



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Marcelo de Bello Cioffi

“EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NA FAMÍLIA ERYTHRINIDAE
Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e
microdissecção de cromossomos sexuais”

Tese de Doutorado

Orientador: **Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo**

SÃO CARLOS, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Marcelo de Bello Cioffi

“EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NA FAMÍLIA ERYTHRINIDAE
Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e
microdissecção de cromossomos sexuais”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Genética e Evolução

Orientador: **Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo**

SÃO CARLOS, 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C576ec

Cioffi, Marcelo de Bello.

Evolução cromossômica na família Erythrinidae.
Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e
microdissecção de cromossomos sexuais / Marcelo de Bello
Cioffi. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
210 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Citogenética. 2. Peixes. 3. Hibridização fluorescente in
situ. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Tese de Doutorado de
MARCELO DE BELLO CIOFFI

Banca Examinadora:

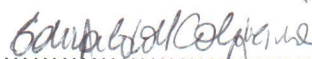
Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo



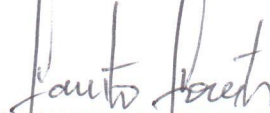
Profa. Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda




Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira



Prof. Dr. Fausto Foresti



Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari



Identificação Bibliográfica

Nome e sobrenome: **Marcelo de Bello Cioffi**

Título da Tese: **Evolução cromossômica na família Erythrinidae. Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e microdissecção de cromossomos sexuais**

Título da tese em Inglês: **Chromosomal evolution in the Erythrinidae family. Cytogenetic mapping of repetitive DNAs and microdissection of sex chromosomes.**

Programa de estudo: Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo

Ano de início: 2010

Ano da defesa: 2011

Palavras-chave: cromossomos sexuais, Erythrinidae, microdissecção, DNAs repetitivos, evolução cariotípica.

Keywords: sex chromosomes, Erythrinidae, microdissection, repetitive DNAs, karyotypic evolution

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de
certa forma contribuíram para sua realização.

“Nunca andes somente pelo caminho previamente traçado, pois ele conduz

somente aonde outros já foram”

(Alexander Graham Bell)

Agradecimentos

Agradeço sinceramente todas as pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular gostaria de agradecer:

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPGGEv) pela infra-estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, meu orientador. Um professor e pesquisador de valor inestimável, extremamente ético e competente. Agradeço por todo apoio e pela confiança em mim depositada, que foram fundamentais para a concretização deste trabalho e principalmente por ter se tornado um grande amigo. O senhor sabe o quanto o admiro e considero. Obrigado por fazer parte da minha vida!

Ao Prof. Orlando Moreira-Filho pelas várias conversas descontraídas e pelas sugestões em relação à minha vida profissional. Agradeço também pela sua presença tão atuante frente a diversas situações por nós enfrentadas aqui no laboratório e pelo grande carinho que sei que cultivava por mim. Saiba que o admiro muito como pesquisador, amigo e também como pessoa.

Aos Drs. Antonio Sánchez (Universidad de Jaén, Espanha), Thomas Liehr (Universität Jena, Alemanha), Eduard Kejnovsky (Academy of the Sciences of the Czech Republic), por terem aberto as portas de seus laboratórios, permitindo que eu avançasse grandemente na parte experimental e teórica deste trabalho. Igualmente agradeço aos Drs. Pétr Ráb (Academy of the Sciences of the Czech Republic), Michael Schmid (Universität Würzburg, Alemanha), Catherine Ozouf-Costaz (Muséum National d'Histoire Naturelle, França) e Jean-Nicolas Volff (Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, França) por terem me recebido em seus laboratórios, pelas discussões, esclarecimentos e avanços que proporcionaram na minha formação científica.

Aos Prof. Drs. César Martins (UNESP), Wagner Molina (UFRN), Lurdes Foresti de Almeida-Toledo (USP), Juan Pedro Martinez Camacho (Universidad de Granada), Juan Alberto Marchal (Universidad de Jaén), Vladimir Trifonov (Russian Academy of Sciences), Marcelo Vicari e Roberto Artoni (UFPG) pelos trabalhos e publicações em conjunto e pelas diversas contribuições que muito auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, irmão e aos meus avós, que sempre estiveram presentes, com muito amor e dedicação, e que sempre lutaram para me propiciar uma educação de qualidade. A vocês, minha eterna gratidão.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Federal de São Carlos pela agradável e alegre convivência durante estes anos.

Aos colegas de graduação e de Pós-Graduação pelo companheirismo e apoio.

Aos técnicos do laboratório, Pedro Gallo e Luiz Henrique (Piau), por toda dedicação e esforço na obtenção das amostras de peixes, além da ótima convivência e de diversos momentos de descontração.

A todos os funcionários do Departamento de Genética e Evolução e do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pelos diversos auxílios na realização deste trabalho.

Ao meu grande amigo Jean Victor Colhado pela idealização e criação da capa desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido (Processo: 2009/14881-3).

E em adição, gostaria de agradecer a todas as pessoas e amigos que, de alguma forma, auxiliaram em minha formação pessoal e profissional. Obrigado!

RESUMO

1 Os peixes da família Erythrinidae apresentam uma ampla variação cariotípica, com diversos
2 cariomorfos já identificados para algumas espécies, incluindo diferentes sistemas de cromossomos
3 sexuais. Em *Erythrinus erythrinus*, um sistema X_1X_2Y bem diferenciado ocorre no cariomorfo D,
4 assim como cromossomos sexuais indiferenciados em outros cariomorfos desta espécie. Em
5 *Hoplias malabaricus*, sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos, bem como
6 indiferenciados, podem ser também encontrados. Entre estes, destaca-se um sistema XY bem
7 diferenciado no cariomorfo B, um sistema XY nascente no cariomorfo C e um sistema X_1X_2Y no
8 cariomorfo D. A proposta desta tese foi analisar a diferenciação genômica entre cariomorfos de *E.*
9 *erythrinus* e *H. malabaricus*, com um enfoque especialmente voltado para os cromossomos
10 sexuais. Para tanto, além das análises cromossômicas clássicas, foi realizado o mapeamento
11 citogenético de seqüências de DNAs repetitivos, assim como a obtenção de sondas por
12 microdissecção de cromossomos sexuais e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) nos
13 cromossomos. Procurou-se testar o caminho evolutivo, quanto à origem independente ou em
14 comum entre os sistemas de cromossomos sexuais dos cariomorfos de *H. malabaricus* e de *E.*
15 *erythrinus*. Populações alopátricas dos cariomorfos A e D de *E. erythrinus* foram analisadas
16 evidenciando diferenças significativas em relação ao cariótipo, onde rearranjos cromossômicos e
17 alterações genômicas destacaram-se como eventos significativos durante o processo evolutivo. A
18 dispersão genômica dos elementos transponíveis *Rex3*, associados ao DNA ribossomal 5S, bem
19 como a diferenciação de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y , foram eventos de
20 destaque na diferenciação do cariomorfo D. Foi também analisado o papel de elementos repetitivos
21 no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais. Neste sentido, foi realizado um estudo
22 comparativo da distribuição de doze microssatélites (mono-, di- e trinucleotídeos) nos sistemas XY
23 e X_1X_2Y , presentes nos cariomorfos B e D de *H. malabaricus*, respectivamente. Foi demonstrada a
24 distribuição diferencial de microssatélites ao longo dos cromossomos em ambos os sistemas,
25 possivelmente como reflexo direto dos seus modos de origem, com um acúmulo significativo no
26 cromossomo X do sistema XY, em contraste com o que se verifica nos cromossomos sexuais do
27 sistema X_1X_2Y . Os processos que atuam na diferenciação dos cromossomos sexuais ainda não estão
28 completamente esclarecidos. No entanto, o acúmulo de seqüências repetitivas de DNA pode
29 representar um dos primeiros passos na diferenciação dos sistemas simples de cromossomos sexuais
30 (XY e ZW), destacando o papel dessas seqüências na sua diferenciação, podendo contribuir para a
31 redução da recombinação entre o par sexual ancestral indiferenciado. Por outro lado, nos sistemas
32 múltiplos, os próprios rearranjos cromossômicos, implicados na origem desses sistemas, parecem
33 representar fatores primários para redução da recombinação, sem a necessidade de modificações
34 adicionais no genoma. O mapeamento comparativo de diversas seqüências repetitivas de DNA em
35 cromossomos mitóticos e meióticos apontou para um processo de diferenciação independente dos
36 cromossomos sexuais X_1X_2Y em *E. erythrinus* e *H. malabaricus*. Adicionalmente, sondas de
37 cromossomos sexuais, isolados por microdissecção, foram empregadas em experimentos de pintura
38 cromossômica total (wcp), mostrando-se uma ferramenta esclarecedora para a elucidação desse
39 processo. Foi demonstrado que os cromossomos do sistema X_1X_2Y evoluíram de forma
40 independente em *H. malabaricus* e *E. erythrinus*, onde diferentes autossomos foram primeiramente
41 convertidos em um par sexual XY pouco diferenciado em cada espécie, seguindo-se rearranjos

