *et al.* 2014). A família abriga sete espécies reconhecidas, distribuídas em dois gêneros: *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius*, *B. maculata*, e *B. xyrekes*) e *Ctenolucius* (*C. hujeta* e *C. beani*) (Vari 1995; 2003).

C. hujeta é um predador de tamanho médio, atingindo até 25cm de comprimento total quando adulto (Vari 1995). Segundo Vari (1995; 2003), a separação dos dois gêneros de Ctenoluciidae está associada ao soerguimento dos Andes, durante o período terciário, uma vez que a distribuição do gênero *Ctenolucius* está confinada aos rios do Panamá, Colômbia e Venezuela, enquanto as espécies de *Boulengerella* estão distribuídas nas bacias do Orinoco, Amazonas e Tocantins, bem como em pequenos rios costeiros da Guiana (Guiana Francesa, Suriname) e nos estados brasileiros do Amapá e Pará. O corpo alongado e cilíndrico e a barbatana dorsal, localizada na metade posterior do corpo, conferem a estes peixes a capacidade de saltar para fora d'água, atacando as suas presas com sucessivos saltos acrobáticos. Outra característica marcante de *C. hujeta* é o hábito de caçar sozinha e a preferência por águas claras devido ao seu comportamento de predação visual (Vari 1995; 2003; Queiroz *et al.* 2014).

Existem opiniões divergentes sobre a posição filogenética de Ctenoluciidae dentro dos Characiformes (Lucena 1993; Vari 1995; Buckup 1998; Oyakawa 1998; Calcagnotto *et al.* 2005). Estudos recentes, baseados em dados moleculares, consideram que Ctenoluciidae e Lebiasinidae provavelmente formam um clado e representam um grupo irmão da superfamília Characoidea (Oliveira *et al.* 2011; Betancur-R *et al.* 2019). Análises citogenéticas, até o momento, foram realizadas em 4 das 5 espécies de *Boulengerella* (ou seja, *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*), que possuem $2n = 36$, e um número fundamental (NF) de 72. Nessas espécies, as regiões organizadoras do nucléolo (RONs), visualizadas pela impregnação com prata (Ag-RONs), estão localizadas em um único par de cromossomos, uma característica também confirmada pelo mapeamento FISH com DNAr 18S, em contraste com os múltiplos sítios de DNAr 5S (Tabela 1). Vale ressaltar que a associação de um bloco conspícuo de heterocromatina com DNAr 18S e sequências teloméricas, na constrição secundária do par 18, foi sugerida

como uma possível diferenciação sexual, sugerindo um sistema de cromossomos sexuais XX/XY (Sousa e Souza *et al.* 2017). No entanto, para *Ctenolucius*, os dados publicados são limitados ao cariótipo de *C. hujeta* com $2n = 36$ e $NF = 62$, descrito por Arefjev (1990), baseado apenas em cromossomos corados por Giemsa (Tabela 1).

Tabela 1. Dados citogenéticos de espécies de Ctenoluciidae. Souza e Sousa *et al.* 2017^a; Arefjev 1990^b.

Espécie	Número diploide	Fórmula Cariotípica	Número fundamental	RON	DNAr 18S	DNAr 5S
<i>Boulengerella cuvieri</i> ^a	36	14m+16sm+6st	72	Simples (par 18)	Simples (par 18)	Múltiplo (Par 1 e 10)
<i>Boulengerella lateristriga</i> ^a	36	14m+16sm+6st	72	Simples (par 18)	Simples (par 18)	Múltiplo (Par 1 e 10)
<i>Boulengerella lucius</i> ^a	36	14m+16sm+6st	72	Simples (par 18)	Simples (par 18)	Múltiplo (Par 1 e 4)
<i>Boulengerella maculata</i> ^a	36	14m+16sm+6st	72	Simples (par 18)	Simples (par 18)	Múltiplo (Par 1 e 10)
<i>Ctenolucius hujeta</i> ^b	36	26m/sm+10st/a	62	-	-	-

Adicionalmente, o mesmo número diploide em espécies de dois gêneros indica uma conservação do $2n$. Assim, estudos de DNAs repetitivos podem contribuir para o entendimento da diversificação do genoma neste clado. O presente estudo, baseado em análises citogenéticas moleculares em *C. hujeta*, fornece uma melhor compreensão da evolução cromossômica dentro da família Ctenoluciidae e suas relações com outras famílias de Characiformes.

Material e Métodos

Dez indivíduos (6 machos e 4 fêmeas) de *C. hujeta* (variando de 5 a 10 cm de comprimento) foram obtidos no comércio de aquários. Os animais foram eutanasiados, seguindo as recomendações das Diretrizes Brasileiras para a Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013) e licenciados pelo CEUA/INPA N° 033/2020. Todos os espécimes foram depositados na Coleção de Peixes do INPA (INPA-ICT 059514). As metáfases mitóticas foram obtidas de células da porção anterior do rim após tratamento *in vitro* com colchicina (Gold *et al.* 1990).

As RONS foram detectadas por impregnação com nitrato de prata, seguindo o protocolo de Howell e Black (1980). A heterocromatina C-positiva foi detectada seguindo Sumner (1972), com algumas pequenas modificações na coloração com iodeto de propídio de acordo com Lui *et al.* (2012).

Preparação da sonda e FISH

O DNA genômico foi extraído do tecido muscular preservado em etanol 100%, de acordo com o protocolo de Sambrook e Russell (2001). O DNAr 5S e 18S foram amplificados por PCR, utilizando os *primers* 5S f (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5S r (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), de acordo com Martins e Galetti (1999), e 18S f (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3') e 18S r (5'-CCGAGGACTCACTAAACCA-3'), de acordo com Gross *et al.* (2010). A primeira sonda continha uma cópia de repetição de DNAr 5S e incluía 120 pb do gene de transcrição de DNAr 5S e 200 pb do espaçador não transcrito (Martins e Galetti 1999). A segunda sonda correspondeu a um segmento de 1.400 pb do gene DNAr 18S, obtido via PCR do DNA nuclear (Gross *et al.* 2010). A sonda DNAr 5S foi marcada com biotina-14-dATP por nick-translation, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labeling System; Invitrogen, San Diego, CA, EUA). A sonda de DNAr 18S foi marcada por nick-translation com DIG-11-dUTP, seguindo as instruções do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha). Uma sonda da sequência de DNA telomérico (TTAGGG)_n também foi gerada por PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit, Roche) na ausência de um modelo, usando como iniciadores *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.* 1991). A FISH foi realizada sob condições de alto rigor em espalhamento cromossômico mitótico, de acordo com Yano *et al.* (2017). Avidina-FITC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi usada para detecção de sinal da sonda de DNAr 5S e anti-digoxigenina-rodamina (Roche, Mannheim, Alemanha) para DNAr 18S e para as sondas de (TTAGGG)_n. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (1,2 µg/mL), montados em solução Antifade (Vector, Burlingame, CA, EUA) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão).

fiber-FISH

Para os experimentos de *fiber*-FISH utilizamos o protocolo de Barros *et al.* (2011), com algumas modificações. O material em suspensão celular foi colocado em lâminas de vidro umedecidas em água a 45°C e secas ao ar. Normalmente 10 ± 5 núcleos por campo visual ao microscópio de luz (ampliação 100x) era uma condição favorável para obter boas fibras esticadas. As lâminas foram lavadas em solução salina (1× PBS) por 1 min. em temperatura ambiente, seguido de banhos sucessivos em série de álcool (70, 85 e 100%), por 2 min. cada. Depois da secagem, as lâminas foram colocadas na posição

horizontal, adicionou-se 400 μL de solução de NaOH 0,5 M, diluída em etanol a 30% (para cinco lâminas usa-se 600 μL de NaOH 0,5 M + 1400 μL de álcool 30%). As lâminas foram então inclinadas a 40° e uma segunda lâmina foi usada para alongar as fibras, espalhando o material na primeira lâmina. Após isso, 500 μL de etanol 100% foi imediatamente aplicado na lâmina inclinada até evaporar completamente. Em seguida, foi realizada a técnica de FISH usando sondas de DNAr 18S e 5S. Pelo menos 30 fibras cromossômicas de machos e fêmeas foram analisadas e fotografadas para determinar o padrão de distribuição das sondas de DNAr 18S e 5S. As imagens foram capturadas, usando um microscópio Olympus BX50 e processadas, usando Adobe photoshop 6.

Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas para confirmar o número diploide, a estrutura do cariótipo e os resultados de FISH. As imagens foram capturadas usando um microscópio Olympus BX50 com CoolSNAP e as imagens foram processadas com o software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) ou acrocêntricos (a), com base em suas proporções de braços (Levan *et al.* 1964).

Resultados

Machos e fêmeas de *C. hujeta* têm um número diploide (2n) de 36 cromossomos. O cariótipo é composto por 12 cromossomos metacêntricos, 20 submetacêntricos e 4 acrocêntricos (12m + 20sm + 4a), com NF = 68 (Fig. 1a, b). As RONS estão localizadas na região proximal dos braços curtos do par 1, na região terminal dos braços longos do par 9 e na região proximal dos braços curtos de um dos homólogos do par 12, em machos e fêmeas (Fig. 1e). A localização das RONS foi confirmada por mapeamento de FISH do DNAr 18S (Fig. 2). A heterocromatina constitutiva apresentou distribuição centromérica e bitelomérica na maioria dos cromossomos, com os pares 1 e 9 apresentando blocos mais conspícuos (Fig. 1c, d).

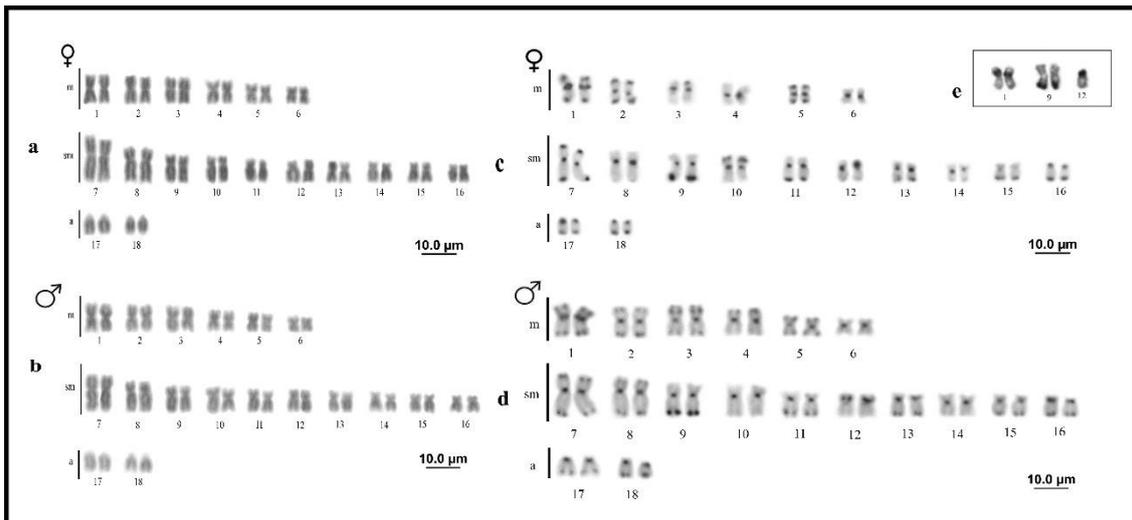


Figura 1. Cariótipo de fêmea e macho de *Ctenolucius hujeta* em coloração convencional com Giemsa (a, b), bandeamento cromossômico C (c, d) e Ag- RON (e).

As sequências de DNAr 5S foram mapeadas nos braços longos do par 9 em fêmeas e machos, colocalizado com as repetições de DNAr 18S (Fig. 2, painel superior). Sequências teloméricas (TTAGGG) n foram observadas nas regiões terminais de todos os cromossomos, porém com maior acúmulo no par 9, além de uma sequência telomérica intersticial (ITS) no par 1, correspondendo ao bloco heterocromático presente nesses cromossomos, assim como com o sítio de DNAr no par 9 (Fig. 2, painel inferior).

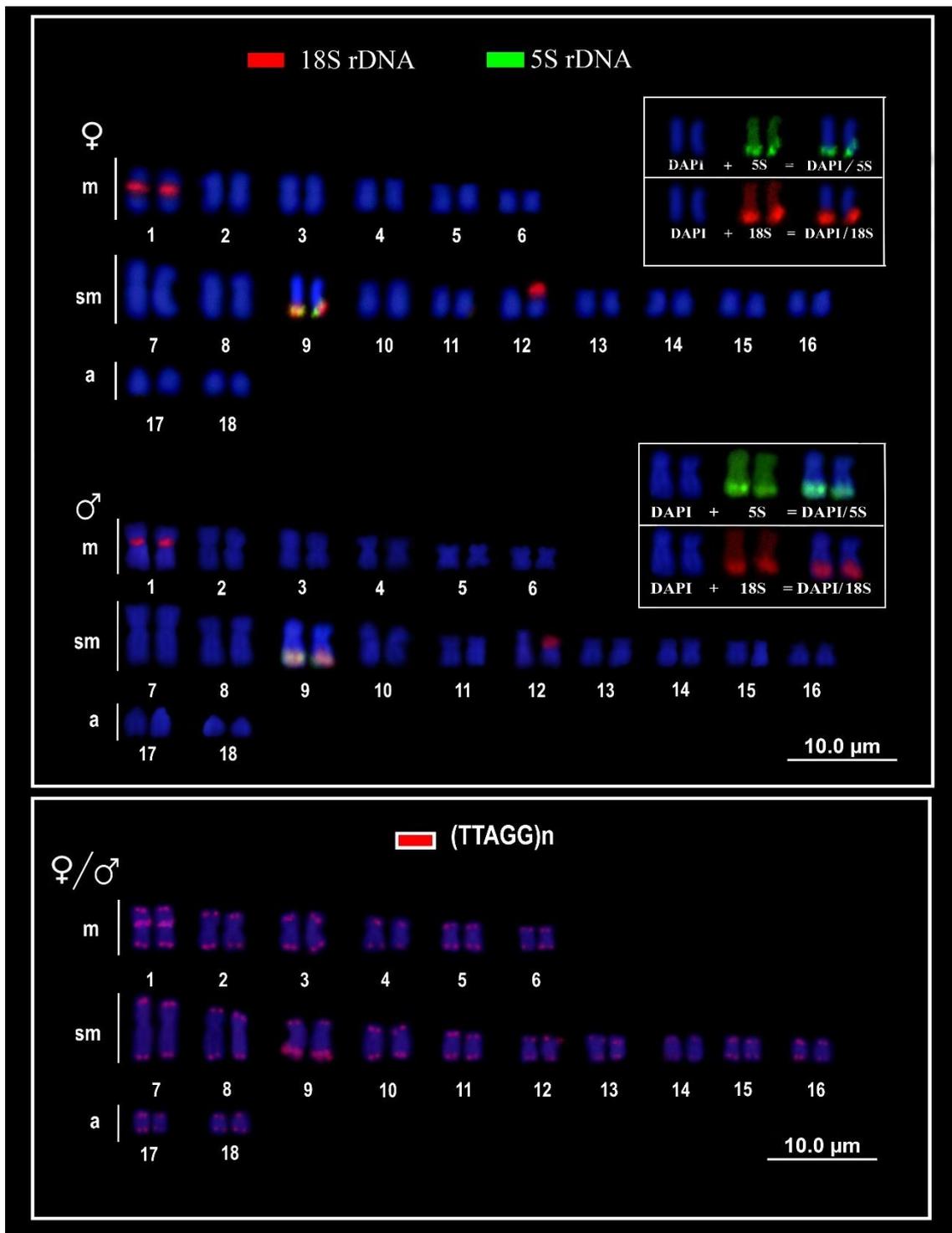


Figura 2. Cariótipo de macho e fêmea de *C. hujeta* com marcadores cromossômicos moleculares. *Double FISH* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) e *FISH* com sonda de (TTAGGG)_n (vermelho).

A técnica de *fiber-FISH* produziu hibridações de boa qualidade, permitindo assim a determinação de vários sinais específicos em cada lâmina, sendo facilmente distinguíveis do fundo, mesmo sob condições de alto rigor. As análises de *fiber-FISH* revelaram que os DNAr 5S e 18S têm uma distribuição adjacente e sobreposta, tanto em

machos como em fêmeas. Esse padrão se repetiu várias vezes nos indivíduos aqui analisados, sempre seguindo o mesmo esquema (Fig. 3).

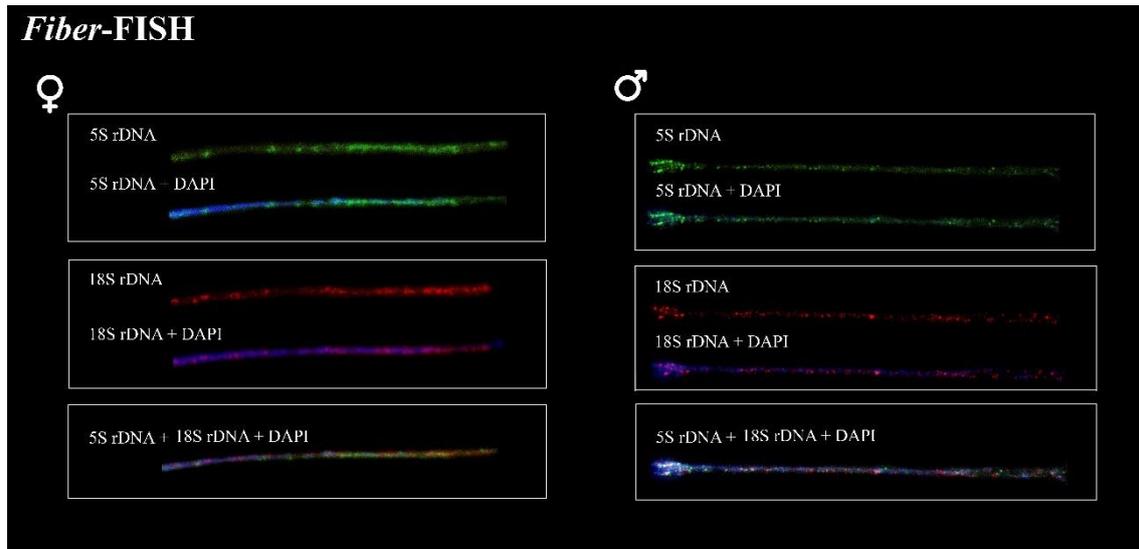


Figura 3. Fiber-FISH mostrando clusters de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) adjacentes e sobrepostos em fêmeas e machos de *Ctenolucius hujeta*.