1 cromossômicos diferenciados na origem desse sistema. Por sua vez, a pintura cromossômica
2 também mostrou a origem independente para o sistema XY dos cariomorfos B e C de *H.*
3 *malabaricus*. Novamente, distintos pares autossômicos de cariomorfos ancestrais foram convertidos
4 nos cromossomos XY, agora presentes nos cariomorfos B e C. Foi bem caracterizado o
5 relacionamento direto do sistema XY nascente do cariomorfo C com a origem do sistema X_1X_2Y do
6 cariomorfo D. Assim sendo, tanto entre espécies cofamiliares (*E. erythrinus* e *H. malabaricus*),
7 assim como entre cariomorfos de uma mesma espécie nominal (*H. malabaricus*), os cromossomos
8 sexuais apresentam evolução independente, evidenciando a grande plasticidade desse processo
9 evolutivo entre os peixes.

ABSTRACT

1 The fishes from the Erythrinidae family present a wide karyotypic variation with several
2 karyomorphs already identified for some species, including the presence of different sex
3 chromosome systems. In *Erythrinus erythrinus* a well-differentiated X_1X_2Y system occurs in
4 karyomorph D, as well as undifferentiated sex chromosomes in other karyomorphs of this species.
5 In *Hoplias malabaricus*, single and multiple sex chromosome systems, as well as undifferentiated,
6 can also be found. Among these, there is a well-differentiated XY system in karyomorph B, a
7 nascent XY system in karyomorph C and a X_1X_2Y system in karyomorph D. The purpose of this
8 thesis was to analyze the genomic differentiation occurred between *E. erythrinus* and *H.*
9 *malabaricus* karyomorphs, with a particular focus on the sex chromosomes. To this end, besides the
10 classical chromosomal analysis, repetitive DNA sequences and microdissected sex chromosomes
11 were used as probes for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) procedures. The evolutionary
12 pathways for the sex chromosome systems of *H. malabaricus* and *E. erythrinus* karyomorphs were
13 investigated. Allopatric populations of *E. erythrinus* karyomorphs A and D were analyzed and
14 showed significant differences in relation to their karyotypes, where chromosomal rearrangements
15 and genomic changes stood out as significant events during the evolutionary process. The genomic
16 dispersion of transposable elements *Rex3* associated with the 5S ribosomal DNA, as well as the
17 differentiation of a multiple X_1X_2Y sex chromosome system were prominent events in the
18 differentiation of karyomorph D. The role of repetitive elements in the process of differentiation of
19 sex chromosomes was also analyzed. In this sense, we performed a comparative study of the
20 distribution of twelve microsatellites (mono-, di- and trinucleotide) in the XY and X_1X_2Y systems,
21 present in karyomorphs B and D of *H. malabaricus*, respectively. The differential distribution of
22 microsatellites along the chromosomes in both systems were demonstrated, possibly as a direct
23 reflection of their modes of origin, with a significant accumulation of repeats on the X chromosome
24 of the XY system, in contrast to that found in the X_1X_2Y sex chromosomes system. The processes
25 acting in the differentiation of sex chromosomes are not yet completely understood. However, the
26 accumulation of repetitive DNA sequences may represent an early step in the differentiation of
27 simple sex chromosome systems (XY and ZW), highlighting the role of these sequences in their
28 differentiation, and contributing to the reduction of recombination between the undifferentiated
29 ancestor sex pair. On the other hand, in multiple systems, the chromosomal rearrangements
30 implicated in the origin of these systems, appear to represent the primary factors responsible for the
31 reduction of recombination without the need for additional genomic modifications. The comparative
32 mapping of different repetitive DNA sequences in meiotic and mitotic chromosomes pointed for an
33 independent differentiation process of the X_1X_2Y sex chromosomes in *E. erythrinus* and *H.*
34 *malabaricus*. Additionally, sex chromosome probes, isolated by microdissection, were used in
35 experiments of whole chromosome painting (wcp), proving to be a powerful tool for the study of
36 sex chromosomes evolution. It was shown that the chromosomes of the X_1X_2Y system have evolved
37 independently in *H. malabaricus* and *E. erythrinus* where different autosomes were firstly
38 converted to a slightly different XY sex pair in each species, followed by distinct chromosomal
39 rearrangements in the origin of these systems. In turn, the chromosome painting also showed the
40 independent origin for the XY system of *H. malabaricus* karyomorphs B and C. Again, distinct
41 autosomal pairs present in the ancestor karyomorphs were converted into the XY chromosomes,
42 now present in karyomorphs B and C. It has been well characterized the direct relationship between
43 the XY system of karyomorph C and the origin of the X_1X_2Y system present in karyomorph D.
44 Thus, even between congeneric species (*E. erythrinus* and *H. malabaricus*), as well as between
45 karyomorphs of the same nominal species (*H. malabaricus*), the sex chromosomes have evolved
46 independently, demonstrating the great plasticity of this evolutionary process in fishes.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.** Estágios da evolução dos cromossomos sexuais. A figura mostra como proto-cromossomos sexuais, portadores de apenas um gene sexo determinante no proto-Y (linha vermelha) pode evoluir, onde genes cujos efeitos são vantajosos apenas para o sexo masculino (linhas azuis) são acumulados, levando à supressão da recombinação (ausência da linha pontilhada) em uma região mais ampla do genoma (região destacada em salmão), seguida por degeneração genética e perda de partes não-essenciais do cromossomo Y. A partir de um par de autossomos, onde um dos homólogos adquiriu um locus sexo-determinante (A), alelos conferem alguma vantagem para um sexo e uma desvantagem para o outro começam a se acumular (B). A ocorrência de inversões abrangendo a região cromossômica contendo estes genes é então favorecida pela seleção natural (C), levando à supressão da recombinação dentro da região invertida (D). Na ausência de recombinação, retrotransposons invadem os cromossomos (setas) (E) e seqüências repetitivas são amplificadas na região não-recombinante (linhas brancas) (F). Centros de nucleação heterocromáticos (cor preta) são formados como uma defesa do genoma contra a amplificação de elementos transponíveis (F). A amplificação da heterocromatina em regiões flangeadoras dos genes induz a um processo de silenciamento dos mesmos e estes, por serem dispensáveis devido à sua inatividade, podem ser eliminados gradativamente (G). No estágio final de evolução dos cromossomos sexuais (H) o cromossomo Y encontra-se totalmente degenerado e diferenciado em relação ao cromossomo X, portando apenas alguns genes relacionados à determinação do sexo 03
- Figura 2.** Filogenia e tempos de divergência propostos para as diferentes classes de vertebrados, e das subclasses de mamíferos Prototheria (Monotremados) e Theria, que compreende as infraclasses Placentários (Eutheria) e Marsupiais (Metatheria). As imagens são do peixe stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, do sapo *Rana rugosa*, do lagarto *Pogona vitticeps*, do emu *Dromaius novaehollandiae*, do ornitorrinco *Ornithorhynchus anatinus*, do canguru *Macropus eugenii* e do roedor *Ellobius tancrei* (modificada de Graves, 2008) ... 09
- Figura 3.** Distribuição dos cariomorfos A-G de *Hoplias malabaricus* (círculos); grupo *Hoplias lacerdae* (estrelas); cariomorfos A-D de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (triângulos) e cariomorfos A-D de *Erythrinus erythrinus* (quadrados) na América do Sul. (Dados de Cioffi et al. *in press*) 11
- Figura 4.** Variabilidade cromossômica encontrada na espécie *Hoplias malabaricus*. Idiogramas parciais dos cariomorfos A-D (Grupo I) e E-G (Grupo II), realçando as diferenças observadas quanto aos números diplóides, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais (Dados de Cioffi et al. *in press*) 16

Figura 5.	Variabilidade cromossômica encontrada na espécie <i>Erythrinus erythrinus</i> . Idiogramas parciais dos cariomorfos A-D realçando as diferenças observadas quanto aos números diplóides, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais (Dados de Cioffi et al. <i>in press</i>)	19
Figura 6.	Experimentos de pintura cromossômica em diferentes espécies de vertebrados. (a) Sonda derivada do cromossomo X de <i>Microtus cabreræ</i> hibridizada com os cromossomos de <i>Arvicola sapidus</i> ; (b) Sonda derivada do cromossomo Z de <i>Gallus gallus</i> hibridizadas com os cromossomos do lagarto <i>Eremias velox</i> ; (c) Sonda derivada do cromossomo Y de <i>Coleonyx elegans</i> hibridizada com os cromossomos da mesma espécie; (d) Sonda derivada do cromossomo Z de <i>Triportheus nematurus</i> hibridizada com os cromossomos da mesma espécie. As imagens são cortesia de (a) Antonio Sanchez (Universidad de Jaén, Espanha) e (b e c) de Martina Pokorná (University of Prague, República Tcheca)	36
Material e Métodos		
Figura 1.	Vista lateral de um espécime de <i>Hoplias malabaricus</i> (1) e de <i>Erythrinus erythrinus</i> (2). Barra = 5 cm	45
Figura 2.	Mapa do Brasil evidenciando a procedência dos espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> (círculos) e <i>Erythrinus erythrinus</i> (quadrados) utilizados no presente estudo. 1 = Descalvado, SP (22° 05' 27" S - 47°45' 55" O), rio do Pântano – Cariomorfo A; 2 e 3 = Parque Florestal do Rio Doce, MG (20° 15' 48" S - 42° 54' 0" O), lagoas da bacia do rio Doce - Cariomorfos A e B, respectivamente; 4 = Poconé , MT (16° 40' 0" S - 57° 12' 0" O), rio Bento Gomes – Cariomorfo C; 5 = São Carlos, SP (21° 58' 15" S - 47° 53' 16" O), ribeirão Monjolinho – Cariomorfo D; 6= Penápolis, SP (21°25'15"S - 50°04' 40"O), bacia do rio Tietê – Cariomorfo A; 7 = Parnamirim, RN (5° 54' 56" S - 35° 15' 46" O), rio Pirangi – Cariomorfo D.....	46
Figura 3 .	Cromossomos sexuais utilizados para a preparação de sondas de cromossomos totais, empregadas em análises de pintura cromossômica. (1) Cromossomo Y de <i>Erythrinus erythrinus</i> (cariomorfo D - sistema X ₁ X ₂ Y); (2) cromossomo X de <i>Hoplias malabaricus</i> (cariomorfo B - sistema XY); (3) cromossomo X ₁ de <i>H. malabaricus</i> (cariomorfo D - sistema X ₁ X ₂ Y) corado com Giemsa e com Cromomicina A ₃ , evidenciando o grande bloco heterocromático proximal, GC-rico, presente exclusivamente neste cromossomo sexual	56
Figura 4 .	Equipamentos utilizados no processo de microdissecção cromossômica. (1) microscópio invertido Axiovert 135 (Zeiss, Jena, Alemanha) e (2) aparelho puller modelo PB-7 (Narishige, Japão).....	57

Figura 5. Gel de agarose evidenciando o DNA amplificado dos cromossomos sexuais após a microdissecção. Linhas 1, 2 e 3 correspondem ao DNA dos cromossomos Y, X e X₁, respectivamente. Linhas 4, 5 e 6 correspondem ao DNA dos cromossomos Y, X e X₁ marcados com Spectrum-Orange dUTP, Spectrum-Green dUTP e Cy5-dUTP, respectivamente. M = 100 bp DNA ladder (Invitrogen)..... 59

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cariótipos de machos e fêmeas de *Erythrinus erythrinus* (cariomorfos A e D) sob diferentes análises citogenéticas. Os cariótipos, organizados por coloração seqüencial com Giemsa e bandamento-C, foram hidridizados com seqüências de DNAr 5S e 18S, após dupla-FISH. Observar o aumento significativo de sítios de DNAr 5S no cariomorfo D. m, cromossomos metacêntricos; sm, cromossomos submetacêntricos; st, cromossomos subtlocêntricos; a, cromossomos acrocêntricos. Barra = 5 µm 79