Discussão

Os dados citogenéticos para *C. hujeta*, combinados com os das espécies de *Boulengerella* (Souza e Sousa *et al.* 2017), apontam para uma conservação do número diploide em membros da família Ctenoluciidae. No entanto, isso se refere apenas ao $2n$, uma vez que existem diferenças tanto no nível macro quanto microestrutural entre os cariótipos descritos até agora. Na verdade, o cariótipo de *C. hujeta* apresenta cromossomos mono e bi-armados, enquanto as espécies de *Boulengerella* possuem apenas cromossomos bi-armados (Souza e Sousa *et al.* 2017). Em geral, essas diferenças resultam de rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas, translocações ou mesmo reposicionamento de centrômeros, que alteram a morfologia cromossômica, mas não o número diploide (Badaeva *et al.* 2007; Nergadze *et al.* 2007; Barros *et al.* 2017).

Um padrão semelhante também é exibido em duas espécies de *Lebiasina*, nomeadas *L. bimaculata* e *L. melanoguttata* (Lebiasinidae), consideradas entre os lebiasinídeos como as primeiras a divergirem filogeneticamente, apresentando cariótipos com $2n = 36m/sm$, diferenciando-se assim de outras espécies de lebiasinídeos que possuem cromossomos mono e bi-armados (Sassi *et al.* 2019). Notavelmente, várias características cariotípicas de *Lebiasina* correspondem às das espécies de Ctenoluciidae. De fato, juntamente com a estrutura cariotípica, a aplicação de pintura cromossômica e hibridização comparativa do genoma indicou que as espécies de *Lebiasina* e

Boulengerella compartilham algumas sequências cromossômicas semelhantes (Sassi *et al.* 2019), apoiando assim o parentesco entre elas, bem como as relações filogenéticas entre as famílias Lebiasinidae e Ctenoluciidae (Oliveira *et al.* 2011; Betancur-R *et al.* 2019).

A heterocromatina C-positiva foi encontrada nas regiões terminais e centroméricas dos cromossomos, semelhante ao encontrado nas espécies de *Boulengerella* (Souza e Sousa *et al.* 2017), embora com algumas pequenas diferenças. De fato, esse padrão de distribuição de heterocromatina é comum entre os Characiformes (Born e Bertollo 2000; Vicari *et al.* 2003; 2005; Souza e Sousa *et al.* 2017; Sassi *et al.* 2019). No caso de *C. hujeta* é notável a co-localização de um bloco heterocromático com repetições ITS e DNAr 18S na região proximal do par cromossômico 1. Como essa região também contém o sítio RON ativo, o bloco heterocromático conspicuo desempenha algum papel na conservação da região do gene RNAr, que provavelmente foi inserido lá por um rearranjo cromossômico, conforme indicado pela ITS (Long e Dawid 1980). Vale ressaltar que as ITS podem surgir por meio de diversos mecanismos, mas em casos como esses, sua íntima ligação com o surgimento do rearranjo cromossômico parece ser uma explicação plausível.

O cariótipo de *C. hujeta* também tem vários sítios de DNAr 18S e correspondentes à Ag-RON positiva, em contraste com espécies de *Boulengerella*, onde foi encontrado um único sítio de Ag-RON/DNAr 18S (Souza e Sousa *et al.* 2017). Sabe-se que todos os organismos superiores possuem pelo menos 1 par de cromossomos que contém genes ribossomais e os expressam (Heslop-Harrison 2000), sendo as RONS simples consideradas um caráter plesiomórfico em peixes (Oliveira e Aguiar-Perecin 1999; Carvalho *et al.* 2012). Nesse caso, RONS múltiplas podem surgir de recombinações desiguais (Heslop-Harrison 2000), rearranjos cromossômicos (Belyayev *et al.* 2010) ou através de elementos móveis (Carducci *et al.* 2018). Levando isso em consideração, a presença de RONS simples e múltiplas nos cariótipos dos representantes de *Boulengerella* e *C. hujeta*, respectivamente, corrobora a hipótese filogenética de Oliveira *et al.* (2011), que *Boulengerella* ocupa uma posição basal em relação a *Ctenolucius*.

Por outro lado, como mostrado pelo mapeamento de *double FISH*, as sequências de DNAr 5S ocorrem em um único local no genoma de *C. hujeta*, que co-localiza com o DNAr 18S no par 9. A análise de *fiber-FISH* revelou que esses genes estão intercalados nessa região. Essa é outra diferença entre os cariótipos de *Boulengerella* e *Ctenolucius*,

uma vez que as espécies de *Boulengerella* têm múltiplos sítios de DNAr 5S que não co-localizam com o DNAr 18S. A co-localização dessas duas classes de DNAr não é vista como uma característica comum, uma vez que a dispersão dessas distintas famílias multigênicas é considerada resultado de eventos independentes (Britton-Davidian *et al.* 2012; Sochorová *et al.* 2018), e pode estar associada ao silenciamento desses genes (Vicari *et al.* 2008; Barros *et al.* 2011; Traldi *et al.* 2013a). No entanto, em *C. hujeta*, a co-localização intercalada de DNAr 5S e 18S não levou a um processo de silenciamento gênico, uma vez que a atividade do gene 18S é demonstrada pela técnica Ag-RON, e o sítio 5S único do genoma é justamente aquele co-localizado com o DNAr 18S no par 9.

Os telômeros são complexos de nucleoproteínas localizados nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, cuja função é protegê-los de fusões e degradação de ponta a ponta, garantindo a replicação completa do DNA (De Lange 2002; Bolzán e Bianchi 2006; Ocalewicz 2013). Além dos sítios esperados em todas as extremidades dos cromossomos de *C. hujeta*, sequências teloméricas também foram observadas, associadas à heterocromatina constitutiva e DNAr em alguns cromossomos (como ITS proximal no par 1 e nas regiões distais dos pares 9 e 12). Notavelmente, associação semelhante de repetições também ocorre nos genomas das espécies de *Boulengerella* e, portanto, é provável que seja uma característica ancestral da família que antecede a divergência dos gêneros *Ctenolucius* e *Boulengerella*.

Assim, embora algumas características cromossômicas, como $2n$, ainda permaneçam preservadas, várias outras diferenciações cariotípicas entre *Boulengerella* e *Ctenolucius* atestam a evolução cromossômica independente destes gêneros.

Os dois gêneros de Ctenoluciidae: *Boulengerella* e *Ctenolucius* compartilham o mesmo $2n$, mas suas estruturas cariotípicas e características genômicas diferem notavelmente. As diferenças entre os vários marcadores investigados, principalmente no número e distribuição dos genes RNAr 18S e 5S, e a sintenia entre eles, indicam que desde a divisão dos dois gêneros no Terciário, seu isolamento favoreceu sua divergência evolutiva. Por sua vez, a co-localização terminal de sequências teloméricas e 18S inseridas em sítios heterocromáticos, como encontrado no par 9 de *C. hujeta* e no par 18 das espécies de *Boulengerella*, representa uma característica conservada. Dentro de *Boulengerella*, essa característica parece ter uma possível correlação com um sistema de cromossomos sexuais, associado exclusivamente ao heteromorfismo cromossômico encontrado em machos de *Boulengerella*, o qual não ocorre em *C. hujeta*. Além disso, o

2n compartilhado e a presença dos mesmos cariótipos em *Boulengerella*, *Ctenolucius* e *Lebiasina* fortalecem ainda mais as relações propostas entre essas duas famílias de peixes Characiformes.

Capítulo 2: Mapeamento cromossômico de elementos transponíveis e sua implicação no processo de evolução cromossômica em Ctenoluciidae

José Francisco de Sousa e Souza¹; Erika Milena Corrêa Guimarães¹; Vanessa Susan Pinheiro Figliuolo¹; Luiz A.C. Bertollo²; Marcelo de Bello Cioffi²; Simone Cardoso Soares¹; Eliana Feldberg¹

¹PPG-Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, INPA, Manaus, AM; ²Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

Resumo

Os elementos transponíveis são conhecidos pela sua capacidade de se mover pelo genoma, podendo criar cópias de si mesmo, durante o processo de mobilização, e se inserir em novas regiões, induzir a formação de polimorfismos cromossômicos, de rearranjos cromossômicos, variação na estrutura e expressão de genes. No presente trabalho realizamos o mapeamento cromossômico dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em *Ctenolucius hujeta* e em quatro espécies de *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*). Os resultados evidenciaram um intenso acúmulo de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em regiões heterocromáticas e eucromáticas dos cromossomos de todas as espécies aqui estudadas, além disso, a associação de *Rex1* e *Rex3* aos DNAr 18S e 5S, compartilhada entre os ctenoluciídeos, desempenhou importante papel na dispersão dos sítios de DNAr 18S em *C. hujeta* e no surgimento do heteromorfismo cromossômico, evidenciado nos machos das espécies de *Boulengerella*.

Palavras chave: Heteromorfismo cromossômico, FISH, Peixes neotropicais, retroelementos

Introdução

Sequências repetitivas compreendem uma fração importante do genoma das espécies, podendo estar associadas ao surgimento de rearranjos cromossômicos (duplicações, deleções, inversões) e levar à formação de polimorfismos cromossômicos, variação na estrutura e expressão de genes ou, ainda, na diferenciação de cromossomos sexuais heteromórficos (Raskina *et al.* 2008; Pokorná *et al.* 2011; Piégu *et al.* 2015; Carducci *et al.* 2018).

Em peixes, os elementos transponíveis (ETs) mais estudados são os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, inicialmente isolados do genoma de espécies do gênero *Xiphophorus* (Volf *et al.* 1999; 2000; 2001). Estes elementos móveis estão amplamente distribuídos no genoma eucarioto e comumente relacionados à evolução cariotípica de grandes grupos como os teleósteos (Carducci *et al.* 2018; Schneider *et al.* 2013b). O mapeamento de tais sequências possibilitou a compreensão de importantes novidades evolutivas ao longo das últimas décadas, como em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes), onde a co-localização do *Rex3*, DNAr 5S e (TTAGGG)_n na posição centromérica do grande cromossomo Y metacêntrico, no cariomorfo D, foi associada a processos que culminaram na diferenciação deste cromossomo, neste cariomorfo (Cioffi *et al.* 2010). Outro exemplo é o que ocorre em *Cynodon gibbus* (Characiformes), onde sequências de *Rex6* foram associadas ao processo de heterocromatinização do cromossomo sexual W e a um provável envolvimento no processo de dispersão dos motivos microssatélites (CA)₁₅ e (CAC)₁₀ acumulados na pequena porção heterocromática do W, que levou à variação no tamanho dessas sequências, por recombinação ectópica (Pinheiro-Figliuolo *et al.* 2020).

Para a família Ctenoluciidae ainda não existem dados de localização cromossômica de ETs, no entanto, a associação de sequências repetitivas (TTAGGG)_n a DNAr 18S e 5S foi evidenciada em espécies de *Boulengerella* e em *Ctenolucius hujeta* (Sousa e Souza *et al.* 2017; 2021), sendo este caráter considerado, pelos autores, como sendo uma característica ancestral compartilhada entre as espécies desta família. Além disso, o par cromossômico 18 das espécies de *Boulengerella* apresentam um heteromorfismo de tamanho entre machos e fêmeas, relacionado à constrição secundária, o qual apresenta um grande bloco de sequência telomérica associado a DNAr 18S que, a princípio, os autores sugerem tratar-se de um possível sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY (Sousa e Souza *et al.* 2017).

Tendo em vista que a associação de DNAs repetitivos em Ctenoluciidae parece ter tido um papel fundamental na evolução cariotípica da família, no presente estudo mapeamos os TEs *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em espécies de *Boulengerella* e em *Ctenolucius hujeta* a fim de entender como esses retroelementos se comportam no genoma desses organismos e sua influência na evolução cromossômica do grupo.

Material e Métodos

Amostragem e citogenética convencional

Foram estudados, citogeneticamente, machos e fêmeas de cinco espécies de Ctenoluciidae. As espécies de *Boulengerella* foram coletadas na bacia amazônica: *B. lateristriga* (7 machos, 7 fêmeas), coletada em Novo Airão (2°37'28.5"S, 60°58'16.8"W); *B. cuvieri* (6 machos, 8 fêmeas), coletada no Rio Negro, próximo ao lago Catalão (3°10'30.8"S, 59°56'30.3"W); *B. maculata* (7 machos, 8 fêmeas), coletada no Rio Negro, próximo ao lago Catalão e em Anavilhanas (2°33'28.4"S, 60°46'29.7"W); *B. lucius* (6 fêmeas e 6 machos), coletada à jusante da hidrelétrica de Balbina, no rio Uatumã (1°55'02.2"S, 59°28'23.7"W). Os exemplares de *C. hujeta* (6 machos e 4 fêmeas) foram obtidos no comércio de aquários. Todos os espécimes foram depositados na Coleção de Peixes do INPA, seguindo as seguintes numerações: *Boulengerella* (INPA-ICT 053246, 053247, 053248, 053249, e 053250) *Ctenolucius* (INPA-ICT 059514). As metáfases mitóticas foram obtidas de células da porção anterior do rim após tratamento *in vitro* com colchicina (Gold *et al.* 1990).

Preparação da sonda e FISH

O DNA genômico, utilizado em todas as etapas metodológicas, foi extraído a partir de tecido do músculo fixado em álcool 96%, de acordo com protocolo estabelecido pelo Kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification- Promega. O DNA extraído foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,1%, corado com Gel Red (Biotium), para a verificação quanto ao grau de integridade deste DNA. Os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os seguintes primers: RTX1-F1 (5'-TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC-3') e RTX1-R1 (5'-TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC-3') (Volff *et al.* 2000); RTX3-F3 (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3') (Volff *et al.* 1999); Rex6-Medf1 (5'TAA AGC ATA CAT GGA GCG

CCAC) e Rex6-Medf2 (5'AGG AAC ATG TGT GCA GAA TATG-3') (Volff *et al.* 2001).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), com condição de estringência de 77%. Os produtos da PCR dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram marcados por nick translation com digoxigenina-11- dUTP (Dig-Nick Translation mix; Roche), seguindo as instruções do fabricante. A detecção dos sinais de hibridização foi realizada com anti digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Em seguida, os cromossomos foram contracolorados com DAPI, analisados em microscópio de epifluorescência Olympus.

Análises cromossômicas

Pelo menos 20 metáfases de cada indivíduo foram analisadas para confirmar os padrões de distribuição dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* nos cromossomos. As imagens foram obtidas, utilizando um microscópio Olympus BX51 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), equipado com CoolSNAP. As melhores metáfases foram fotografadas e os cariótipos montados no programa Adobe Photoshop CS6. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) ou submetacêntricos (sm), seguindo a classificação proposta por Levan *et al.* (1964), a partir da razão de braços.

Resultados

Os elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* apresentaram um padrão disperso com acúmulos em alguns cromossomos, tanto em regiões heterocromáticas como eucromáticas. O *Rex1* está presente em todas as espécies aqui analisadas, exceto em *B. lateristriga*; já o *Rex3* foi evidenciado em todas as espécies de *Boulengerella* e em *C. hujeta* e o *Rex6* esteve presente em três espécies, exceto *B. lucius* e *C. hujeta* (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente).

O *Rex1* apresentou um padrão disperso ao longo de todos os cromossomos nas espécies analisadas. Em *B. lucius* apesar de apresentar um padrão disperso podemos observar regiões mais compartimentalizadas deste retroelemento, diferindo das outras duas espécies do gênero. Em contrapartida, em *C. hujeta* o *Rex1* se encontra em blocos localizados preferencialmente nas porções terminais e centromérica da maioria dos cromossomos (**Figura 1**).

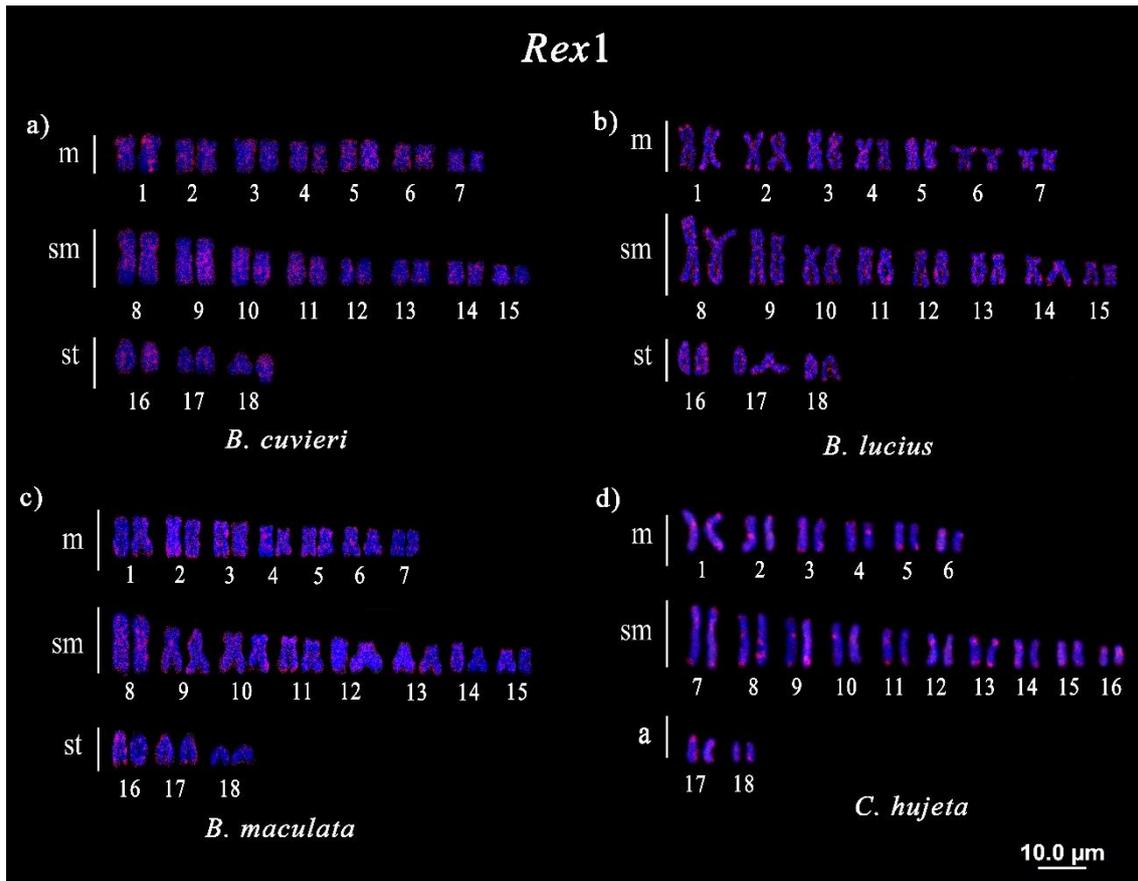


Figura 1. Mapeamento cromossômico do ET *Rex1* em Ctenoluciidae: a) *Boulengerella cuvieri*, b) *B. lucius*, c) *B. maculata*, d) *Ctenolucius hujeta*.