Figura 2. Metáfases dos cariomorfos A e D de *Erythrinus erythrinus* mostrando a localização do DNAr 5S e do retroelemento *Rex3* nos cromossomos, com o emprego de dupla-FISH. Observar o padrão intersticial disperso de *Rex3* em ambos os cariomorfos e sua co-localização com o DNAr 5S na região centromérica dos cromossomos. A caixa indica a clara associação de alguns cromossomos acrocêntricos, que foi vista em quase todas as preparações cromossômicas. O cromossomo Y está sendo indicado. Barra = 5 µm 80

Figura 3. Metáfase de um macho de *Erythrinus erythrinus*, cariomorfo D, mostrando a localização das seqüências teloméricas em ambos os telômeros dos cromossomos. Além disso, ITS foram encontrados na região centromérica do único par submetacêntrico do cariótipo (setas) e do grande cromossomo Y metacêntrico (cabeça de seta). Bar = 5 µm 81

Figura 4. Visão geral da evolução cariotípica proposta para os cariomorfos A-D de *Erythrinus erythrinus*, com base em suas características cariotípicas e os resultados de mapeamento por FISH para os cariomorfos A e D. As principais alterações cromossômicas, à partir de um provável cariótipo basal (2n=54; 6m+2st+46a) estão sublinhadas. A figura acima ilustra o esquema da distribuição cromossômica de DNAr 18S e das seqüências DNAr 5S /*Rex3* no cariomorfo A e a expansão na distribuição das seqüências DNAr 5S/*Rex3* no cariomorfo D, incluindo o cromossomo Y, o X₁ e o provável X₂. As diferentes cores representam as sondas utilizadas nas análises de FISH 82

CAPÍTULO 2

Figura 1. Cromossomos metafásicos mitóticos de machos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfoB) com um sistema de cromossomos sexuais XY, hibridizados com diferentes microssatélites. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (azul) e as sondas de microssatélites foram diretamente marcadas com Cy3 durante a síntese (sinais vermelhos). Os cromossomos X e Y estão indicados e ampliados nos detalhes. Barra = 5 µm 94

- Figura 2.** Cromossomos metafásicos mitóticos de machos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo D) com um sistema de cromossomos sexuais X_1X_2Y , hibridizados com diferentes microssatélites. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (azul) e as sondas de microssatélites foram diretamente marcadas com Cy3 durante a síntese (sinais vermelhos). Os cromossomos X_1 , X_2 , e neo- Y estão indicados e ampliados nos detalhes. Barra = 5 μm 96
- Figura 3.** Mapa esquemático dos cromossomos sexuais de *Hoplias malabaricus*, destacando os padrões de distribuição de microssatélites, a partir de dados de FISH. (a) cromossomos X e Y do cariomorfo B e (b) cromossomos X_1 , X_2 e Y do cariomorfo D. Os segmentos em preto e as barras azuis representam as regiões heterocromáticas e os padrões de distribuição dos microssatélites nos cromossomos, respectivamente. Notar o acúmulo de microssatélites no cromossomo X do cariomorfo B, em contraste com a relativa ausência de acúmulo nos cromossomos sexuais do cariomorfo D. Este diagrama mostra a origem do braço longo do cromossomo neo-Y, resultante da fusão em tandem dos braços curtos de dois cromossomos semelhantes aos cromossomos X_1 e X_2 . 98

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Distribuição cromossômica de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais do peixe *Hoplias malabaricus*. **a** Sistema XX/XY do cariomorfo B: ambos os cromossomos X e Y possuem um sítio de 5SHindIII-DNA na região centromérica, bem como uma concentração intersticial da seqüência (GATA)_n nos braços longos. A diferenciação dos braços longos do cromossomo X ocorreu pelo aumento da quantidade de heterocromatina GC-rica e de cistrons de DNAr 18S. Note a abundância de seqüências repetitivas acumuladas no cromossomo X, em contraste com o cromossomo Y. **b** Sistema XX/XY do cariomorfo C: passos iniciais da diferenciação dos cromossomos sexuais, onde o X e Y diferem apenas ligeiramente devido à amplificação de heterocromatina GC-rica e de sítios de DNAr 18S no cromossomo X. **c** Sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ do cariomorfo D: os cromossomos X_1 e neo-Y evidenciam heterocromatina GC-rica, bem como sítios de DNAr 18S proximais, conforme encontrado nos cromossomos X e Y do cariomorfo C. O satélite 5SHindIII-DNA foi mapeado na região pericentromérica do cromossomo X_2 e intersticialmente no braço longo do cromossomo neo-Y, corroborando a fusão em tandem entre o cromossomo X_2 e o cromossomo Y ancestral do cariomorfo C, originando o cromossomo neo-Y do cariomorfo D. Um ITS foi encontrado no braço longo do cromossomo neo-Y, reforçando a origem desse cromossomo por uma fusão em tandem. Idiogramas representativos dos diferentes cromossomos sexuais são também apresentados, destacando a correlação direta entre os DNAs repetitivos e a diferenciação dos cromossomos sexuais (modificado de Cioffi & Bertollo, 2010 e Cioffi et al. 2010) 111

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Cariótipos de machos dos cariomorfos D de *Hoplias malabaricus* (2n=39) e *Erythrinus erythrinus* (2n=51), ambos com um sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ com coloração Giemsa convencional. Barra = 5 μ m . 125
- Figura 2.** Cromossomos sexuais X_1X_2Y de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* após a hibridização fluorescente *in situ* com vários tipos de DNAs repetitivos ... 126
- Figura 3.** Cromossomos meióticos de *Hoplias malabaricus* (a - e) e *Erythrinus erythrinus* (f - i). **a, b** Células espermatogoniais com 2n=39 cromossomos apresentando 10 sítios de DNAr 18S (vermelho) e 2 sítios de DNAr 5S (verde) (**a**) e 22 sítios de 5SHindIII-DNA (vermelho) e 2 sítios de DNAr 5S (verde) (**b**). **c** Estágios de zigóteno/paquítenu apresentando sítios dispersos para o retroelemento *Rex3* (vermelho) e 1 sítio de DNAr 5S (verde) presentes nos cromossomos pareados. **d** Estágio de zigóteno/paquítenu/e diacinese/metáfase I apresentando sítios de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) em 5 e 1 cromossomos pareados, respectivamente; no destaque o trivalente sexual com 1 sítio de 5SHindIII-DNA **f** Células espermatogoniais com 2n=51 cromossomos apresentando 12 sítios de DNAr 18S (vermelho) e 21 sítios de DNAr 5S (verde). **g** Estágios de zigóteno/paquítenu apresentando o padrão disperso de distribuição do retroelemento *Rex3* (vermelho) e sua co-localização com sítios de DNAr 5S (verde) na região centromérica dos cromossomos. **h** Estágios de zigóteno/paquítenu e **i** diacinese/metáfase I apresentando sítios de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) em 5 e 10 cromossomos pareados, respectivamente. As cabeças de seta indicam os trivalentes sexuais. Barra = 5 μ m..... 127
- Figura 4.** Diagrama esquemático ilustrando os rearranjos cromossômicos associados com a diferenciação dos cromossomos sexuais X_1X_2Y de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus*. No cariomorfo D de *H. malabaricus*, o cromossomo neo-Y foi derivado de uma fusão *em tandem* entre o cromossomo Y submetacêntrico e um autossomo submetacêntrico (A). O par XY ancestral foi caracterizado em um estágio inicial de diferenciação, considerando o heteromorfismo de tamanho das bandas heterocromáticas proximais. No cariomorfo D de *E. erythrinus* o cromossomo neo-Y foi originado de uma fusão cêntrica entre um cromossomo Y acrocêntrico e um autossomo acrocêntrico (A). O par sexual ancestral não apresentou diferenciação entre os cromossomos X e Y. As regiões escuras dos cromossomos representam bandas heterocromáticas. Dados de Cioffi & Bertollo (2010) e Cioffi et al. (2010b)..... 128

CAPÍTULO 5

- Figura 1.** Pintura cromossômica com as sondas Hm-X1 (verde) e Ee-Y (vermelho), derivadas de HMA e de EER respectivamente. As sondas foram hibridizadas com os cromossomos metafásicos de fêmeas e machos de HMA dos cariomorfos C ($2n = 40, XX/XY$) e D ($2n = 40/39, X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$). Note que a sonda Hm-X1 pintou completamente os cromossomos X e Y pouco diferenciados do cariomorfo C, bem como o cromossomo X_1 e uma grande extensão do cromossomo neo-Y do cariomorfo D. A sonda Ee-Y pintou inteiramente dois pares submetacêntricos distintos de cromossomos autossômicos em HMA. Barra = 5 μm 142
- Figura 2.** Pintura cromossômica com as sondas Hm-X1 (verde) e Ee-Y (vermelho). As sondas foram hibridizadas com os cromossomos metafásicos de fêmeas e machos de EER dos cariomorfos A ($2n = 54$, ambos os sexos) e D ($2n = 52/51, X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$). Note que a sonda Ee-Y pintou quatro cromossomos acrocêntricos no cariomorfo A de EER, bem como os cromossomos X_1, X_2 e Y no cariomorfo D de EER. A sonda Hm-X1, derivada de HMA, pintou inteiramente um par autossômico distintos em EER. Barra = 5 μm 143
- Figura 3.** Panorama da evolução independente proposta para os cromossomos sexuais X_1X_2Y em HMA e EER, com base em características cariotípicas e resultados de pinturas cromossômicas recíprocas com sondas derivadas de cromossomos sexuais. (1) O sistema X_1X_2Y de HMA foi originado por fusão *em tandem* entre o cromossomo Y pouco diferenciado, presente no cariomorfo C, e um autossomo resultando o cromossomo neo-Y do cariomorfo D. A região não-pintada do cromossomo neo-Y corresponde ao ancestral homólogo do cromossomo X_2 , que não tem homologia com o cromossomo X_1 . (2) O mesmo sistema X_1X_2Y em EER for derivado de uma fusão cêntrica entre um cromossomo Y morfologicamente indiferenciado, presente no cariomorfo A, e um autossomo dando origem ao grande cromossomo neo-Y presente no cariomorfo D. Embora os cromossomos XY não sejam identificáveis no cariomorfo A de EER, eles devem corresponder a um dos dois pares acrocêntricos que foram totalmente hibridizados com a sonda Ee-Y. Os cromossomos pintados com as sondas Hm-X1 e Ee-Y estão indicados em verde e vermelho, respectivamente. Observe que embora os cromossomos de HMA e EER compartilhem seqüências, os dois sistemas de cromossomos sexuais evoluíram de forma independente 144
- Figura 4.** Sistemas de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y de *Hoplias malabaricus* (HMA) e *Erythrinus erythrinus* (EER). O cromossomo X_1 de HMA e o cromossomo Y de EER, que foram microdissectados e usados para a construção de sondas, encontram-se destacados 145

CAPÍTULO 6

- Figura 1.** Cromossomos sexuais presentes em *Hoplias malabaricus*. (1) cromossomos XY altamente diferenciados do cariomorfo B; (2) cromossomos sexuais XY nascentes do cariomorfo C; (3) cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y do cariomorfo D. Detalhe do cromossomo X_1 corado com Cromomicina A_3 , evidenciando o segmento heterocromático GC-positivo que permite sua precisa identificação. Os cromossomos sexuais que foram microdissectados e utilizados para a construção de sondas para experimentos de FISH encontram-se destacados 159
- Figura 2.** Pintura cromossômica cruzada com as sondas Hm-X (verde) e Hm-X1 (vermelho). Cromossomos de fêmeas (a) e machos (b) do cariomorfo B ($2n=42$, XX/XY) e de fêmeas (c) e machos (d) do cariomorfo A ($2n=42$) de *Hoplias malabaricus*. As cabeças de seta indicam os prováveis cromossomos sexuais do cariomorfo A. Barra = $5\mu\text{m}$ 160
- Figura 3.** Pintura cromossômica cruzada com as sondas Hm-X (verde) e Hm-X1 (vermelho). Cromossomos de fêmeas (a) e machos (b) do cariomorfo D ($2n = 40/39$, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$) e de fêmeas (c) e machos (d) do cariomorfo C ($2n=40$, XX/XY) de *Hoplias malabaricus*. A extensão não pintada do cromossomo neo-Y corresponde ao homólogo ancestral do cromossomo X_2 , que carece de homologia com as seqüências presentes no cromossomo X_1 . Barra = $5\mu\text{m}$ 161
- Figura 4.** Diagrama esquemático mostrando a derivação dos sistemas de cromossomos sexuais dos cariomorfos B, C e D de *Hoplias malabaricus*, evidenciado pelos experimentos de pintura de cromossômica com as sondas Hm-X e Hm-X₁. Distintos proto-cromossomos sexuais estiveram provavelmente presente na forma cariotípica ancestral, a partir do qual os cromossomos sexuais XY evoluíram em, pelo menos, duas condições independentes. (1) Os cromossomos sexuais XY, altamente diferenciados do cariomorfo B, foram derivados do par de cromossomos primitivos do cariomorfo A pelo acúmulo de seqüências repetitivas de DNA no cromossomo X, distendendo o seu braço longo durante o processo de diferenciação. Embora os cromossomos XY não sejam citologicamente diferenciáveis no cariomorfo A, presume-se que seja o pequeno par submetacêntrico pintado com a sonda Hm-X. (2) Os cromossomos sexuais XY nascentes do cariomorfo C, ainda pouco diferenciados morfológicamente, diferindo ligeiramente pela ampliação de algumas seqüências repetitivas no cromossomo X. (3) O sistema de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y do cariomorfo D foi originado através de uma fusão em tandem entre o cromossomo Y e um autossomo, dando origem ao grande cromossomo neo-Y. O segmento não pintado do cromossomo neo-Y corresponde ao homólogo ancestral do cromossomo X_2 , que não apresenta homologia com o cromossomo X_1 . Os cromossomos pintados com as sondas Hm-X e Hm-X₁ estão indicados em verde e vermelho, respectivamente 162