Nas espécies de *Boulengerella* e *Ctenolucius hujeta* o *Rex3* apresentou-se disperso ao longo de todos os pares cromossômicos, formando pequenos blocos nas regiões terminais e intersticiais de alguns pares cromossômicos (**Figura 2**).

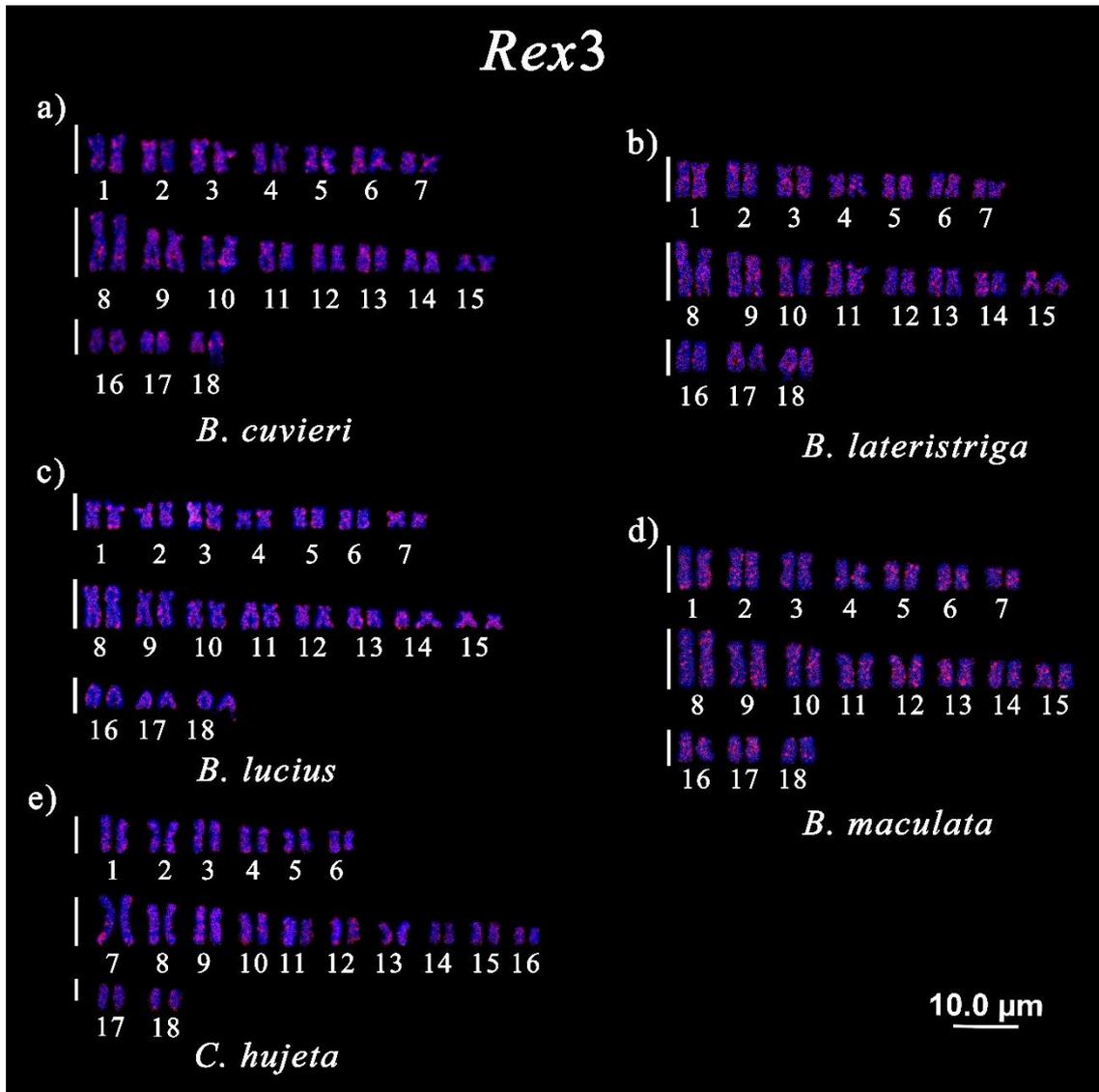


Figura 2. Mapeamento cromossômico do ET *Rex3* em Ctenoluciidae: a) *Boulengerella cuvieri*, b) *B. lateristriga*, c) *B. lucius*, d) *B. maculata*, e) e f) *Ctenolucius hujeta*.

O *Rex6* apresentou-se preferencialmente em blocos, sendo possível observar blocos conspícuos na região terminal dos pares 1, 3 e 11 e intersticial nos pares 1, 8, 9, 10 e 16 de *B. cuvieri*. Em *B. maculata* este ET apresentou acúmulo preferencial na região centromérica de vários cromossomos, em especial nos pares 1, 3, 6, 8, 10, 11 e 13. Já, em *B. lateristriga* este ET apresentou-se disperso em todos os cromossomos do complemento (**Figura 3**).

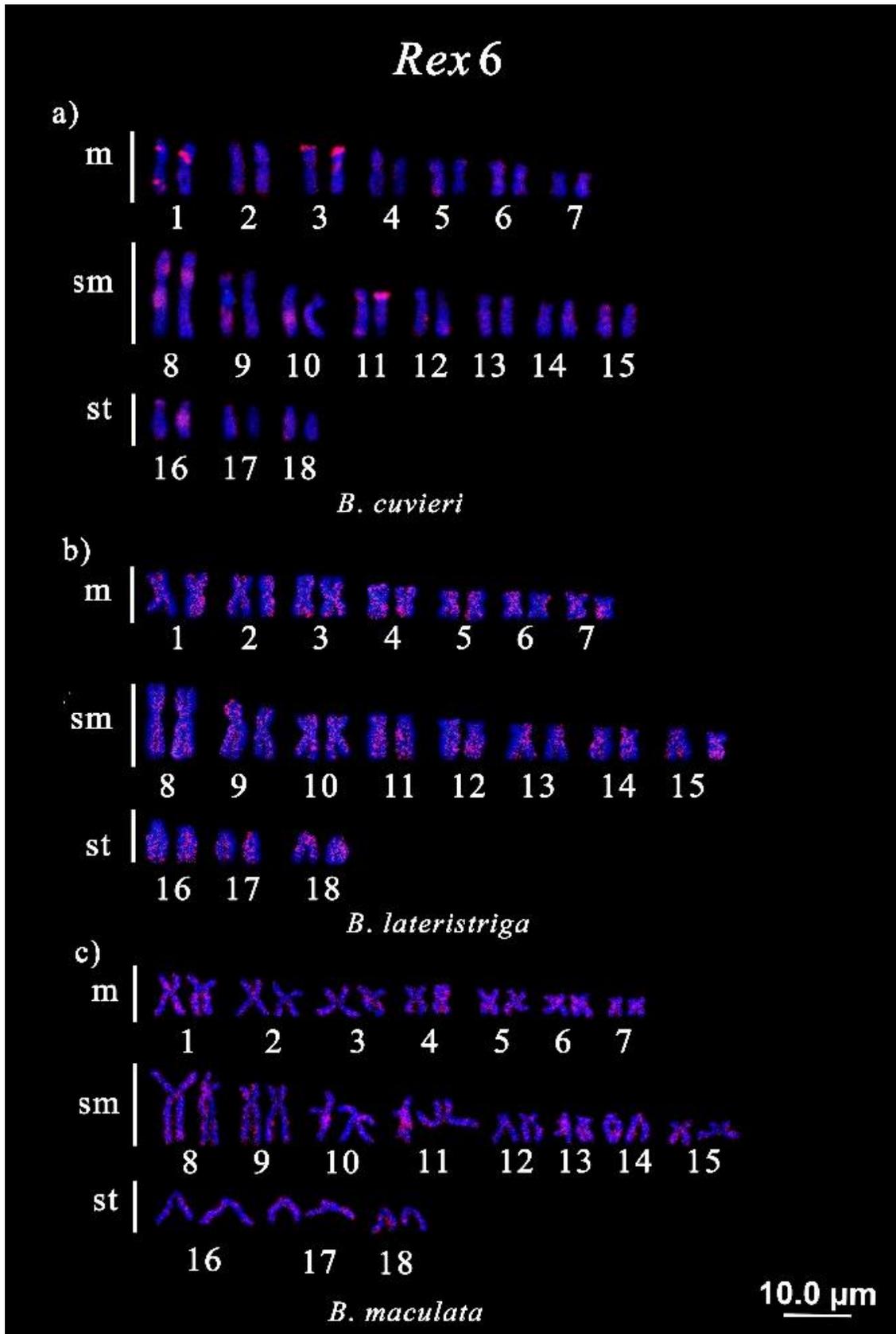


Figura 3. Mapeamento cromossômico do ET *Rex 6* em Ctenoluciidae: a) *Boulengerella cuvieri*, b) *B. lateristriga* e c) *B. maculata*.

Discussão

Nossos resultados revelaram diferenças em relação à presença ou ausência dos retroelementos, quantidade de sítios de hibridização, bem como local e intensidade das hibridizações dos elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em espécies de *Boulengerella* e em *C. hujeta*, sugerindo que estes ETs seguiram vias evolutivas independentes ao longo da evolução cariotípica dos Ctenoluciídeos.

O padrão disperso de distribuição dos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* nas regiões de heterocromatina e eucromatina dos cromossomos, como evidenciado nos ctenoluciídeos, parece ser comum entre os peixes, por exemplo em *Rachycentron canadum* (Costa *et al.* 2013), *Astyanax fasciatus* (Pansonato-Alves *et al.* 2013), *Triporthus trifurcatus* (Yano *et al.* 2014), *Astyanax bockmanni* (Daniel *et al.* 2015), *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* (Freitas *et al.* 2017), *Rhaphiodon vulpinus* e *Hydrolycus armatus* (Pinheiro-Figliuolo *et al.* 2021). A localização dos ETs em região heterocromática é descrita como um mecanismo epigenético, que atua evitando a propagação excessiva dos retroelementos no genoma hospedeiro (Richards *et al.* 2010; Favarato *et al.* 2017; Carducci *et al.* 2018), uma vez que, a localização desses elementos em regiões eucromáticas pode gerar mutações que afetem os níveis de expressão gênica e os padrões de recombinação do DNA, ou ainda, interferir na organização da arquitetura genômica (Le Rouzic e Capy 2005; Favarato *et al.* 2017). Nesse sentido, podemos inferir que a localização destes TEs em região eucromática tenha induzido rearranjos cromossômicos tais como inversão, deleção, duplicação e translocação, que culminou nas diferenças cariotípicas evidenciadas entre os Ctenoluciídeos (Sousa e Souza *et al.* 2017; 2021).

O *Rex3* foi o único ET presente em todas as espécies analisadas de Ctenoluciidae e parece desempenhar importante papel na evolução cariotípica desta família, podendo neste sentido conferir resistência ao hospedeiro, promovendo assim, vantagem adaptativa na conquista de novos nichos (da Silva *et al.* 2016; Carducci *et al.* 2018), mantendo-se no genoma dessas espécies, provavelmente, devido à sua associação aos DNAr 5S e 18S. Entre os peixes teleósteos, este retroelemento apresenta ampla distribuição, tendo sido evidenciado em espécies das ordens Cyprinodontiformes, Cypriniformes, Esociformes, Anguilliformes (Volf *et al.* 2001), Perciformes (Volf *et al.* 2001; Ozouf-Costaz *et al.* 2004; Teixeira *et al.* 2009; Mazzuchelli e Martins 2009; Valente *et al.* 2011), Tetraodontiformes (Dasilva *et al.* 2002), Siluriformes (Ferreira *et al.* 2011; Favarato *et*

al. 2019) e Characiformes (Cioffi *et al.* 2010; Pinheiro-Fiugliolo *et al.* 2021; Sousa e Souza *et al.* presente trabalho).

É notável a associação dos retroelementos, em especial *Rex1* e *Rex3*, aos DNAr 18S e 5S em *Ctenolucius hujeta* e ao DNAr 18S em *Boulengerella* spp (Figura 4). Entretanto, estas associações seguiram vias evolutivas independentes e se manifestaram de forma distinta entre *C. hujeta* e *Boulengerella* spp. A co-localização de ETs com sequências de DNAr 18S e 5S não é exclusiva dos Ctenoluciídeos, já tendo sido evidenciada em *Hisonotus leucofrenatus* (Ferreira *et al.* 2011), *Erythrinus erythrinus* (Cioffi *et al.* 2010), *Astyanax bockmanni* (Silva *et al.* 2013), *Astyanax fasciatus* (Pansonato-Alves *et al.* 2013), *Ancistrus* spp. (Favarato *et al.* 2017), sugerida como sendo um importante fator na dispersão das sequências de DNAr na espécie hospedeira e/ou na diferenciação dos cromossomos sexuais.

Em *Ctenolucius hujeta*, a localização sintênica dos DNAr 18S e 5S na região terminal do par 9 pode ter induzido o recrutamento de DNAs repetitivos, a exemplo da sequência telomérica, que é evidenciada como um bloco conspícuo nesta região (Sousa e Souza *et al.* 2021). Neste sentido, podemos inferir que a condição sintênica (DNAr 18S/5S/(TTAGGG)_n) em *C. hujeta* atuou como *hotspot* cromossômico, atraindo assim sequências repetitivas, tais como os retroelementos *Rex1* e *Rex3*. A localização sintênica dos *Rex1* e *Rex3*, adjacente à sequência do DNAr 18S, localizada na porção terminal do par 9, teria facilitado o processo de transposição pelo mecanismo “copia e cola”, levando uma cópia deste DNAr 18S para a região intersticial do braço curto do par 1 e para o braço curto de um dos homólogos do par 12 (Figura 4). Esse tipo de transposição de sequências gênicas ocorre, devido à capacidade dos genes codificantes de formarem complexos com elementos transponíveis e se dispersarem pelo genoma hospedeiro (Jiang *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2008; Silva *et al.* 2013).

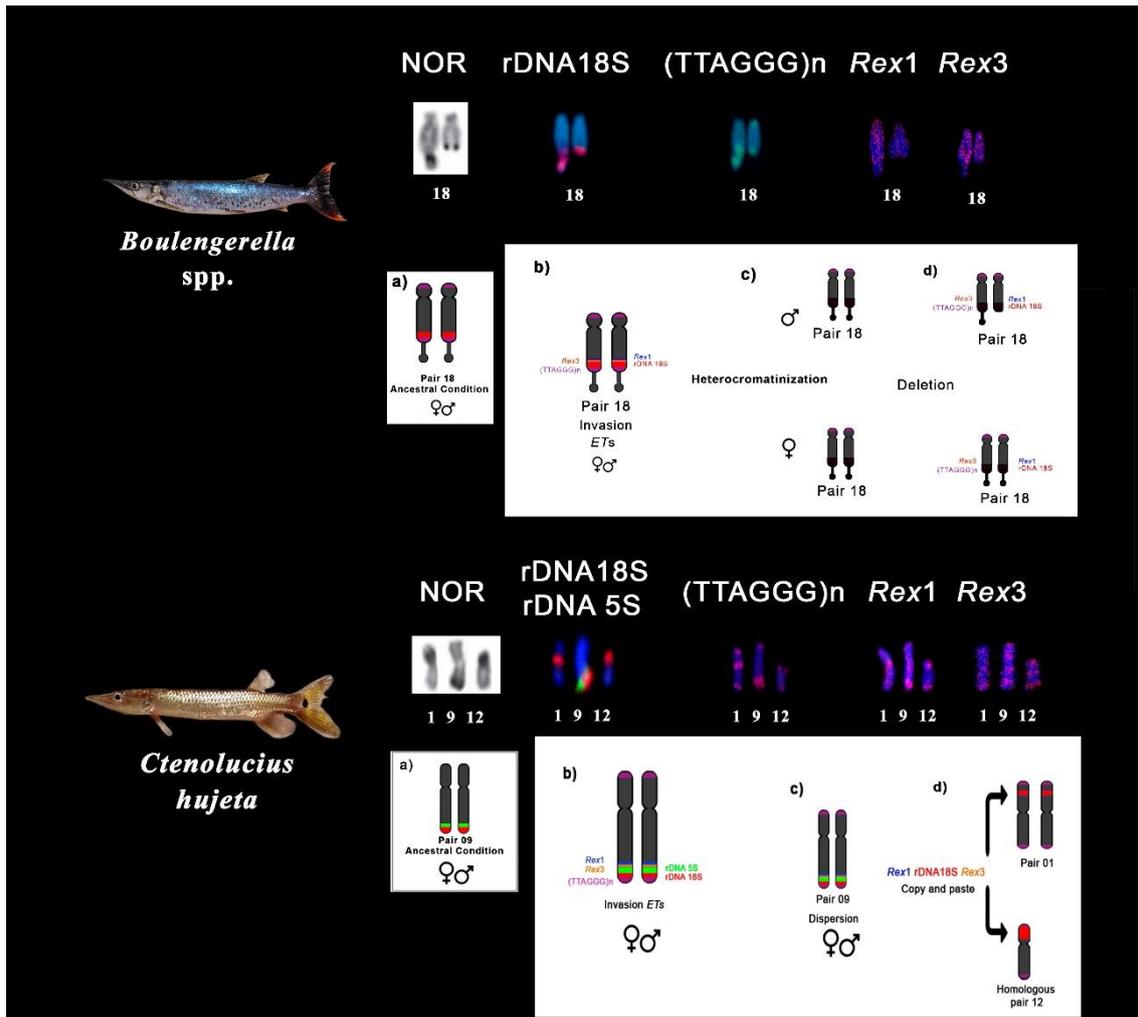


Figura 4. Representação esquemática dos possíveis eventos de dispersão do DNAr 18S, mediados pelos *Rex1* e *Rex3* nos Ctenoluciídeos. Nas espécies de *Boulengerella*: (a) Condição ancestral; (b) invasão de sequências repetitivas; (c) heterocromatinização da região da constrição secundária; (d) deleção de parte da constrição secundária de um dos homólogos do par 18 nos machos. Em *Ctenolucius hujeta*: (a) condição ancestral do par 09 em machos e fêmeas; (b) invasão de sequências repetitivas; (c) Dispersão do DNAr 18S, mediada pelos *Rex1* e *Rex3*; (d) transposição de sequência de DNAr 18S para região intersticial do braço curto do par 1 e para o braço curto de um dos homólogos do par 12.