CAPÍTULO 7

- Figura 1.** Metáfases de diferentes espécies de peixes Neotropicais submetidas ao procedimento de bandamento C destacando (I) o grande acúmulo de heterocromatina que é geralmente associado com a diferenciação dos cromossomos W, exemplificado pelas espécies portadores de um sistema ZW *Parodon hilarii* e *Leporinus obtusidens*, (II) o acúmulo incomum de heterocromatina nos cromossomos X e não nos cromossomos Y, exemplificada pela espécie *Hoplias malabaricus*, e (III) a ausência de acúmulo de heterocromatina nos cromossomos sexuais múltiplos, exemplificado pelas espécies *H. malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* (sistema sexual X_1X_2Y) e *Apareiodon affinis* (sistema sexual ZW_1W_2). Os cromossomos sexuais são mostrados em formas ampliadas nas caixas. Barra = 10 μ M 179
- Figura 2.** Idiograma comparativo mostrando a diversidade de formas e distribuição da heterocromatina nos cromossomos W presentes em diferentes espécies do gênero *Triportheus*. As regiões eucromáticas e heterocromáticas nos cromossomos são representadas pelos segmentos claros e escuros, respectivamente. $W^a = T. cf. auritus$; $W^b = T. auritus$; $W^c = T. signatus$; $W^d = T. nematurus$; $W^e = T. guentheri$; $W^f = T. angulatus$; $W^g = T. venezuelensis$; $W^h = T. albus$ (modificada de Diniz et al. 2008) 180
- Figura 3.** Cromossomos meióticos de machos de *Hoplias malabaricus*, $2n = 39$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais do tipo X_1X_2Y . (A) Estágio de diplóteno-diacinese exibindo 18 bivalentes e um característico trivalente sexual. Os bivalentes correspondem a 18 pares autossômicos pareados, enquanto o trivalente corresponde ao emparelhamento dos cromossomos X_1 , X_2 e Y. (B e C) células em metáfase II com 20 e 19 cromossomos, respectivamente, indicando a segregação equilibrada dos cromossomos sexuais durante a meiose. A seta indica o trivalente sexual. Barras = 10 μ M 181

LISTA DE TABELAS

Introdução

- Tabela 1.** Dados cariotípicos para a família Erythrinidae. *O “grupo *Hoplías lacerdae*” engloba várias espécies, porém com o mesmo cariótipo. A-G correspondem aos diferentes cariomorfos conhecidos para cada espécie..... 12

Material e Métodos

- Tabela 1.** Espécimes de *Hoplías malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* por locais de coleta, com os respectivos cariomorfos e número de exemplares analisados..... 47

Capítulo 7

- Tabela 1.** Sistemas de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais: Sistemas simples ... 176
- Tabela 2.** Sistemas de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais: Sistemas múltiplos. 178

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	xii
1. Introdução	01
1.1. Cromossomos Sexuais: Considerações gerais	02
1.2. Peixes: Diversidade e importância em estudos evolutivos e genéticos	06
1.3. A Família Erythrinidae: Aspectos gerais e estudos citogenéticos	10
1.3.1. <i>Os sistemas de cromossomos sexuais na família Erythrinidae</i>	20
1.4. DNAs Repetitivos e seu papel na organização genômica dos peixes	22
1.5. Pintura cromossômica e o estudo dos cromossomos sexuais em vertebrados	35
2. Justificativa e Objetivos	40
3. Material e Métodos	44
3.1. Amostras do material biológico	45
3.2. Preparação de cromossomos mitóticos	47
3.3. Preparação das lâminas	48
3.4. Preparação de cromossomos meióticos	48
3.5. Análise da heterocromatina C-positiva (bandamento C)	49
3.6. Coloração por fluorocromos base-específicos DAPI (AT-específico) e Cromomicina A ₃ (GC-específico)	49
3.7. Preparação das sondas para experimentos de hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	50
3.7.1. <i>Famílias Multigênicas de DNAr 5S e 18S</i>	50
3.7.2. <i>DNA satélite 5SHindIII-DNA</i>	50
3.7.3. <i>Retroelemento Rex3</i>	51
3.7.4. <i>Fração C_{ot}-1 DNA</i>	54
3.7.5. <i>DNA telomérico (TTAGGG)_n</i>	55
3.7.6. <i>Oligonucleotídeos enriquecidos com microsátélites</i>	55
3.7.7. <i>Cromossomos totais isolados por Microdissecção</i>	55
3.8. Marcação das Sondas	58
3.8.1. <i>Sondas de DNAs repetitivos</i>	58
3.8.2. <i>Sondas de Cromossomos totais</i>	59

3.9.	Preparação das lâminas, hibridização <i>in situ</i> e detecção do sinal ...	60
3.10.	Análises cariotípicas	61
4.	Resultados e Discussão	62
	Capítulo 1. Dispersão de elementos transponíveis associados ao DNA ribossomal no genoma do peixe <i>Erythrinus erythrinus</i> . Implicações quanto às modificações genômicas e carioevolução em peixes	64
	Capítulo 2. Distribuição cromossômica de microssatélites no genoma do peixe <i>Hoplias malabaricus</i> , com enfoque nos cromossomos sexuais	83
	Capítulo 3. DNAs repetitivos e diferenciação dos cromossomos sexuais em peixes Neotropicais	99
	Capítulo 4. Distribuição cromossômica de seqüências repetitivas de DNA evidencia a diferenciação independente dos cromossomos sexuais múltiplos em duas espécies de peixes estreitamente relacionadas	112
	Capítulo 5. Pintura cromossômica evidencia a origem independente de cromossomos sexuais múltiplos presente em duas espécies de peixes da família Erythrinidae	129
	Capítulo 6. Pintura cromossômica revela a origem independente dos cromossomos sexuais entre formas intimamente relacionadas de uma espécie de peixe	146
	Capítulo 7. O papel contrastante de heterocromatina na diferenciação dos cromossomos sexuais. Uma visão em peixes Neotropicais	163
5.	Considerações Finais	182
6.	Referências Bibliográficas	189

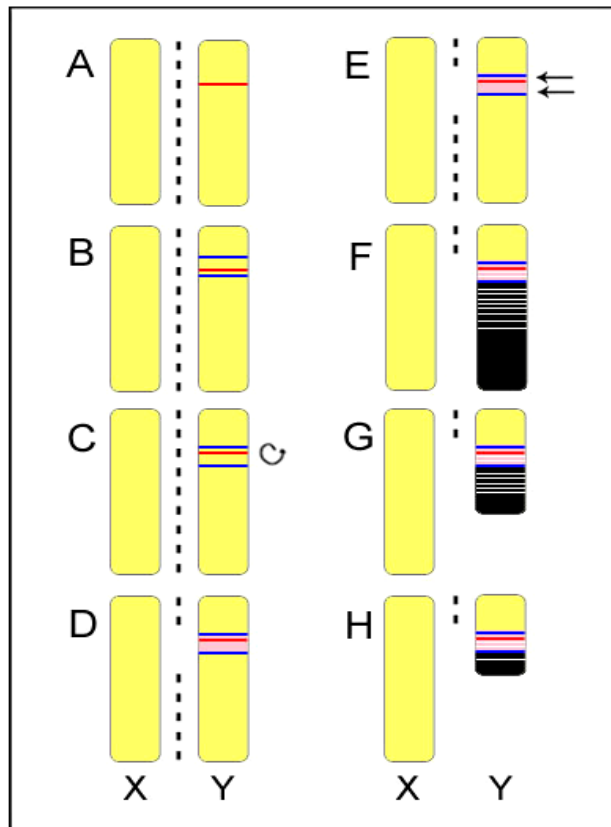
Introdução

1 1. INTRODUÇÃO

2 1.1 Cromossomos sexuais: considerações gerais

3 Cromossomos sexuais são considerados componentes particulares do genoma diferindo,
4 em muitos aspectos, dos autossomos. Embora em diferentes espécies e linhagens os
5 cromossomos sexuais tenham evoluído várias vezes de forma independente, eles compartilham
6 características comuns. Assim, processos similares devem ter atuado durante sua evolução. Em
7 geral, os cromossomos sexuais se diferenciam a partir de um par de autossomos, onde um dos
8 homólogos adquire um locus sexo-determinante, em torno do qual os alelos que conferem
9 alguma vantagem para um sexo e uma desvantagem para o outro começam a se acumular.
10 Posteriormente, a seleção favorece a restrição desses loci em um dos sexos pela supressão da
11 recombinação a qual, posteriormente, pode se espalhar ao longo do cromossomo por inteiro
12 (Ohno, 1967; Charlesworth & Charlesworth, 1980; Bull, 1983). Na ausência de recombinação,
13 retrotransposons podem invadir os cromossomos sexuais e seqüências repetitivas são
14 amplificadas na região não-recombinante (Charlesworth et al. 1994). Por fim, a
15 heterocromatina também pode se acumular nesses cromossomos, talvez como uma defesa da
16 célula contra a amplificação de elementos transponíveis (Steinemann & Steinemann, 2005)
17 **(Figura 1)**. A supressão da recombinação inclui também processos de rearranjos, como as
18 inversões cromossômicas. Estas últimas são consideradas responsáveis pela existência de
19 quatro estratos evolutivos encontrados no cromossomo X humano, caracterizados por
20 diferentes níveis de divergência de nucleotídeos entre genes compartilhados pelos
21 cromossomos X e Y (Ohno, 1967; Lahn & Page, 1999). Inversões como causas de supressão da
22 recombinação se correlacionam bem com a organização encontrada para maioria dos genes
23 ligados aos cromossomos sexuais e o modelo de cessação gradual de recombinação. Uma

1 inversão corresponderia a um “estrato” - uma parte dos cromossomos sexuais em que a
2 recombinação foi suprimida em algum momento do seu processo evolutivo. “Estratos” foram
3 também encontrados no cromossomo Z das aves (Handley et al. 2004) e no cromossomo X do
4 vegetal *Silene latifolia* (Bergero et al. 2007).



5 **Figura 1:** Estágios da evolução dos cromossomos sexuais. A figura mostra como proto-
6 cromossomos sexuais, portadores de apenas um gene sexo determinante no proto-Y (linha
7 vermelha) pode evoluir, onde genes cujos efeitos são vantajosos apenas para o sexo masculino
8 (linhas azuis) são acumulados, levando à supressão da recombinação (ausência da linha
9 pontilhada) em uma região mais ampla do genoma (região destacada em salmão), seguida por
10 degeneração genética e perda de partes não-essenciais do cromossomo Y. A partir de um par de
11 autossomos, onde um dos homólogos adquiriu um locus sexo-determinante (A), alelos
12 conferem alguma vantagem para um sexo e uma desvantagem para o outro começam a se
13 acumular (B). A ocorrência de inversões abrangendo a região cromossômica contendo estes
14 genes é então favorecida pela seleção natural (C), levando à supressão da recombinação dentro
15 da região invertida (D). Na ausência de recombinação, retrotransposons invadem os
16 cromossomos (setas) (E) e seqüências repetitivas são amplificadas na região não-recombinante
17 (linhas brancas) (F). Centros de nucleação heterocromáticos (cor preta) são formados como
18 uma defesa do genoma contra a amplificação de elementos transponíveis (F). A amplificação
19 da heterocromatina em regiões flanqueadoras dos genes induz a um processo de silenciamento

1 dos mesmos e estes, por serem dispensáveis devido à sua inatividade, podem ser eliminados
2 gradativamente (G). No estágio final de evolução dos cromossomos sexuais (H) o cromossomo
3 Y encontra-se totalmente degenerado e diferenciado em relação ao cromossomo X, portando
4 apenas alguns genes relacionados à determinação do sexo.

5 Os cromossomos Y encontrados em muitas espécies de vertebrados, especialmente de
6 mamíferos, são em grande parte não-recombinantes com os cromossomos X. No entanto, a
7 vantagem de transmissão em concerto de alelos vantajosos aos machos, fornecida pela ausência
8 de recombinação, é contrabalançada pela incapacidade de remover com eficiência as mutações
9 deletérias. Pelo acúmulo de mutações, genes ligados ao Y degeneram e se perdem facilmente,
10 uma vez que a seleção já não está mais agindo para preservá-los. Como resultado, nos últimos
11 estágios de sua evolução, o cromossomo Y contém apenas um pequeno número de genes
12 funcionais, tamanho bastante reduzido e segmentos heterocromatinizados. A única parte do
13 cromossomo Y que escapa da degeneração é a chamada região pseudo-autossômica (ou de
14 emparelhamento) – *PAR*, que ainda mantém homologia e é capaz de se recombinar com uma
15 região correspondente do cromossomo X. O emparelhamento XY é crucial para a segregação
16 correta dos cromossomos sexuais na meiose masculina. Cromossomos sexuais humanos
17 apresentam duas *PARs* localizadas nas pontas de seus braços, abrangendo 3Mb, ou seja, 5,0% e
18 1,8% dos cromossomos Y e X, respectivamente. O tamanho da região *PAR* varia entre as
19 espécies de acordo com o estágio evolutivo dos cromossomos sexuais. A proteção dos genes
20 funcionais específicos do sexo masculino, localizados na região não recombinante do
21 cromossomo Y, pode ser assegurada através do aumento do número de cópias de genes
22 individuais. Cópias adicionais podem substituir cópias antigas quando uma mutação deletéria
23 inativa uma dessas cópias. De fato, as regiões específicas do cromossomo Y humano e dos
24 macacos são compostas de um grande número de palíndromos que contem muitos genes

1 específicos de função testiculares, apresentando elevado grau de similaridade, indicando o
2 surgimento por eventos de duplicação (Rozen et al.2003).