Em *Boulengerella* spp., por outro lado, a associação *Rex1* e *Rex3*/DNAr 18S induziu a formação do heteromorfismo de tamanho da constrição secundária entre machos e fêmeas. Vale ressaltar que o heteromorfismo de tamanho da constrição secundária é comum entre os peixes, ocorrendo em ambos os sexos, e por este motivo não é associado a cromossomos sexuais (Mondin *et al.* 2007; Kasahara 2009; Cerqueira *et al.* 2019). Entretanto, em *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata* este heteromorfismo ocorre apenas na constrição secundária dos machos, fato que nos induziu a hipotetizar que o acúmulo de TEs em sintonia com DNAr 18S nestas espécies poderia ter recrutado

alguma sequência sexo-específica, que é expressa em um dos homólogos do par 18 dos machos (Sousa e Souza *et al.* 2017).

No entanto, além de impedir a propagação excessiva de retroelementos no genoma do hospedeiro, bem como a transposição de sequências de DNAr 18S em associação com retroelementos, essa região sofreu heterocromatinização, o que resultou na deleção de parte da constrição secundária de um dos homólogos do par 18 nas espécies de machos de *Boulengerella*, bem como a heterocromatinização desta região nas fêmeas. Nesse sentido, essa região pode estar ligada a um processo de diferenciação inicial dos cromossomos sexuais. Vale lembrar que os *Rex*, embora possuam nomes semelhantes, diferem nos mecanismos de transposição e atuação (Volf *et al.* 2001), tendo, portanto, uma evolução diferente entre espécies (Volf *et al.* 1999; 2000; 2001). Nesse sentido, o padrão de distribuição disperso do *Rex6* em *B. maculata* e *B. lateristriga* e em blocos em *B. cuvieri* pode ser explicado pela maneira com que este retroelemento interage com o genoma hospedeiro. Ainda, vale ressaltar que a presença de retroelemento do tipo *Rex* não é uma condição obrigatória no genoma eucarioto. Assim, a ausência de *Rex6* em *B. lucius* e *C. hujeta* pode ser uma característica da história evolutiva dessas espécies ou ainda, reflexo das pressões ambientais vivenciadas por essas espécies para ocupação e sobrevivência em novos nichos, como observado em espécies de *Leporinus* (*L. elongatus*, *L. obtusidens*, *L. macrocephalus*, *L. striatus*, *L. lacustres* e *L. friderici*), em que foi evidenciado diferentes padrões de distribuição de *Rex1* e *Rex3* e ausência de *Rex6* em todas as espécies (Borba *et al.* 2013).

A hibridização dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em espécies de *Boulengerella* e em *C. hujeta*, revelou que estes apresentam-se dispersos nas regiões heterocromáticas e eucromáticas e desempenham importante papel na evolução cariotípica desta família, mantendo-se no genoma desses indivíduos por associação aos DNAr 18S e 5S. A associação desses retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* aos DNAr 18S e 5S nas espécies de *Boulengerella* e em *C. hujeta* induziu a formação de *hotspot* cromossômicos, que em *Ctenolucius hujeta* impulsionou a dispersão e a formação dos múltiplos sítios do DNAr18S evidenciados nesta espécie, através do mecanismo “copia e cola”. Já, nas espécies de *Boulengerella* a formação de *hotspot* cromossômico associado ao DNAr 18S levou à heterocromatinização dessa região como mecanismo de defesa, atuando contra a dispersão desta sequência de DNAr. Esta heterocromatinização, por sua vez, se apresenta de forma heteromórfica entre machos e fêmeas deste gênero, podendo

estar associado a um processo inicial de diferenciação dos cromossomos sexuais neste gênero.

Capítulo 3: DNAs repetitivos e sua contribuição para evolução cariotípica da família Ctenoluciidae (Characiformes)

José Francisco de Sousa e Souza¹; Vanessa Susan Pinheiro Figliuolo¹; Francisco de Menezes Cavalcante Sassi²; Luiz A.C. Bertollo²; Marcelo de Bello Cioffi²; Eliana Feldberg¹

¹ PPG-Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, INPA, Manaus, AM;

² Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

Resumo

Microsatélites são sequências curtas repetidas *in tandem*, que compreendem uma fração importante do genoma eucarioto, são considerados altamente polimórficos devido à elevada taxa de mutação e considerados bons marcadores para estudos citogenômicos de indivíduos e populações. Estudos citogenômicos em espécies de Ctenoluciidae, uma pequena família de peixes Neotropicais de água doce, evidenciaram forte associação de sequências teloméricas e retroelementos aos DNAr 18S e 5S, sendo proposto que essas sequências provavelmente desempenharam um importante papel na estrutura do genoma dos Ctenoluciídeos. Na tentativa de desenvolver um quadro mais abrangente da evolução cariotípica e genômica ocorrida em Ctenoluciidae, realizamos mapeamento cromossômico de sequências microssatélites, hibridização genômica comparativa (CGH) e experimentos de pintura cromossômica entre espécies (Zoo-FISH) para explorar a divergência intergenômica em escala cromossômica utilizando 5 das 7 espécies atualmente descritas para esta família. Os resultados permitiram: (I) acompanhar as relações evolutivas dentro da família; (II) mostrar que sequências repetitivas de DNA possuem diferentes padrões de distribuição e acúmulo entre os Ctenoluciídeos, provavelmente promovendo diferenciação cromossômica e diversidade nesta família de peixes; e (III) confirmar as prováveis relações filogenéticas/evolutivas entre os grupos Ctenoluciidae e Lebiasinidae.

Palavras chave: Peixes neotropicais, Microsatélites, FISH, WCP, GATA, CGH

Introdução

Microsatélites ou sequências de repetições simples (SSRs) são motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *in tandem*, que compreendem uma fração importante do genoma eucarioto (Tautz e Renz 1984). Devido à elevada taxa de mutação, SSRs são considerados altamente polimórficos e bons marcadores moleculares para estudos citogenômicos de indivíduos e populações (Heslop-Harrison 2000; Liu *et al.* 2013; Silva *et al.* 2014).

Em peixes Neotropicais, o mapeamento de SSRs, ao longo das últimas décadas, tem demonstrado que essas sequências repetitivas desempenham papel importante na evolução genômica dos peixes de água doce e nos processos de diferenciação de cromossomos sexuais (Kubat *et al.* 2008; Cioffi *et al.* 2012; Yano *et al.* 2014; Freitas *et al.* 2018; Moraes *et al.* 2019; Leite *et al.* 2022). Nesse sentido, a hibridização genômica comparativa (CGH) e a pintura de cromossomos inteiros (WCP) vêm auxiliando os citogeneticistas em diversos tipos de estudos, como na comparação de genomas entre espécies simpátricas (Symonová *et al.* 2013), na localização de regiões cromossômicas sexo-específicas (Freitas *et al.* 2017), na investigação de homologias entre cromossomos de diferentes espécies (Symonová *et al.* 2013; Moraes *et al.* 2017; Sember *et al.* 2018; Sassi *et al.* 2019; Moraes *et al.* 2019; Sember *et al.* 2020; Leite *et al.* 2022), na evidência da origem e diferenciação de sistemas de cromossomos sexuais e Bs (Phillips *et al.* 2001; Fantinatti *et al.* 2012; Freitas *et al.* 2017; Sassi *et al.* 2019; Moraes *et al.* 2019; Sember *et al.* 2020; Leite *et al.* 2022), na caracterização da composição molecular dos cromossomos (Yano *et al.* 2017) e em estudos citotaxonômicos (de Moraes *et al.* 2017; Sember *et al.* 2018; Sassi *et al.* 2019; Moraes *et al.* 2019; Sember *et al.* 2020; Leite *et al.* 2022).

Em Ctenoluciidae, uma pequena família de peixes neotropicais de água doce, com sete espécies válidas, investigações citogenômicas relataram forte associação de sequências teloméricas e retroelementos aos DNAr 18S e 5S em todas as espécies analisadas até o momento, sendo proposto que essas sequências provavelmente desempenhem um importante papel na estrutura do genoma dos Ctenoluciídeos (Sousa e Souza *et al.* 2017; 2021; *in prep.*). Neste estudo, na tentativa de desenvolver um quadro mais abrangente da evolução cariotípica e genômica ocorrida em Ctenoluciidae, realizamos mapeamento cromossômico de sequências microsatelites, hibridização genômica comparativa (CGH) e experimentos de pintura cromossômica entre espécies (Zoo-FISH) para explorar a divergência intergenômica em escala cromossômica utilizando 5 das 7 espécies atualmente descritas para esta família.

Material e Métodos

As espécies, pontos de coleta e quantidade de exemplares analisados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Espécies, sexo, quantidade e locais de coleta dos indivíduos analisados.

Espécies	Exemplares	Localidade	Vouchers
<i>Boulengerella cuvieri</i>	6 ♂ and 8 ♀	Rio Negro, Amazonas, Manaus, Brasil (3°10'30.8"S, 59°56'30.3"W)	INPA-ICT 053247
<i>Boulengerella lateristriga</i>	7 ♂ and 7 ♀	Novo Airão, Amazonas, Manaus, Brasil (2°37'28.5"S, 60°58'16.8"W)	INPA-ICT 053246
<i>Boulengerella lucius</i>	6 ♂ and 6 ♀	UHE Balbina, Amazonas, Brasil (1°55'02.2"S, 59°28'23.7"W)	INPA-ICT 053248
<i>Boulengerella maculata</i>	7 ♂ and 8 ♀	Anavilhanas, Amazonas, Brasil (2°33'28.4"S, 60°46'29.7"W)	INPA-ICT 053249
<i>Ctenolucius hujeta</i>	6 ♂ and 4 ♀	Aquarista	INPA- ICT 059514

Os peixes foram mantidos em aquários aerados e após 12h de estimulação com fermento biológico (Oliveira *et al.* 1988) foram eutanasiados em uma solução de Eugenol 10%, seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013), para coleta dos tecidos para análise citogenética. As metáfases mitóticas foram obtidas de células da porção anterior do rim após tratamento *in vitro* com colchicina (Gold *et al.* 1990; Bertollo *et al.* 2015).

Preparação da sonda e FISH

O DNA genômico, utilizado em todas as etapas metodológicas, foi extraído a partir de tecido do músculo fixado em álcool 96%, de acordo com protocolo estabelecido pelo Kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification- Promega. O DNA extraído foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com Gel Red (Biotium) para a verificação quanto ao grau de integridade deste DNA. Os seguintes microssatélites foram utilizados como sondas: d(GATA)₇, d(CAC)₁₀, d(CAA)₁₀, d(CAT)₁₀ e d(GAG)₁₀. Essas sequências foram marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, por VBC-Biotech (Viena, Áustria), segundo Kubat *et al.* (2008).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) das sondas de microssatélites foram baseadas no protocolo de Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações. As lâminas foram lavadas em solução PBS 1X por 5min e fixadas em formaldeído 1% por 10min.

Em seguida foram novamente lavadas em solução PBS 1X por 5min e desidratadas em série alcoólica (70, 85 e 100%) por 5 min em cada concentração. Após secas, as lâminas foram desnaturadas em formamida a 70%/2xSSC a 70 °C e desidratadas em série alcoólica (70, 85 e 100%), por 5 min cada. Subsequentemente foi realizada a desnaturação do mix de hibridização, contendo 1µL do microssatélite marcado+20µL da solução DS por lâmina, em Termobloco por 10 min a 99 °C. Após a desnaturação, a sonda foi colocada em cada lâmina, a qual foi levada para uma câmara úmida, contendo água destilada a 37 °C por 24h, para hibridização. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (1,2 µg/mL) e a lâmina montada com antifade (Vector, Burlingame, CA, EUA).

Hibridização genômica comparativa (CGH)

A técnica de CGH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Symonová *et al.* (2015) e Sassi *et al.* (2022), para comparações intra e interespecíficas entre machos e fêmeas das quatro espécies de *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*) e entre *Ctenolucius hujeta*. Para isso utilizamos os DNAs genômicos de machos e fêmeas, obtidos de acordo com protocolo estabelecido pelo Kit de extração Wizard® (Promega).

Dois delineamentos experimentais foram usados para este estudo. O primeiro ensaio foi focado em comparações intraespecífica entre machos e fêmeas das espécies de *Boulengerella*. Para isso, usamos o gDNA de machos e fêmeas de *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*, marcando o gDNA dos machos com Atto550-dUTP e das fêmeas com Atto488-dUTP, segundo as recomendações do fabricante (Jena Biosciences, Jena, Alemanha).

Para o bloqueio de sequências repetitivas utilizamos o C0t-1 DNA em todos os experimentos, o qual corresponde à fração de gDNA enriquecida para sequências alta e moderadamente repetitivas, preparado conforme Zwick *et al.* (1997). O mix final para cada lâmina foi composto de 500ng de gDNA de machos, 500ng de gDNA das fêmeas e 15µg de C0t-1 DNA. As sondas foram precipitadas com etanol, seguido da mistura dos *pellets* secos com um tampão de hibridização, contendo formamida 50%, 2xSSC, dodecil sulfato de sódio 10%, sulfato dextrano 10% e tampão Denhardt's (1% Ficoll, 1% polivinilpirrolidona e 1% albumina do soro bovino) com pH corrigido para 7,0.

No segundo experimento realizamos comparações interespecíficas, utilizando a espécie *Boulengerella cuvieri* como base e hibridizamos os genomas de *B. lateristriga*,

B. lucius, *B. maculata* e do gênero irmão *Ctenolucius hujeta*. Para isso sondas derivadas do genoma de fêmeas de *B. cuvieri* foram marcadas com Atto550-dUTP (vermelho) e as sondas derivadas do genoma de fêmeas das espécies a serem comparadas com Atto488-dUTP (verde) por Nick-Translation, seguindo as informações do fabricante (Jena Biosciences, Jena, Alemanha). Como bloqueador de regiões repetitivas, utilizamos o *Cot*-1 DNA não marcado, obtido a partir do genoma dos machos. Para cada experimento, o mix de hibridização foi composto por 10µL da sonda do gDNA de fêmea de cada espécie + 30µg do *Cot*, sendo 15µg por espécie. A hibridização ocorreu por 72h em câmara úmida a 37 °C. Após esse período, foram realizadas duas lavagens sob agitação com 1×SSC a 65 °C por 5 min, seguido de uma lavagem com 4×SSC/Tween à temperatura ambiente, também por 5 min. Por fim, as lâminas foram lavadas em 1×PBS por 1 min e desidratadas em série alcoólica de 70%, 85% e 100%, por 2 min em cada (Sassi *et al.* 2022). Após a secagem completa ao ar, os cromossomos foram contracolorados com 20µL de DAPI montado em Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Microdissecção cromossômica, preparo das sondas e experimentos de Zoo-FISH

O maior par cromossômico (par 1) de *Boulengerella maculata* e *Lebiasina bimaculata* foram microdissectados e utilizados como sondas em análises de pintura cromossômica, uma vez que, sua identificação é segura para realizar a microdissecção. Assim, este cromossomo foi microdissectado a partir de cerca de 20 metáfases de fêmeas, utilizando a metodologia descrita por Yang *et al.* (2009), com pequenas modificações. Os cromossomos foram amplificados em uma solução contendo 100mM de dNTPs, 5mM de primer DOP GMW (5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') e tampão de diluição Sequenase (24mM Tris HCl, pH 7,5, 12mM MgCl₂, 30mM NaCl). O processo de amplificação foi realizado em um termociclador (Axygen Therm-1000). Os oito primeiros ciclos de amplificação foram realizados, utilizando a DNA polimerase T7 (USB, Cleveland, EUA), com o seguinte programa: 90 °C /1 min; 25 °C /2 min; 34 °C /2 min. Um passo inicial de desnaturação a 92 °C, por 5 min, foi adicionado a cada ciclo para inativar a atividade da proteinase K; 0,3U de Sequenase foi adicionada a cada ciclo durante a etapa de reanelamento. Em seguida, foram adicionados 50µL de um mix contendo 0,1U Taq polymerase, 0,2mM dNTPs, 20µM DOP primer, 25mM MgCl₂ e 34,23µL de água para PCR, e 33 ciclos de amplificação foram realizados com o seguinte

programa: 92 °C /1 min; 56 °C /2 min; 72 °C /2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Posteriormente, ambas as sondas dos cromossomos foram marcadas por PCR. A sonda do cromossomo 1 de *L. bimaculata* (LEB1) foi marcada com Spectrum-Green dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) e a sonda do cromossomo 1 de *B. maculata* (BOU1) com Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove, EUA), em 30 ciclos de DOP-PCR, utilizando 1µL dos produtos iniciais de amplificação por DOP-PCR (Yang *et al.* 2009). Os experimentos de Zoo-FISH foram realizados de acordo com protocolo descrito por Yano *et al.* (2017).

Análises cromossômicas

Pelo menos 30 metáfases de cada indivíduo foram analisadas para a estrutura do cariótipo e os padrões de distribuição de sequências de DNAs repetitivos nos cromossomos. As imagens foram obtidas, utilizando um microscópio Olympus BX51 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), equipado com CoolSNAP. As melhores metáfases foram fotografadas e os cariótipos montados no programa Adobe Photoshop CS6. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) ou submetacêntricos (sm), seguindo a classificação proposta por Levan *et al.* (1964), a partir da razão de braços.

Resultados

As características cromossômicas como cariótipo, fórmula cariotípica e número fundamental, das espécies aqui analisadas, estão descritas em Sousa e Souza *et al.* (2017; 2021), ou seja, $2n= 36$ cromossomos, $NF= 72$ em *Boulengerella* spp. e $2n= 36$ cromossomos, $NF= 68$ em *Ctenolucius hujeta*. Aqui apresentamos os resultados da distribuição das sequências microssatélites utilizadas, do CGH e do WCP em quatro espécies de *Boulengerella* e em *Ctenolucius hujeta*.

Em *B. lateristriga*, *B. maculata* e *B. lucius* o microssatélite $d(GATA)_7$ apresentou marcações dispersas, com acúmulo preferencial na porção telomérica de todos os cromossomos, em machos e fêmeas, sendo que alguns cromossomos tiveram marcações intersticiais e biteloméricas. Ressaltamos a marcação proximal dos braços curtos do par 10 e da região terminal dos braços longos do par 18 onde, na fêmea esta região parece estar duplicada e em *B. lucius* destacamos ainda a marcação centromérica do par 04

(Figura 1). Ainda, pequenas diferenças foram encontradas entre os indivíduos. Já, em *B. cuvieri* o microssatélite $d(GATA)_7$ está presente apenas no par cromossômico 18, na porção terminal, em machos e fêmeas (Figura 1).

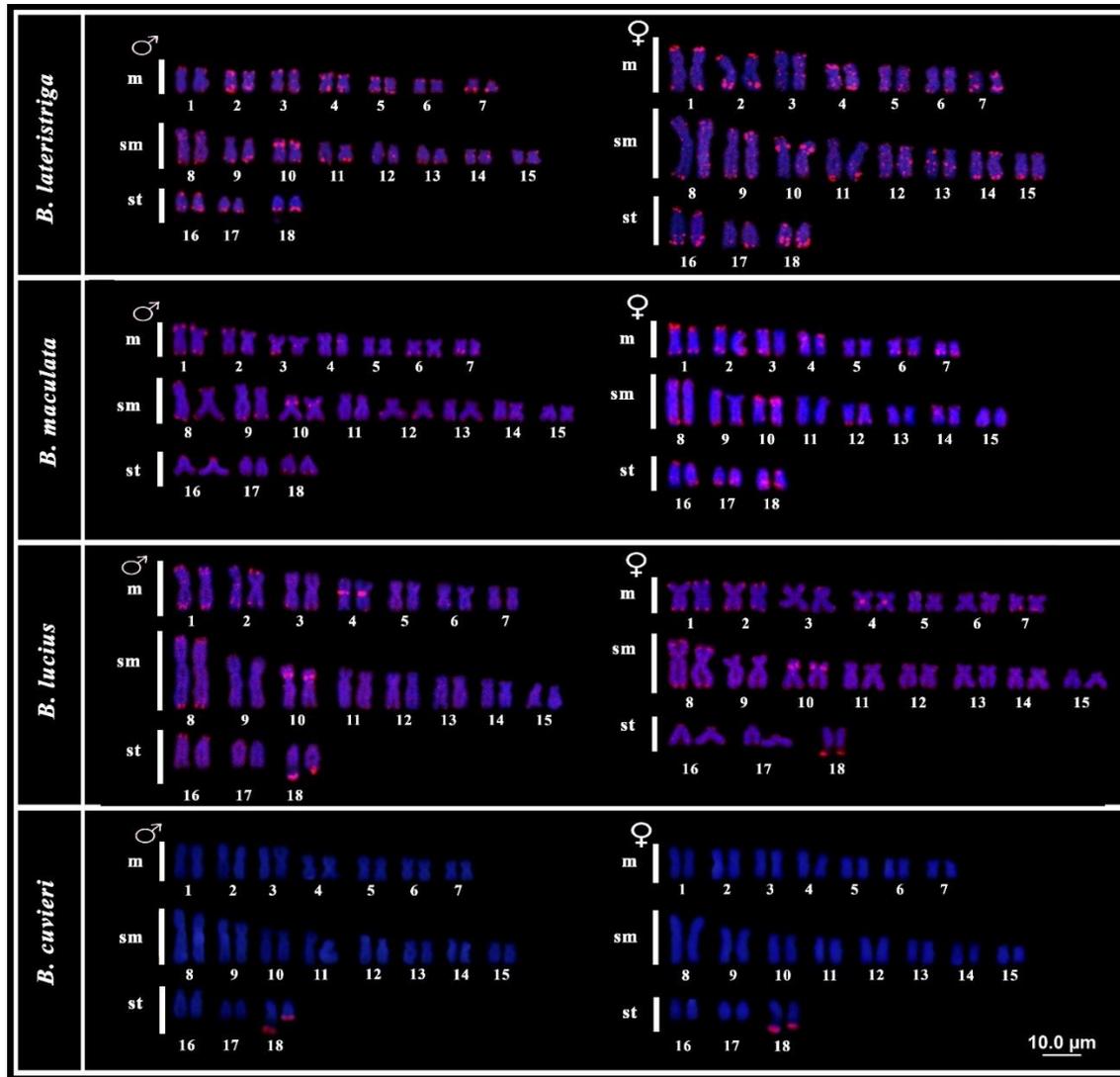


Figura 1. Cariótipo de machos e fêmeas de *Boulengerella lateristriga*, *B. maculata*, *B. lucius* e *B. cuvieri* submetidos à FISH com a sonda $(GATA)_7$. Os sinais de $(GATA)_7$ são mostrados com rodamina (vermelho) e os cromossomos contra corados com DAPI (azul). A barra= 10 µm, no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Em *B. cuvieri* não foram evidenciados sítios ativos dos microssatélites $d(GAG)_{10}$ e $d(CAA)_{10}$. O microssatélite $d(CAC)_{10}$ apresentou marcações teloméricas em 05 pares e o microssatélite $d(CAT)_{10}$ apresentou marcação telomérica em apenas um par cromossômico (Figura 2).

Em *B. lateristriga* os microssatélites $d(GAG)_{10}$ e $d(CAA)_{10}$ apresentaram marcações com acúmulo preferencial nas regiões terminais e centroméricas de todos os

cromossomos do complemento. O microssatélite $d(CAC)_{10}$ apresentou marcações terminais em dois pares, intersticial no braço longo de dois pares, sendo um deles o par 18 (seta). Nenhum sítio detectável do microssatélite $d(CAT)_{10}$ foi evidenciado em *B. lateristriga* (**Figura 2**).

Em *B. lucius*, o microssatélite $d(GAG)_{10}$ apresentou marcações teloméricas em 4 pares, o microssatélite $d(CAA)_{10}$ não foi evidenciado e o microssatélite $d(CAC)_{10}$ apresentou marcações teloméricas em praticamente todos os cromossomos do complemento, com acúmulo na constrição secundária localizada no par 18 (seta). O microssatélite $d(CAT)_{10}$ apresentou marcação telomérica apenas em um par (**Figura 2**).

Em *B. maculata* o microssatélite $d(GAG)_{10}$ apresentou marcações biteloméricas na maioria dos cromossomos do complemento, com acúmulo na região terminal do par 18 (seta). O microssatélite $d(CAA)_{10}$ não apresentou sítios detectáveis, o microssatélite $d(CAC)_{10}$ apresentou marcações teloméricas em 05 pares e o microssatélite $d(CAT)_{10}$ apresentou marcações teloméricas em todos os cromossomos, além de marcação intersticial nos braços longos e curtos de um par e biteloméricas em três pares (**Figura 2**).

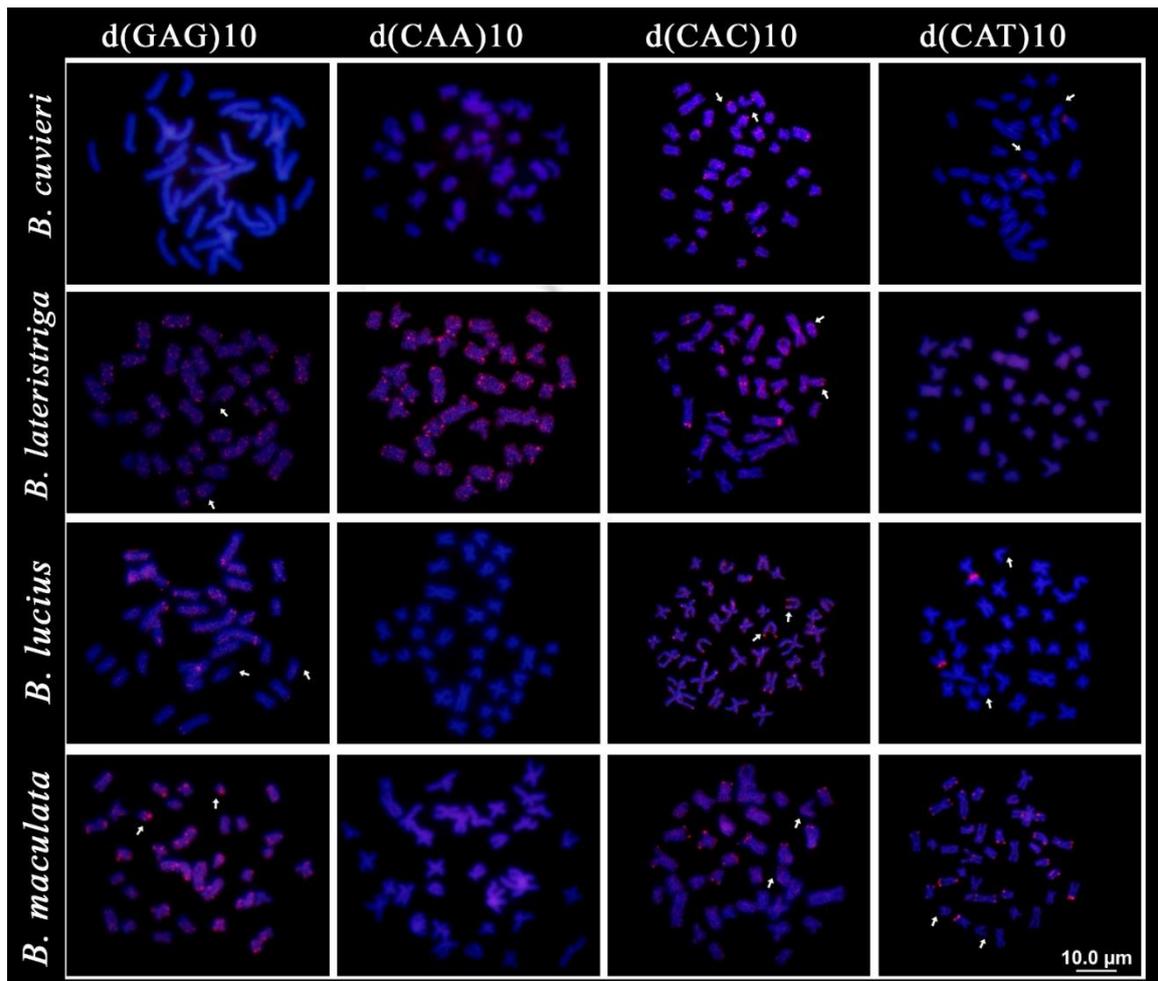


Figura 2. Mapeamento cromossômico de diferentes microssatélites em *Boulengerella cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*. Placas metafásicas hibridizadas com as sondas microssatélites $d(\text{GAG})_{10}$; $d(\text{CAA})_{10}$; $d(\text{CAC})_{10}$ e $d(\text{CAT})_{10}$ (vermelho), mostrando o padrão de distribuição colunas (1-4) respectivamente. As setas indicam a localização do par cromossômico (18). A barra= 10 μm , no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Em *C. hujeta* o microssatélite $d(\text{GATA})_7$ apresentou marcações apenas no par cromossômico 1, na região proximal do braço curto tanto em machos como em fêmeas. Os microssatélites $d(\text{GAG})_{10}$ e $d(\text{CAC})_{10}$ não foram evidenciados e o microssatélite $d(\text{CAA})_{10}$ evidenciou marcações teloméricas em 5 pares cromossômicos. O microssatélite $d(\text{CAT})_{10}$ apresentou marcação telomérica na maioria dos pares do complemento (**Figura 3**).

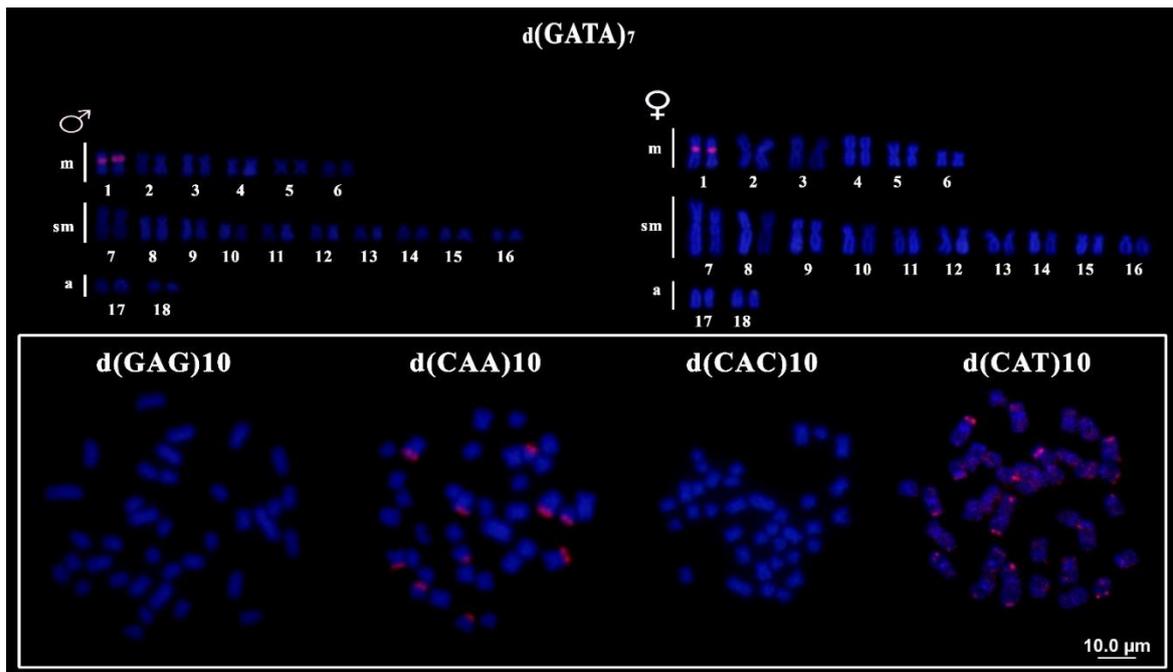


Figura 3. Mapeamento cromossômico de diferentes microssatélites em *Ctenolucius hujeta*. Cariótipo macho e fêmea hibridizados com microssatélites d(GATA)₇ (Parte superior). Placas metafásicas hibridizadas com as sondas microssatélites d(GAG)₁₀; d(CAA)₁₀; d(CAC)₁₀; d(CAT)₁₀, respectivamente, mostrando o padrão destes SSR nos cromossomos (Parte inferior). A barra = 10 µm, no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Hibridização Genômica Comparativa

A comparação do DNA genômico entre machos e fêmeas das espécies de *Boulengerella* evidenciou um alto nível de compartimentalização, com ambos os sexos, sendo possível evidenciar alguns pontos mais acumulados em cada sexo, porém nenhuma região sexo-específica que possa ser indicativa da presença de um sistema heteromórfico de cromossomo sexual, pode ser observada (**Figura 4**).

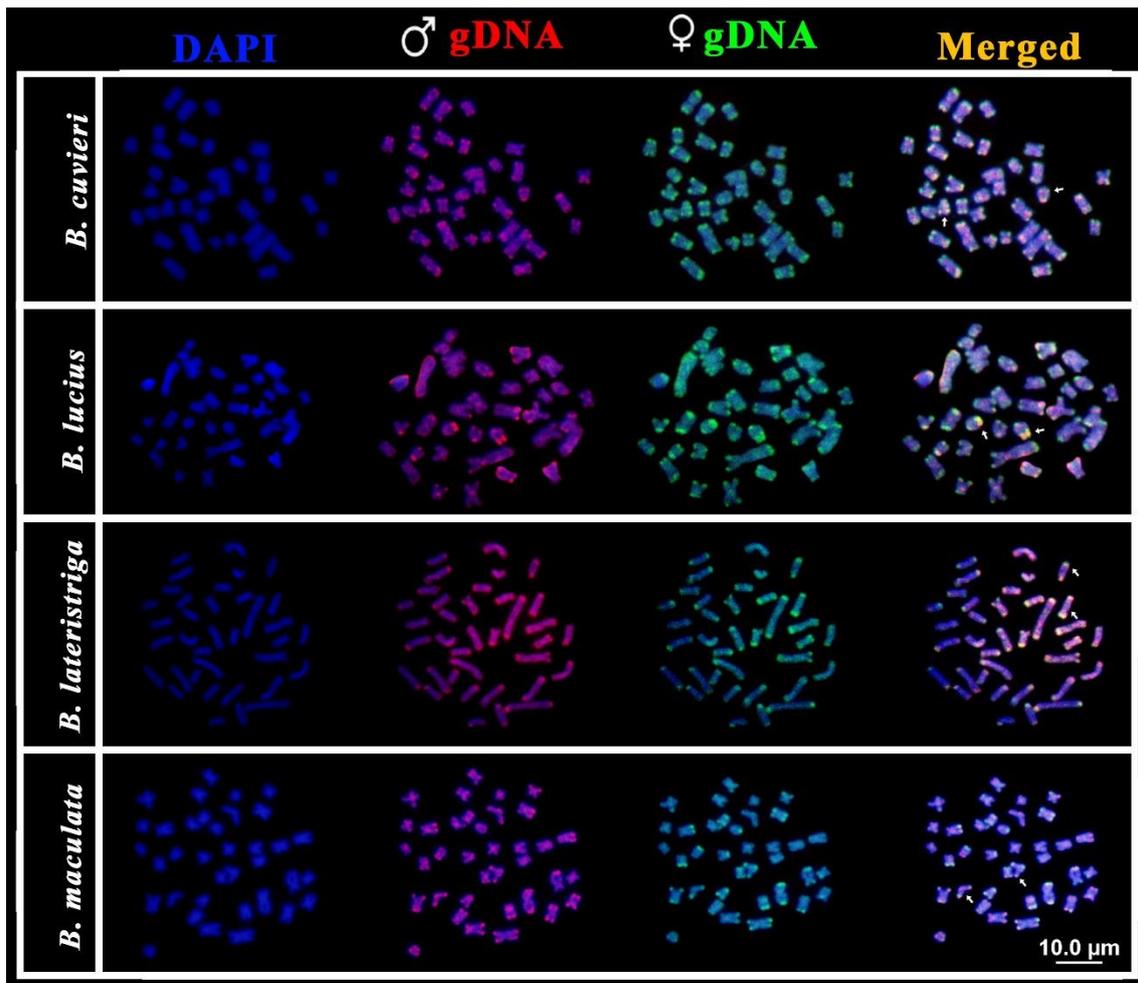


Figura 4. Hibridização genômica comparativa (CGH) intraespecífica de machos e fêmeas de *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*. Primeira coluna imagens DAPI (azul); segunda coluna padrões de hibridização usando gDNA masculino (vermelho), terceira coluna gDNA feminino (verde), quarta coluna contém as imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e coloração com DAPI. As regiões genômicas comuns são representadas em amarelo. As setas indicam o par cromossômico 18. A barra = 10 μm , no canto inferior direito vale para todos os cariótipos analisados.

Os experimentos interespecíficos de CGH entre espécies de *Boulengerella* e *C. hujeta*, seu grupo irmão, revelaram que estas espécies compartilham porções genômicas em seus cromossomos, principalmente nas regiões teloméricas, além de apresentarem sinais específicos para cada espécie. Ainda, é possível observar que as espécies compartilham forte sinal de sequências de DNA repetitivo, associadas à porção terminal do braço longo do par 18, coincidente com o DNAr 18S (**Figura 5**).

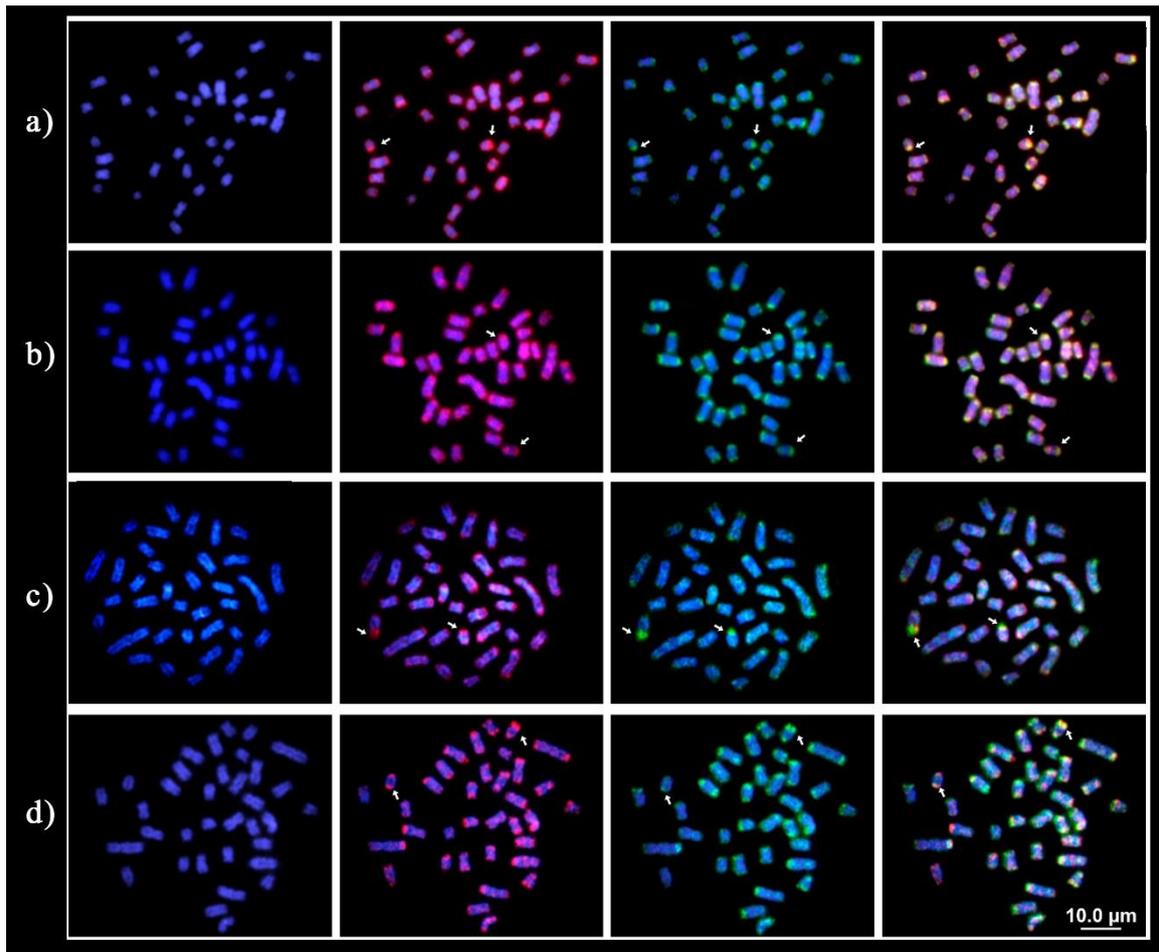


Figura 5. Hibridização genômica comparativa (CGH) interespecífica nas placas metafásicas femininas de *Boulengerella cuvieri* (vermelho) e *Boulengerella* spp. e *Ctenolucius hujeta* (verde). a) *B. cuvieri* e *B. lateristriga*. Primeira coluna imagens DAPI (azul); segunda coluna padrões de hibridização usando gDNA feminino (vermelho) de *B. cuvieri*, terceira coluna gDNA feminino (verde) de: (a) *B. lateristriga*, (b) *B. maculata*, (c) *B. lucius* e (d) *C. hujeta*, quarta coluna contém as imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e coloração com DAPI. As setas indicam o par cromossômico 18, as regiões genômicas comuns são representadas em amarelo.

Microdissecção e Pintura Cromossômica

As sondas cromossômicas (LEB-1 e BOU-1), usando o *C α t-1* específico para espécies como supressor, hibridizaram completamente o par 1 de todas as espécies de Ctenoluciidae, indicando que o primeiro par cromossômico apresenta homeologia de conteúdo genômico com o par 1 de *L. bimaculata* (**Figura 6**).

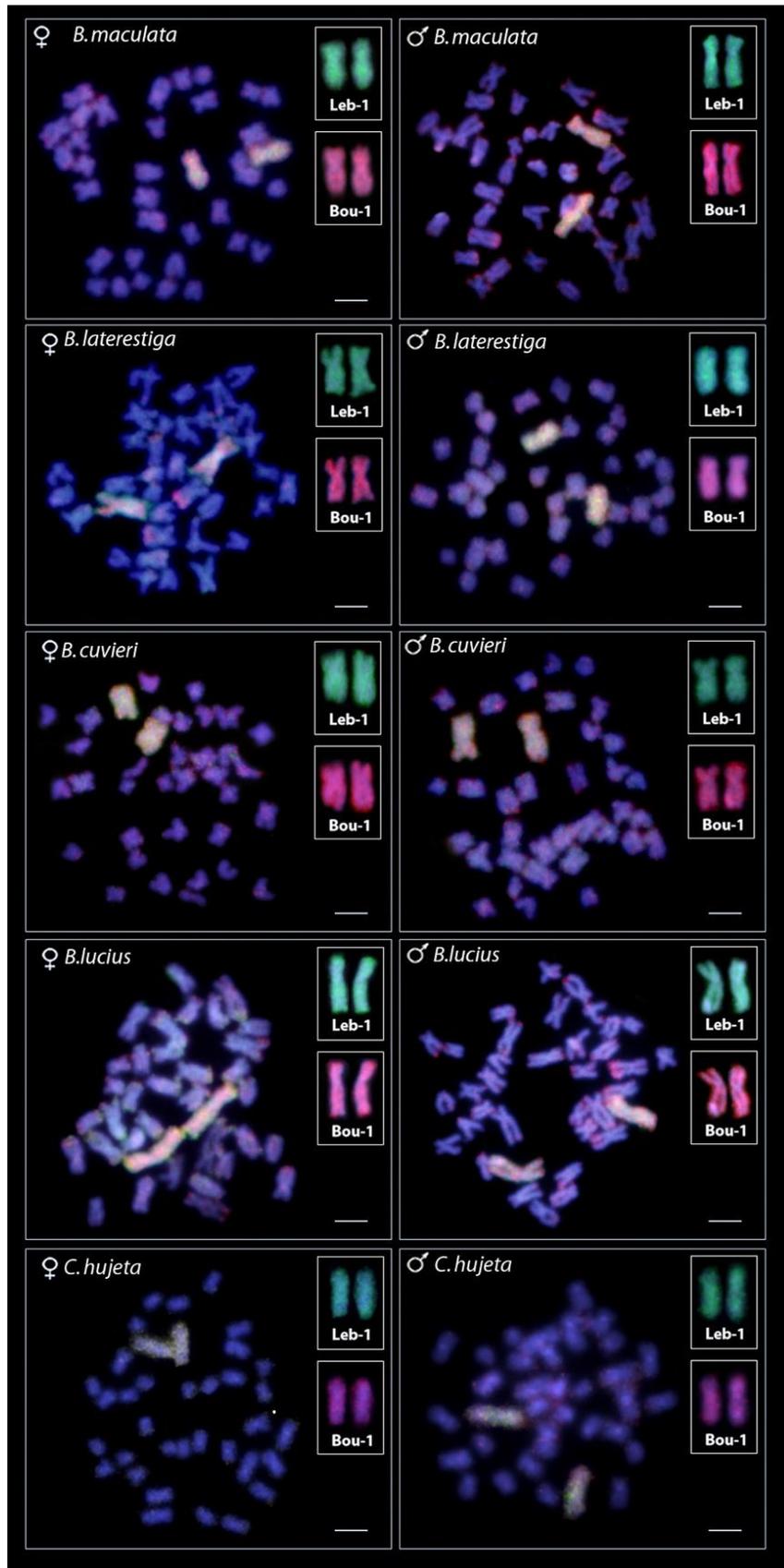


Figura 6. WCP com as sondas LEB-1 (verde) e BOU-1 (vermelho) derivadas do par 1 de *Lebiasina bimaculata* e *Boulengerella maculata*, respectivamente, hibridizadas contra cromossomos metafásicos de *B. cuvieri*, *B. lateristiga*, *B. lucius*, *B. maculata* e *Ctenolucius hujeta*. Barra = 5µm.

Discussão

De acordo com pesquisas anteriores, todas as espécies de Ctenoluciidae exibem uma macroestrutura cariotípica semelhante, onde o estado conservado de seu número diploide está associado a uma diversidade notável em escala genômica (Souza *et al.* 2017; 2021). Os achados atuais permitiram: (I) acompanhar as relações evolutivas dentro da família; (II) mostrar que sequências repetitivas de DNA possuem diferentes padrões de distribuição e acúmulo entre os Ctenoluciídeos, provavelmente promovendo diferenciação cromossômica e diversidade nesta família de peixes; e (III) confirmar as prováveis relações filogenéticas/evolutivas entre os grupos Ctenoluciidae e Lebiasinidae.

A distribuição genômica espécie-específica de SSR foi observada entre *Boulengerella* spp. e *C. hujeta*, onde foram observadas diferenças no número, localização e intensidade dos sinais de hibridização para a maioria dos motivos analisados. Mesmo em clados intimamente relacionados ou com tempos de divergência recentes, diferenças na quantidade e posição de SSRs são comuns (Adams *et al.* 2016; Pucci *et al.* 2016; 2018), como é o caso dos Ctenoluciídeos, cuja divergência foi datada com fósseis do final do Mioceno (1,8 Ma) e, provavelmente, ocorreu após o soerguimento da Cordilheira dos Andes, como resultado de mudanças no ambiente (Vari 1995). Juntamente com a diversidade no número total de microsatélites, notamos também que os genomas das espécies analisadas diferiram na predominância de vários SSRs. Por exemplo, d(CAC)₁₀ é compartilhado por todas as espécies de *Boulengerella*, mas ausente em *C. hujeta*, enquanto d(CAA)₁₀ só tem sinais em *B. lateristriga* e *C. hujeta* (**Figura 2**).

A alta taxa de polimorfismo dessas sequências, estimada em 10^{-2} a 10^{-6} loci a cada geração, pode explicar os diferentes padrões de distribuição de SSR entre *C. hujeta* e *Boulengerella* spp. (Harr *et al.* 2000; Matsubara *et al.* 2016; Adams *et al.* 2016). As sequências de microsatélites se expandem e se contraem como resultado de recombinação ectópica, replicação de deslizamento e transposição (Schug *et al.* 1998; Payseur e Nachman 2000; Adams *et al.* 2016; Figliuolo *et al.* 2020). Vale notar que ambos os gêneros exibem um acúmulo preferencial de SSRs nas regiões telomérica e centromérica, apesar de suas diferenças. As teorias que prevêm o acúmulo de sequências repetidas com baixas taxas de recombinação, como centrômeros e telômeros, que são tipicamente áreas de heterocromatina nos cromossomos, estão de acordo com esse achado (Charlesworth *et al.* 1994; Stephan e Cho 1994; Cermak *et al.* 2008).

O microsatélite (GATA)_n é altamente conservado entre os eucariotos e foi isolado do cromossomo W de cobras *Caenophidia* (Epplen *et al.* 1982; Traldi *et al.* 2013b; Ziemniczak *et al.* 2014). É frequentemente associado a cromossomos sexuais em mamíferos e algumas espécies de répteis e peixes (Singh *et al.* 1976; Subramanian e Singh 2003; Rovatsos *et al.* 2016; Viana *et al.* 2019; 2020; Mazzoleni *et al.* 2020). Além de sua associação com cromatina, fatores de transcrição de heterocromatina e fatores de formação, esse motivo também está presente em autossomos, o que já foi relatado para algumas espécies de peixes (Pucci *et al.* 2016; 2018), apresentando funções reguladoras no processo de diferenciação de cromossomos sexuais (Subramanian e Singh 2003; Pucci *et al.* 2016).

Dentre os Ctenoluciídeos destaca-se a grande quantidade de sinais para este microsatélite, quando comparado aos trinucleotídeos, notadamente na posição terminal de vários cromossomos em espécies de *Boulengerella*, principalmente em associação com DNAr (**Figura 2**). Em genomas de peixes, a localização dispersa deste microsatélite em um autossomo parece ser um evento comum. Esta condição pode resultar de rearranjos cromossômicos, como translocações, inversões paracêntricas e pericêntricas, fusões, fissões, duplicações, deleções, conversão gênica e amplificação heterocromática (Cross *et al.* 2006; Úbeda-Manzanaro *et al.* 2010; Pucci *et al.* 2016; 2018).

Dada a sua interação com elementos transponíveis *Rex*, neste contexto, é provável que os múltiplos sinais deste microsatélite nos genomas de *Boulengerella* estejam relacionados a esta associação. Outras espécies já mostraram que (GATA)_n é intercalado com elementos transponíveis ou DNAs de cópia única (Schafer *et al.* 1986; Coates *et al.* 2009). Propomos que as cópias dispersas de (GATA)_n em *Boulengerella* spp. ocorrem devido a eventos de transposição, mediados pelos retroelementos acima mencionados, em que (GATA)_n viaja dentro de elementos em movimento, como visualizado em outros organismos (Wilder e Hollocher 2001; López-Giráldez *et al.* 2006). Esta hipótese é suportada pelo mapeamento de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* que demonstrou uma enorme dispersão destes retroelementos em associação com alguns SSRs (Wilder e Hollocher 2001; López-Giráldez *et al.* 2006; Coates *et al.* 2009).

Adicionalmente, o notável acúmulo sintênico de sequências (GATA)_n com DNAr 18S, demonstrado em *Boulengerella* spp. e *C. hujeta* (Sousa e Souza *et al.* 2017; 2021), indica que apesar das forças de seleção terem levado ao surgimento de espécies distintas, a sequência (GATA)_n ainda está preservada nesta família, muito provavelmente devido

à sua associação com DNAr 18S, que é altamente conservado entre os eucariotos (Heslop-Harrison 2000). Essa região terminal pode ser considerada um *hotspot* cromossômico devido ao acúmulo de sequências telomérica, microssatélites e retroelementos em sintonia com DNAr 18S (Sousa e Souza *et al.* 2017; 2021).

A associação do microssatélite (GATA)_n com sequências de DNAr estende-se também ao DNAr 5S nas espécies de *Boulengerella*, com acúmulo deste SSR na região pericentromérica do par 10 em *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata* e no par 4 em *B. lucius*, pares que carregam o DNAr 5S (Sousa e Souza *et al.* 2017). Considerando essa região também como um *hotspot* cromossômico é possível que o acúmulo de (GATA)_n tenha induzido o acúmulo de SSR distintos e de elementos transponíveis e, pelos eventos de transposição “copia e cola”, uma cópia do DNAr 5S foi transposta no cariótipo ancestral, por meio dos *Rex1* e *Rex3*, que também estavam ali localizados (Sousa e Souza *et al. em prep*). A associação e retrotransposição do DNAr 5S teria sido mediada por sequências *Rex*, o que não é um evento exclusivo de Ctenoluciidae, pois já foi evidenciado em *Erythrinus erythrinus* (Cioffi *et al.* 2010); *E. erythrinus* (cariomorfos C e D) (Martins *et al.* 2013); *Pirrolina australis*, *Pirrolina aff. australis* (Moraes *et al.* 2017) e *Pyrrhulina brevis* (Moraes *et al.* 2019). Dado que o primeiro par de cromossomos de todas as espécies de *Boulengerella* e *Lebiasina* são homeólogos (Sassi *et al.* 2019; Leite *et al.* 2022; presente estudo) e carregam a sequência DNAr 5S, é possível que este corresponda ao portador plesiomórfico de onde foram transpostas as cópias, presentes nos pares 4 e 10 de *Boulengerella* spp.

A hibridização genômica comparativa (CGH) e a técnica de pintura cromossômica (WCP) vêm se destacando na resolução de vários problemas no campo da citogenética comparativa em peixes. Nossos experimentos intraespecíficos com CGH revelaram homologia de sequência em centrômeros e telômeros de *Boulengerella* spp., revelando a proximidade filogenética das espécies remanescentes, além de sua evolução cariotípica independente. O intenso sinal evidenciado na região telomérica do par 18 não corresponde a domínios sexo-específicos, sendo este intenso sinal devido ao DNAr 18S, que se localiza nesta região e que mantém o alto grau de conservadorismo das sequências (Hillis e Dixon 1991; de Oliveira *et al.* 2019). Portanto, descartamos qualquer associação com uma região sexo-específica. Fato semelhante ocorre em *P. australis* e *Pyrrhulina aff. australis*, em que foi evidenciado um heteromorfismo cromossômico associado a um bloco heterocromático na região intersticial do par 5 em machos e fêmeas, no entanto,

experimentos CGH, comparando o gDNA de indivíduos com e sem o bloco heterocromático, não evidenciaram regiões sexo-específicas (Moraes *et al.* 2017). A comparação genômica interespecífica em Ctenoluciidae mostra que, apesar do 2n conservado na família, estas espécies apresentaram divergência genômica geral, além de várias regiões em homologia entre espécies de *Boulengerella* e uma clara diminuição dessas regiões homólogas quando comparadas com *C. hujeta*, sendo evidenciados sinais intensos brilhantes correspondente ao sítio de DNAr 18S. Essa diminuição de sequências compartilhadas é esperada, considerando o tempo de divergência entre os gêneros *Ctenolucius* e *Boulengerella*. Além disso, padrões diferenciados de distribuição de DNA repetitivo e banda C espécie-específica foram evidenciados, sugerindo que rearranjos cromossômicos, como inversões ou duplicação de sequências repetitivas, tiveram um papel importante na evolução cariotípica dos Ctenoluciídeos, como observado em vários grupos de animais (Matsuoka *et al.* 2004; Barby *et al.* 2019; Leite *et al.* 2022).

Por fim, nosso experimento de WCP, utilizando sondas derivadas do primeiro par cromossômico de *Lebiasina bimaculata*, revelou que a homeologia completa do primeiro par metacêntrico evidenciado em *B. lateristriga* (Sassi *et al.* 2019), estende-se às demais espécies de *Boulengerella* analisadas (*B. cuvieri*, *B. lucius* e *B. maculata*) e a *Ctenolucius hujeta*, fato que reforça a proposta de que este par cromossômico seja considerado um excelente candidato como marcador cromossômico para investigação futura dos processos evolutivos que ocorreram nessas famílias (Leite *et al.* 2022). Reforça ainda, a proximidade filogenética entre Ctenoluciidae e Lebiasinidae. Em *Hepsetus odoe*, o compartilhamento de regiões homólogas, demonstrado pelo WCP, associado à co-localização de sinais dispersos pelos cromossomos desta espécie, evidenciado pelo CGH, corroboram a proximidade filogenética proposta entre Hepsetidae e Erythrinidae, sendo ainda evidente, que o gênero *Erythrinus* é o que compartilha mais sequências cromossômicas semelhantes à *H. odoe*, reforçando a proximidade entre essas famílias (Carvalho *et al.* 2017).

É notável que o conservadorismo em Ctenoluciidae está restrito apenas ao número diploide e neste sentido, podemos inferir que a diversidade de SSR evidenciada nestas espécies, provavelmente foi essencial para a formação das regiões consideradas *hotspot* cromossômico, que podem ter atraído retroelementos do tipo *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* para essa região ou terem sido atraídas por estes retroelementos que são amplamente distribuídos no genoma dos Ctenoluciídeos. Essa diversidade em sequências repetitivas de DNAs no

genoma dessas espécies pode ter induzido a formação de rearranjos cromossômicos, sendo possível, neste sentido, observar a presença de cromossomos acrocêntricos, de múltiplos sítios de DNAr 18S ou ainda a transposição de sequências de DNAr 5S dentro de um mesmo gênero como observado em *B. lucius*. O acúmulo sintênico de sequências (GATA)_n ao DNAr 18S em *Boulengerella* spp. e *C. hujeta* revela que esta sequência pode estar sendo mantida no genoma dessas espécies por sua associação ao DNAr 18S, como observado em *B. cuvieri* em que esta sequência está localizada apenas na região sintênica ao DNAr 18S. Vale destacar que, apesar da condição heteromórfica associada ao DNAr 18S (par 18) nas espécies de *Boulengerella*, nossos experimentos com CGH não evidenciaram sequências sexo-específicas. Portanto, é provável que este heteromorfismo ocorra devido a expressão diferencial deste DNAr em ambos os sexos, possivelmente influenciado pelo acúmulo de diferentes SSR nesta região como as sequências (GATA)_n. Ainda, é importante destacar que a proximidade filogenômica entre Ctenoluciidae e Lebiasinidae, evidenciada pelo WCP nos ajuda a compreender um pouco mais deste quebra-cabeça evolutivo e destaca o par metacêntrico 01 como possível marcador para estudos comparativos entre essas famílias no futuro.

Conclusões Gerais

Os dados cromossômicos mostram que o número diploide $2n= 36$ permanece o mesmo entre as espécies analisadas, fato que sugere uma tendência à conservação deste número diploide na família Ctenoluciidae. No entanto, diferenças significativas são observadas na macro e microestrutura cariotípica, sugerindo que rearranjos cromossômicos estiveram envolvidos na evolução cariotípica desta família.

A co-localização de sequências teloméricas com sítios de DNAr 18S representa uma característica conservada entre os Ctenoluciídeos e foram precursores para formação de regiões *hotspot*, que teriam facilitado rearranjos cromossômicos e a diversificação micro cromossômica, observada neste grupo de peixes.

Os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* estão amplamente distribuídos no genoma dos Ctenoluciídeos, sendo o retroelemento *Rex3* o único evidenciado no genoma de todas as espécies analisadas e parece desempenhar um papel importante na diversificação cariotípica deste grupo. Nas espécies de *Boulengerella*, o complexo (*Rex1/Rex3* e DNAr 18S) provavelmente induziu o surgimento do heteromorfismo de tamanho da constrição secundária entre machos e fêmeas, já, em *Ctenolucius hujeta*, o complexo (*Rex1/Rex3/DNAr18S* e 5S) parece ter desempenhado papel ativo na dispersão de sítios de DNAr 18S e no surgimento dos sítios múltiplos, evidenciados nesta espécie.

A distribuição dos DNAs repetitivos sugere que rearranjos cromossômicos, como inversões e duplicação de sequências repetitivas, foram responsáveis pela criação de regiões *hotspot*, que associadas aos DNAr, levaram à dispersão e formação de região heteromórfica entre as espécies de Ctenoluciidae.

A hibridização genômica comparativa (CGH) intraespecífica em espécies de *Boulengerella* revelaram que o heteromorfismo cromossômico e o intenso sinal, evidenciado na região telomérica do par 18, não correspondem a domínios sexo-específicos, sendo este intenso sinal devido a uma região *hotspot*, associada ao DNAr 18S. A comparação genômica interespecífica entre *C. hujeta* e espécies de *Boulengerella* revelaram divergências genômicas gerais, além de regiões em homologia entre espécies de *Boulengerella* e uma clara diminuição destas, quando comparadas com *C. hujeta*, sendo evidenciado sinais intensos e brilhantes no sítio correspondente ao DNAr 18S.

O experimento de WCP, utilizando sondas derivadas do primeiro par cromossômico de *Lebiasina bimaculata*, reforça a proximidade filogenética entre Ctenoluciidae e Lebiasinidae e faz do par 1, metacêntrico, um excelente candidato como

marcador cromossômico para investigação futura dos processos evolutivos que ocorreram nessas famílias.

Referências Bibliográficas

- Adams, R.H.; Blackmon, H.; Reyes-Velasco, J.; Schield, D.R.; Card, D.C.; Andrew, A.L.; *et al.* 2016. Microsatellite landscape evolutionary dynamics across 450 million years of vertebrate genome evolution. *Genome*, 59: 295-310.
- Albert, J.S.; Bart, H.J.; Reis, R.E. 2011. Species Richness and Cladal Diversity, In: Albert JS, Reis RE (Eds). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*, pp. 89–104, University of California Press, Berkeley, CA.
- Arefjev, V.A. 1990. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). *Caryologia*, 43: 291–304.
- 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.
- Bachtrog, D. 2006. A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics e Development*, 16(6): 578-585.
- Bachtrog, D. 2013. Y chromosome evolution: emerging insights into processes of Y chromosome degeneration. *Nat Rev Genet*, 14(2): 113–24.
- Bachtrog, D.; Mank, J.E.; Peichel, C.L.; Kirkpatrick, M.; Otto, S.P.; Ashman, T.L. *et al.* 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS biology*, 12(7): e1001899.
- Badaeva, E.D.; Dedkova, O.S.; Gay, G.; Pukhalskyi, V.A.; Zelenin, A.V.; Bernard, S.; *et al.* 2007. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*, 50(10): 907–26.
- Barby, F.F.; Bertollo, L.A.C.; de Oliveira, E.A.; Yano, C.F., Hatanaka, T.; Ráb, P.; Cioffi, M.B. 2019. Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species (Teleostei, Osteoglossiformes) as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH). *Scientific Reports*, 9(1): 1112.
- Barros, A.V.; Sczepanski, T.S.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F. 2011. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture*, 322-323: 47–50.
- Barros, A.V.; Wolski, M.A.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2017. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene*, 608: 20–7.

- Belyayev, A.; Kalendar, R.; Brodsky, L.; Nevo, E.; Schulman, A.H.; Raskina, O. 2010. Transposable elements in a marginal plant population: temporal fluctuations provide new insights into genome evolution of wild diploid wheat. *Mob DNA*, 1(1): 6–16.
- Bertollo, L.A.C.; Cioffi, M.B.; Moreira-Filho, O. 2015. Direct chromosome preparation from freshwater Teleost fishes (Chondrichthyans and Teleosts). In: *Fish Cytogenetic Techniques*. In: Ozouf-Costaz, C.; Pisano, E.; Foresti, F.; Almeida Toledo, L.F. (eds), pp. 21–26, CRC Press, Enfield, Boca Raton.
- Betancur-R, R.; Arcila, D.; Vari, R.P.; Hughes, L.C.; Oliveira, C.; Sabaj, M.H. 2019. Phylogenomic incongruence, hypothesis testing, and taxonomic sampling: The monophyly of characiform fishes. *Evolution*, 73(2): 329–45.
- Bohene, A.; Brunet, F.; Galiana-Arnoux, D.; Schultheis, C.; Volff, J.N. 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203–215.
- Bolzán, A.D.; Bianchi, M.S. 2006. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 612(3): 189–214.
- Borba, R.S.; da Silva, E.L.; Parise-Maltempi, P.P. 2013. Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* Spix, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. *Mobile Genetic Elements*, 3(6): e27460.
- Born, G.G.; Bertollo, L.A.C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res*, 8(2): 111–8.
- Britton-Davidian, J.; Cazaux, B.; Catalan, J. 2012. Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: microevolutionary insights. *Heredity*, 108(1): 68–74.
- Buckup, P.A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (eds): *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. pp 123–144 (Edipucrs, Porto Alegre).
- Buckup, P.A. 2007. Triportheinae. In: Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. (Ed.). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 43–44.

- Bull, J.J. 1983. *Evolution of sex determining mechanisms*. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA, 316p.
- Calcagnotto, D.; Schaefer, S.A.; de Salle, R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 36(1): 135–53.
- Carducci, F.; Barucca, M.; Canapa, A.; Biscotti, M. 2018. Rex retroelements and teleost genomes: an overview. *Int J Mol Sci*, 19(11): 3653.
- Carvalho, N.D.M.; Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Terencio, M.L.; Zuanon, J.; Feldberg, E. 2012. Cytogenetics of Synbranchiformes: a comparative of two *Synbranchus* Bloch, 1975 species from the Amazon. *Genetica*, 140(4-6): 149–58.
- Carvalho, P.C.; de Oliveira, E.A.; Bertollo, L.A.C.; Yano, C.F.; Oliveira, C.; Decru, E.; Cioffi, M.B. 2017. First chromosomal analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into relationship between African and Neotropical fish groups. *Frontiers in Genetics*, 8: 203.
- Castro, D.M. 1986. Los principales peces ornamentales de Puerto Inirida. *Boletín de la Facultad de Biología Marina*, 8: 7–14.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2002. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 55: 139-150.
- Cermak, T.; Kubat, Z.; Hobza, R.; Koblizkova, A.; Widmer, A.; Macas, J.; ... e Kejnovsky, E. 2008. Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Research*, 16, 961-976.
- Cerqueira, A.V.; Lemos, B. 2019. Ribosomal DNA and the nucleolus as keystones of nuclear architecture, organization, and function. *Trends Genet*, 35: 710-723.
- Charlesworth, E.N. 1991. The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251: 1030-1033.
- Charlesworth, B.; Jarne, P.; Assimakopoulos, S. 1994. The distribution of transposable elements within and between chromosomes in a population of *Drosophila melanogaster*. III. Element abundances in heterochromatin. *Genetics Research*, 64(3):183-197.
- Charlesworth, B.; Charlesworth, D. 1997. Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet. *Genetics Research*, 70(1): 63-73.
- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. 2005. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95: 118-128.

- Chistiakov, A.D.; Hellemans, B.; Volckaert, A.M.F. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1-29.
- Cioffi, M.B.; Martins, C., Bertollo, L.A. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1): 271.
- Cioffi, M.B.; Kejnovsky, E.; Bertollo, L.A.C. 2011. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Research*, 132: 289–296.
- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2012. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. *Genome Dyn Basel Karger*, 7: 197–221.
- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2012. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Genome Dynamics*, 7:197-221.
- Coates, B.S.; Sumerford, D.V.; Miller, N.J.; Kim, K.S.; Sappington, T.W.; Siegfried, B.D.; Lewis, L.C. 2009. Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. *Journal of Heredity*, 100(5): 556-564.
- CONCEA. 2013. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasil, Distrito Federal. 54pp.
- Costa, G.W.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. 2013. Transposable elements in fish chromosomes: a study in the marine cobia species. *Cytogenet Genome Res.*, 141: 126-132.
- Cross, I.; Merlo, A.; Manchado, M.; Infante, C.; Cañavate, J.P.; Rebordinos, L. 2006. Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)_n, (TTAGGG)_n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. *Genetica*, 128: 253–259.
- Dasilva, C.; Hajer, H.; Ozouf-Costaz, C.; Nicaud, S.; Jaillon, O.; Weissenbach, J.; Crollius, H.R. 2002. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci*, 99(21): 13636-41.

- da Silva, F.A.; Schneider, C.H.; Feldberg, E.; Baccaro, F.B.; Carvalho, N.D.; Gross, M.C. 2016. Genomic organization under different environmental conditions: *Hoplosternum Littorale* as a model. *Zebrafish*, 13: 197-208.
- Daniel, S.N.; Penitente, M.; Silva, D.M.; Hashimoto, D.T.; Ferreira, D.C.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. 2015. Organization and chromosomal distribution of histone genes and transposable Rex Elements in the genome of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res*, 146: 311-318.
- de Freitas-Mourão, A.A.; Natal, D.S.; Teruo, H.D.; Ferreira, C.D.; Porto-Foresti, F. 2017. Organization and Distribution of Repetitive DNA Classes in the *Cichla kelberi* and *Cichla piquiti* Genome. *Cytologia*, 82: 193-197.
- de Lange, T. 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21(4): 532-40.
- de Oliveira, E.H.C.; de Moura, S.P.; dos Anjos, L.J.S.; Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C.; O'Brien, P.C.M.; *et al.* 2008. Comparative chromosome painting between chicken and spectacled owl (*Pulsatrix perspicillata*): implications for chromosomal evolution in the Strigidae (Aves, Strigiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 157-162.
- de Oliveira, E.A.; Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Yano, C.F.; Ezaz, T.; Moreira-Filho, O.; *et al.* 2018. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromosoma*, 127(1): 115-128.
- de Oliveira, E.A.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Ezaz, T.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; Cioffi, M.B. 2019. Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes). *PLoS One*, 14(3): e0214225.
- Delvin, R.H.; Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Eickbush, T.H.; Jamburuthugoda, V.K. 2008. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Research*, 134: 221-234.
- Epplen, J.T.; McCarrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. 1982. Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(12): 3798-3802.

- Fantinatti, B.E.A.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Cabral-de-Mello, D.C.; Martins, C. 2012. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica*.139:1273.
- Favarato, R.M.; Ribeiro, L.B.; Feldberg, E.; Matoso, D.A. 2017. Chromosomal Mapping of Transposable Elements of the *Rex* Family in the Bristlenose Catfish, *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae), from the Amazonian Region. *J Hered*, 108: 254-261.
- Favarato, R.M.; Ribeiro, L.B.; Ota, R.P.; Nakayama, C.M.; Feldberg, E. 2019. Cytogenetic characterization of two *Metynnis* species (Characiformes, Serrasalmidae) reveals B chromosomes restricted to the females. *Cytogenet Genome Res*, 158: 38-45.
- Ferree, P.M.; Prasad, S. 2012. How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. *Genetics Research International*, 2012: 430136.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2011. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res*, 132: 64-70.
- Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, 5: 103-107.
- Freitas, N.L.; Al-Rikabi, A.B.H.; Bertollo, L.A.C.; Ezaz, T.; Yano, C.F.; Oliveira, E.A. 2017. Early stages of XY sex chromosomes differentiation in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) revealed by DNA repeats accumulation. *Current Genomics*, 19(3): 216-226.
- Furman, B.L.; Metzger, D.C.; Darolti, I.; Wright, A.E.; Sandkam, B.A.; Almeida, P.; Mank, J.E. 2020. Sex chromosome evolution: so many exceptions to the rules. *Genome biology and evolution*, 12(6): 750-763.
- Gold, J.R.; Li, C. Shipley, N.S.; Powers, P.K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- Gornung, E. 2013. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. *Cytogenet Genome Res*.141(2-3):90-102.

- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76: 1117-1127.
- Haaf, T.; Schmid, M.; Steinlein, C.; Galetti Jr., P.M.; Willard, H.F. 1993. Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, 21Erythrinidae). *Chromosome Research*, 1: 77-86.
- Harkess, A.; Zhou, J.; Xu, C.; Bowers, J. E.; Van der Hulst, R.; Ayyampalayam, S.; Chen, G. 2017. The asparagus genome sheds light on the origin and evolution of a young Y chromosome. *Nature communications*, 8(1): 1-10.
- Harr, B.; Zangerl, B.; Schlötterer, C. 2000. Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. *Molecular biology and evolution*, 17(7): 1001-1009.
- Herpin, A.; Braasch, I.; Kraeussling, M.; Schmidt, C.; Thoma, E. C.; Nakamura, S.; Schartl, M. 2010. Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene duplicate by transposable elements. *PLoS genetics*, 6(2): e1000844.
- Heslop-Harrison, J.S. 2000. Comparative genome organization in plants: From sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell*, 12(5): 617–36.
- Hillis, D.M.; Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, 66(4): 411-453.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 3: 1014-1015.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19: 4780.
- Jiang, N.; Bao, Z.; Zhang, X.; Eddy, S.R.; Wessler, S.R. 2004. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature*, 431: 566-569.
- Jurka, J.; Kapitonov, V.V.; Smit, A.F. 2003. Repetitive elements: detection. In: *Nature Encyclopedia 18 of the Human Genome*. Cooper DN (Ed), pp 9–14, Nature Publishing Group, London.
- Kamiya, T.; Kai, W.; Tasumi, S.; Oka, A.; Matsunaga, T.; Mizuno, N.; Kikuchi, K. 2012. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genetics*, 8(7): e1002798.

- Kantek, D.L.Z.; Vicari, M.R.; Peres, W.A.M.; Cestari, M.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2009. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). *Journal of Fish Biology*, 75: 408-421.
- Kapitonov, V.V.; Jurka, J. 2008. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nature Reviews Genetics*, 9: 411-412.
- Kasahara, S. 2009. *Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. 1º ed. Ribeirão Preto, SP. Sociedade Brasileira de Genética. 160p. 139-142.
- Kazazian, H.H.; Wong, C.; Youssofian, H.; Scott, A.F.; Phillips, D.G.; Antonarakis, S.E. 1988. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation on man. *Nature*, 362: 164-166.
- Kogan, I.; Pacholak, S.; Licht, M.; Schneider, J.W.; Brucker, C.; Brandt, S. 2015. The invisible fish: hydrodynamic constraints for predator-prey interaction in fossil fish *Saurichthys* compared to recent actinopterygians. *Biology Open*, 4(12): 1715-1726.
- Kubat, Z.; Hobza, R.; Vyskot, B.; Kejnovsky, E. 2008. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*, 51: 350-356.
- Lahn, B.T.; Page, D.C. 1999. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science*, 8(286): 964-967.
- Leite, P.P.D.M.; Sassi, F.D.M.C.; Marinho, M.M.F.; Nirchio, M.; Moraes, R.L.R.D.; Toma, G.A.; Cioffi, M.B. 2022. Tracking the evolutionary pathways among Brazilian Lebiasina species (Teleostei: Lebiasinidae): a chromosomal and genomic comparative investigation. *Neotropical Ichthyology*, 20: e210153.
- Le Rouzic, A.; e Capy, P. 2005. The first steps of transposable elements invasion: parasitic strategy vs. genetic drift. *Genetics*, 169(2), 1033-1043.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Levin, H.L.; Moran, J.V. 2011. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics*, 12: 615-627.
- Liu, H.; Pan, G.; Luo, B.; Li, T.; Yang, Q.; Vossbrinck, C.R.; Zhou, Z. 2013. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. *Journal of invertebrate pathology*, 113(1): 63-69.

- Long, E.O.; Dawid, I.B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 727-764.
- López-Giráldez, F.; Andrés, O.; Domingo-Roura, X.; Bosch, M. 2006. Analyses of carnivore microsatellites and their intimate association with tRNA-derived SINEs. *BMC genomics*, 7: 1-12.
- Lucena, C.A.S. 1993. *Phylogenetic study of the family Characidae with a discussion of the proposed natural groups (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)*. University of São Paulo.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem*, 87(7): 433–8.
- Mangs, A.H.; Morris, B. J. 2007. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics*, 8: 129–136.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. 2004. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 27: 536-542.
- Martins, C.; Galetti, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins, N.F.; Bertollo, L.A.C.; Troy, W.P.; Feldberg, E.; Valentin, F.C.S.; Cioffi, M.B. 2013. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23; 261-269.
- Matsubara, K.; Nishida, C.; Matsuda, Y.; Kumazawa, Y. 2016. Sex chromosome evolution in snakes inferred from divergence patterns of two gametologous genes and chromosome distribution of sex chromosome-linked repetitive sequences. *Zoological Letters*, 2: 19.
- Matsuoka, M.P.; Gharrett, A.J.; Wilmot, R.L.; Smoker, W.W. 2004. Genetic linkage mapping of allozyme loci in even-and odd-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Journal of Heredity*, 95(5): 421-429.

- Mazzoleni, S.; Augstenová, B.; Clemente, L.; Auer, M.; Fritz, U.; Praschag, P.; Rovatsos, M. 2020. Sex is determined by XX/XY sex chromosomes in Australasian side-necked turtles (Testudines: Chelidae). *Scientific reports*, 10(1): 4276.
- Mazzuchelli, J.; Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 136: 461-469.
- Messier, W.; Li, S.H.; Stewart, C.B. 1996. The birth of microsatellites. *Nature*, 381: 483.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr., P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. 2000. Structural and functional evidence that a B chromosome in the Characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85: 1–9.
- Mondin, M.; Santos-Serejo, J.A.; Aguiar-perecin, M.L.R. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 65–72.
- Moraes, R.L.R.; Bertollo, L.A.C.; Marinho, M.M.F.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; Barby, F.F.; Cioffi, M.B. 2017. Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Zebrafish*, 14(6): 536-546.
- Moraes, R.L.R.; Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; De Oliveira, E.A.; Ráb, P.; Hatanaka, T.; Marinho, M.M.F.; Liehr, T.; Al-Rikabi, A.B.H.; Feldberg, E.; Viana, P.F.; Cioffi, M.B. 2019. Comparative Cytogenetics and Neo-Y formation in small-sized fish species of the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Frontiers in Genetics*, 10(678): 1-12.
- Myosho, T.; Otake, H.; Masuyama, H.; Matsuda, M.; Kuroki, Y.; Fujiyama, A.; Sakaizumi, M. 2012. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1): 163-170.
- Nanda, I.; Feichtinger, W.; Schmid, M.; Schröder, J.H.; Zischler, H.; Epplen, J.C. 1990. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *Journal of Molecular Evolution*, 30: 456–462.
- Natri, H. M.; Shikano, T.; Merila, J. 2013. Progressive recombination suppression and differentiation in recently evolved neo-sex chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5): 1131-1144.

- Nergadze, S.G.; Santagostino, M.A.; Salzano, A.; Mondello, C.; Giulotto, E. 2007. Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biol*, 8(12): R260.
- Ocalewicz, K. 2013. Telomeres in fishes. *Cytogenet Genome Res*, 141(2-3): 114–25.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Britski, H.A.; Toledo Filho, S.A. 1988. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genetica*, 11: 577-624.
- Oliveira, A.L.P.C.; Aguiar-Perecin, M. L. R.1999. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* L. *Cytologia*, 64: 164–74.
- Oliveira, C.; Foresti, F.; Hilsdorf, A.W.S. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, 35: 81-100.
- Oliveira, C.; Avelino, G.S.; Abe, K.T.; Mariguela, T.C.; Benine, R.C.; Ortí, G.; *et al.* 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol*, 11: 275.
- Oliver, K.R.; Greene, W.K. 2009. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. *Bioessays*, 31: 703-714.
- Orgel, L.E.; Crick, F.H.C. 1980. Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607.
- Oyakawa, O.T. 1998. *Phylogenetic relationships of the families Pyrrhulinidae, Lebiasinidae and Erythrinidae (Osteichthyes: Characiformes)*. Doctoral thesis. Universidade de São Paulo.
- Ozouf-Costaz, C.; Brandt, J.; Korting, C.; Pisano, E.V.A.; 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*, 16: 51-57.
- Pansonato-Alves, J.C.; Serrano, É.A.; Utsunomia, R.; Scacchetti, P.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2013. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23: 477-489.
- Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2007. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei:

- Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic and Genome Research*, 116: 218–223.
- Payseur, B.A.; Nachman, M.W. 2000. Microsatellite variation and recombination rate in the human genome. *Genetics*, 156(3): 1285-1298.
- Phillips, R. B.; Konkol, N. R.; Reed, K. M.; e Stein, J. D. 2001. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica*, 111, 119-123.
- Piégu, B.; Bire, S.; Arensbürger, P.; Bigot, Y. 2015. A survey of transposable element classification systems– call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 86: 90-109.
- Pinheiro-Figliuolo, V.S.; Goll, L.; Viana, P.F.; Feldberg, E.; Gross, M.C. 2020. First record on sex chromosomes in a species of the Family Cynodontidae: *Cynodon gibbus* (Agassiz, 1829). *Cytogenetic and Genome Research*, 160(1): 29-37.
- Pinheiro-Figliuolo, V.S.; Ferreira A.M.V.; Guimarães, E.M.C.; Sousa e Souza, J.F.; Feldberg, E.; Gross, M.C. 2021. Cryptic diversity in the terminal portion of the chromosomes of the dogtooth Characins, Family Cynodontidae (Ostariophysi: Characiformes). *Zebrafish*, 18: 221-230.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- Pokorná, M.; Kratochvíl, L.; Kejnovský, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics*, 12: 90.
- Pucci, M.B.; Barbosa, P.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Scacchetti, P.C.; Vicari, M.R. 2016. Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG) n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 149(3): 182-190.
- Pucci, M.B.; Nogaroto, V.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2018. The karyotypes and evolution of ZZ/ZW sex chromosomes in the genus *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *Comparative Cytogenetics*, 12(3): 421.
- Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Barros, B.S.F; Vari, R.P. 2014. *Peixes do Rio Madeira*. 1. ed. São Paulo: Dialeto, v. 2. 91pp.

- Raskina, O.; Barber, J.C.; Nevo, E.; Belyayev, A. 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4): 351-357.
- Richards, C.L.; Bossdorf, O.; Pigliucci, M. 2010. What Role Does Heritable Epigenetic Variation Play in Phenotypic Evolution? *BioScience*, 60: 232-237.
- Rovatsos, M.; Pokorná, J.M.; Altmanová, M.; Kratochvíl, L. 2016. Mixed-Up sex chromosomes: Identification of sex chromosomes in the X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y system of the Legless Lizards of the Genus *Lialis* (Squamata: Gekkota: Pygopodidae). *Cytogenetics and Genome Research*, 149(4): 282-289.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. (3th edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos, G.M.; Jégu, M.; Merona, B. 1984. *Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins*. Projeto Tucuruí Eletronorte/CNPq/INPA, 1.ed. Manaus/AM, 86 pp.
- Sassi, F.D.M.C.; Oliveira, E.A.D.; Bertollo, L.A.C.; Nirchio, M.; Hatanaka, T.; Marinho, M.M.F.; *et al.* 2019. Chromosomal evolution and evolutionary relationships of *Lebiasina* species (Characiformes, Lebiasinidae). *Int J Mol Sci*, 20(12): 2944.
- Sassi, F. M. C.; Toma, G. A.; Cioffi, M. B. 2022. FISH? in Fish Chromosomes. In: Thomas Liehr. (Org.). *Cytogenetics and Molecular Cytogenetics*. 1ed. Boca Raton: CRC Press, v. 1, p. 281-297.
- Schafer, R.; Ali, S.; Epplen, J.T. 1986. The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. *Chromosoma*, 93(6): 502-510.
- Schmidt, T.; Heslop-Harrison, J.S. 1998. Genomes, genes, and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, 3: 195-199.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; *et al.* 2013a. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fisheries*, 23: 201–214.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; do Carmo, E.J.; Martins, C.; Feldberg, E. 2013b. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex1, Rex3 and Rex6 in Neotropical cichlids genome. *BMC Evol Biol.*, 13: 152.

- Schug, M.D.; Hutter, C.M.; Wetterstrand, K.A.; Gaudette, M.S.; Mackay, T.F.; Aquadro, C.F. 1998. The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12): 1751-1760.
- Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; de Oliveira, E.A.; Cioffi, M.B. 2018. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Frontiers in Genetics*, 9: 71.
- Sember, A.; de Oliveira, E.A.; Ráb, P.; Bertollo, L.A.C.; Freitas, N.L.; Viana, P.F.; Cioffi, M.B. 2020. Centric fusions behind the karyotype evolution of Neotropical *Nannostomus* pencilfishes (Characiformes, Lebiasinidae): First insights from a molecular cytogenetic perspective. *Genes*, 11(1): 91.
- Sember, A.; Nguyen, P.; Perez, M.F.; Altmanová, M.; Ráb, P.; Cioffi, M.B. 2021. Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833): 20200098.
- Silva, D.M.; Pansonato-Alves, J.C.; Utsunomia, R.; Daniel, S.N.; Hashimoto, D.T.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Foresti, F. 2013. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, 141: 329-336.
- Silva, N.D.S.T. 2014. *Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais*. (Tese doutorado, Universidade de São Paulo).
- Singh, L.; Purdom, I.F.; Jones, K.W. 1976. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. *Chromosoma*, 59: 43–62.
- Smith, C.A.; Roeszler, K.N.; Ohnesorg, T.; Cummins, D.M.; Farlie, P.G.; Doran, T.J.; Sinclair, A.H. 2009. The avian Z-linked gene DMRT₁ is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261): 267-271.
- Sochorová, J.; Garcia, S.; Gálvez, F.; Symonová, R.; Kovařík, A. 2018. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma*, 127(1): 141–50.
- Sousa e Souza, J.F.; Viana, P.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Feldberg, E. 2017. Evolutionary relationships among *Boulengerella* species (Characiformes, Ctenoluciidae). Genomic organization of repetitive DNAs and highly conserved karyotypes. *Cytogenet Genome Res*, 152: 194-203.

- Sousa e Souza, J. F.; Guimarães, E.; Pinheiro-Figliuolo, V.S.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Feldberg, E. 2021. Chromosomal Analysis of *Ctenolucius hujeta* Valenciennes, 1850 (Characiformes): A New Piece in the Chromosomal Evolution of the Ctenoluciidae. *Cytogenetic and genome research*, 161(3-4): 195-202.
- Stephan, W.; Cho, S. 1994. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*, 136: 333–341.
- Subramanian, S.; Mishra, R.K.; Singh, L. 2003. Genome wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics*, 19(6): 681-685.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatic. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Sumner, A.T. 2003. *Chromosomes Organization and Functions*. Blackwell Science Ltd. 280p.
- Symonová, R.; Majtánová, Z.; Sember, A.; Staaks, G.B.; Bohlen, J.; Freyhof, J.; Ráb, P. 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 1-11.
- Symonová, R.; Sember, A.; Majtánová, Z. e Ráb, P. 2015. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. *Fish Cytogenet. Tech. RayFin Fishes Chondrichthyans*. CCR Press Boca Rat. 118–131.
- Tautz, D.; Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 12(10): 4127-4138.
- 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. *Cytogenet Genome Res*, 125: 224-234.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Nogaroto, V.; de Almeida, M.C.; Vicari, M.; Feldberg, E. 2012. Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome in *Semaprochilodus taeniurus*. *Genetica*, 140: 505–512.

- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Farias, I.P.; Passos, K.B.; Feldberg, E. 2013. Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): A Fish Model for Sex Chromosome Differentiation. *Sexual Development*, DOI: 10.1159/000356691.
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Barros, A.V.; *et al.* 2013a. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet Mol Res*, 12(1): 463–71.
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.D.F.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. 2013b. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *Journal of Genetics*, 92, 127-130.
- Úbeda-Manzanaro, M.; Merlo, M.A.; Palazón, J.L.; Cross, I.; Sarasquete, C.; Rebordinos, L. 2010. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*, 138: 787-794.
- Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.; Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenet Genome Res*, 133: 34-42.
- Vanzela, A.L.L.; Swar, A.C.; Dias, A.L.; Stolf, R.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Sbalqueiro, I.J.; Giuliano-Caetano, L. 2002. Differential distribution of (Ga)₉+C microsatellite on chromosome of some animal and plant species. *Cytologia*, 67: 9-13.
- Vari, R.P. 1995. The Neotropical Fish Family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): Supra and Intrafamilial Phylogenetic Relationships, with a Revisionary Study. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 564: 1-97.
- Vari, R.P.; Malabarba, L.R. 1998. Neotropical ichthyology: an overview, In: *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds), pp. 1-12, Edipucrs, Porto Alegre.
- Vari, R.P. 2003. Family Ctenoluciidae. In: *Check list of freshwater fishes of South and Central America* Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr. (Ed.), Porto Alegre. pp. 252–253.

- Veerappa, A.M.; Padakannaya, P.; Ramachandra, N.B. 2013. Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome- transposed region (XTR) in the Y chromosome. *Funct Integr Genomics*, 13: 285–293.
- Viana, P.F.; Ezaz, T.; Cioffi, M.B.; Almeida, B.J; Feldberg, E. 2019. Evolutionary insights of the ZW sex chromosomes in snakes: A new chapter added by the Amazonian puffing snakes of the genus *Spilotes*. *Genes*, 10(4): 288.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenet Genome Res*, 101(1): 24–8.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet Mol Biol*, 28(1): 103–10.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2006. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 114: 163-168.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2008. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janeiroensis*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 67-72.
- Vicoso, B.; Emerson, J.J.; Zektser, Y.; Mahajan, S.; Bachtrog, D. 2013. Comparative sex chromosome genomics in snakes: differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *PLoS Biol*, 11(8): e1001643.
- Vicente, V. E.; Bertollo, L. A. C.; Valentini, S. R.; e Filho, O. M. 2003. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G-and C-banding. *Genetica*, 119, 115-120.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Scharl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427–1438.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Scharl, 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.; e Schartl, M. 2001. Non-LTR Retrotransposons Encoding a Restriction Enzyme-Like Endonuclease in Vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 2:351–360.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Meyer, A.; e Schartl, M. 2001. Evolution and Discontinuous Distribution of Rex3 Retrotransposons in Fish. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (3), 427-431.
- Volff, J.N.; Nanda, I.; Schmid, M.; Schartl, M. 2007. Governing sex determination in fish: Regulatory putches and ephemeral dictators. *Sex Dev*, 1: 85–99.
- Walsh, J.B.; Stephan, W. 2001. *Multigene Families: Evolution*. In: Encyclopedia Life Sci (Ed), pp. 30 1–6, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bannetzen, J.L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; *et al.* 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8: 973-982.
- Wilder, J.; Hollocher, H. 2001. Mobile elements and genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (3): 384-392.
- Wright, A.E.; Moghadam, H.K.; Mank, J.E. 2012. Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome. *Genetics*, 192(4): 1433–1445.
- Wright, A.E.; Harrison, P.W.; Montgomery, S.H.; Pointer, M.A.; Mank, J.E. 2014. Independent stratum formation on the avian sex chromosomes reveals inter-chromosomal gene conversion and predominance of purifying selection on the W chromosome. *Evolution*, 68(11): 3281–3295.
- Yang, F.; Trifonov, V.; Ng, B.L.; Kosyakova, N.; Carter, N.P. 2009. Generation of paint probes by flow-sorted and microdissected chromosomes. In: *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH): Application Guide*. Liehr, T. (Ed.). Springer-Verlag: Berlin, Germany.
- Yano, C.F.; Poltronieri, J.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F.; Liehr, T.; Cioffi, M.B. 2014. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triporthus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *PLoS ONE* 9(3): e90946.
- Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Rebordinos, L.; Merlo, M.A.; Liehr, T.; Portela-Bens, S. 2017. Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 small nuclear DNAs in

- Triportheus* (Characiformes, Triportheidae): High variability and particular syntenic organization. *Zebrafish*, 14: 146–154.
- Yoshimoto, S.; Okada, E.; Umemoto, H.; Tamura, K.; Uno, Y.; Nishida-Umehara, C.; Ito, M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7): 2469-2474.
- Zhang, X.; Eickbush, M.T.; Eickbush, T.H. 2008. Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics*, 180: 1617-1626.
- Ziegler, C.G.; Lamtsch, D.K.; Steinlein, C.; Engel, W.; Scharl, M.; Schmid, M. 2003. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research*, 11: 23-35.
- Zienniczak, K.; Traldi, J.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2014. In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 144(4): 325-332.
- Zwick, M.S.; Hanson, R.E.; McKnight, T.D.; Nurul-Islam-Faridi, M.; Stelly, D.M. 1997. A rapid procedure for the isolation of COT-1DNA from plants. *Genome*, 40: 138–142.