3 Em grande parte das espécies animais, bem como das plantas dióicas, o cromossomo em
4 que a recombinação foi suprimida carrega o alelo determinante do sexo masculino (sistema de
5 determinação de sexo XY, com heterogametia masculina). Em aves, borboletas e em alguns
6 répteis e peixes o sistema oposto evoluiu, onde o cromossomo não-recombinante carrega o
7 alelo determinante do sexo feminino (sistema de determinação de sexo ZW, com heterogametia
8 feminina). O sexo portador de cromossomos sexuais distintos é denominado heterogamético
9 (machos XY e fêmeas ZW), enquanto o sexo com dois cromossomos sexuais idênticos é dito
10 homogamético (fêmeas XX e machos ZZ). Em alguns organismos, podem ocorrer variações
11 destes sistemas, onde o número de cromossomos sexuais é menor ou maior que dois. Assim,
12 por exemplo, no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, os machos têm apenas um cromossomo
13 sexual enquanto os indivíduos hermafroditas apresentam dois. Este sistema de determinação do
14 sexo XX/X0 também está presente em muitos insetos e algumas espécies de peixes, onde os
15 espécimes com dois cromossomos X são do sexo feminino. No outro extremo encontra-se no
16 ornitorrinco *Ornithorhynchus anatinus*, que apresenta cinco cromossomos Y e cinco
17 cromossomos X, formando uma grande cadeia cromossômica na meiose masculina (Grüztner et
18 al. 2004).

19 No entanto, muitas espécies não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos. Em
20 muitos répteis, anfíbios e na maioria dos peixes, mesmo que o sexo seja determinado
21 geneticamente, os cromossomos sexuais não podem ser distinguidos morfológicamente.
22 Entretanto, em muitos répteis e em alguns peixes a determinação do sexo é controlada por um
23 estímulo ambiental, geralmente a temperatura em que os ovos são incubados. De fato, répteis e

1 peixes parecem ter evoluído uma grande variedade de mecanismos de determinação do sexo,
2 onde os genes primários sexo-determinantes não foram ainda identificados (Schartl, 2004).
3 Especificamente em relação aos peixes, os sistemas de cromossomos sexuais mostram uma
4 grande variedade. Sistemas ZW e XY são os mais comuns, mas há vários exemplos de sistemas
5 XO, X_1X_2Y , XY_1Y_2 e ZW_1W_2 , além da presença de distintos cromossomos sexuais em
6 populações de uma mesma espécie (Devlin & Nakayama, 2002). Uma das melhores espécies
7 estudadas é o platifish *Xiphophorus maculatus*, onde três tipos de cromossomos sexuais (X, W
8 e Y) coexistem em uma população (Nanda et al. 2000; Volff & Schartl, 2001). Além disso, a
9 diferenciação dos cromossomos sexuais pode diferir entre espécies congênicas ou mesmo
10 entre populações da mesma espécie (Moreira-Filho et al. 1993; Almeida-Toledo & Foresti,
11 2001; Bertollo, 2007).

12 **1.2 Peixes: diversidade e importância em estudos evolutivos e genéticos**

13 Os peixes exibem uma enorme diversidade morfológica e de habitats, assim como na sua
14 biologia. Toda essa diversidade dificulta, em parte, o completo entendimento da sua história
15 evolutiva, assim como a classificação precisa de diversos grupos. Atualmente o termo “peixes”
16 designa um agrupamento que é parafilético, onde o ancestral comum mais recente está incluído,
17 mas nem todos os seus descendentes. Assim, este termo é utilizado por uma questão de
18 conveniência, essencialmente descrevendo os vertebrados aquáticos que possuem braquias ao
19 longo de toda a vida e membros, se presentes, na forma de nadadeiras. Nelson (2006), sugeriu a
20 presença de quase 28 mil espécies de peixes entre as quase 55 mil espécies reconhecidas de
21 vertebrados. Cada continente apresenta uma fauna de peixes de água doce particular, onde os
22 padrões distintos de distribuição são decorrentes de barreiras físicas que interromperam a
23 dispersão de muitas espécies antepassadas. A maioria das espécies de peixes ocorre nas regiões

1 tropicais e subtropicais, com uma redução global na diversidade em regiões temperadas e
2 polares (Lévêque et al. 2008).

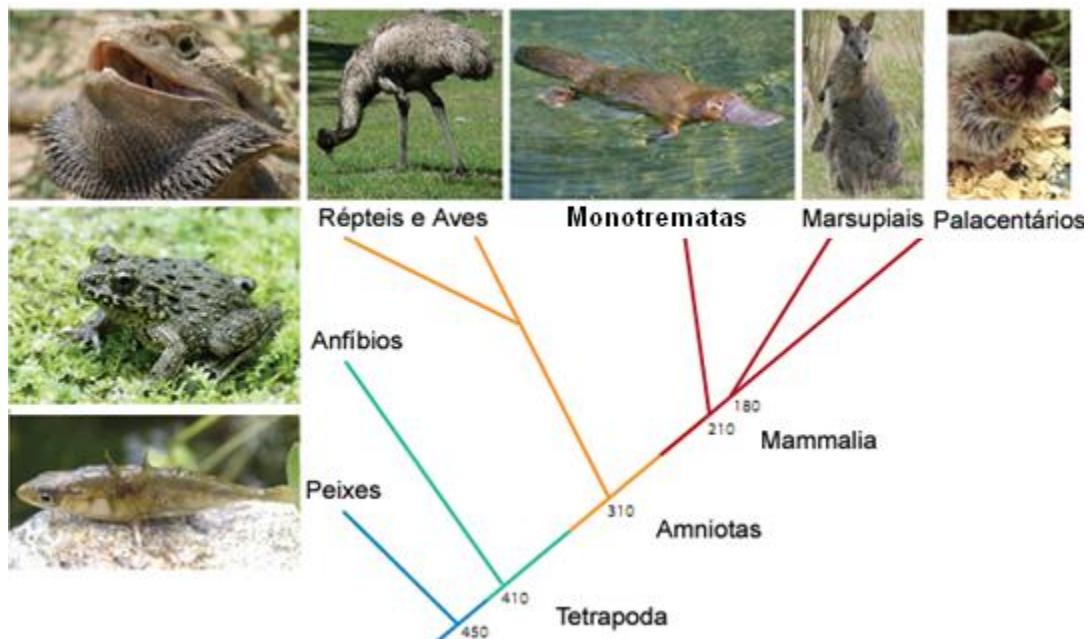
3 De modo particular, a região Neotropical corresponde a um grande repositório de
4 informação genética e sua biodiversidade tem uma enorme importância econômica e ecológica.
5 O número de espécies de peixes de água doce no mundo é estimado como sendo de
6 aproximadamente 13.000 espécies e, mesmo considerando que diversos componentes da
7 ictiofauna Neotropical ainda são desconhecidos, estima-se que em torno de 6.000 espécies de
8 peixes de água doce ocorrem nesta região (Reis et al. 2003), o que corresponde ao redor de
9 25% de todas as espécies de peixes do mundo (Oliveira et al. 2007). De fato, o sistema
10 hidrográfico que drena a região Neotropical é altamente dendrítico, cobrindo uma área grande e
11 diversificada em relação às suas condições naturais. Considerando o cenário evolutivo e as
12 mudanças climáticas e geomorfológicas que ocorreram durante milhões de anos, os peixes
13 modernos que habitam a região Neotropical surgiram como resultado de suas adaptações ao
14 longo do processo evolutivo (Nelson, 2006). O sucesso dessa conquista é agora representado
15 por uma fauna de peixes muito variada - a mais rica do mundo em número de espécies. Padrões
16 filogenéticos e biogeográficos indicam que na maioria dos grupos de peixes Neotropicais a
17 diversificação ocorreu gradativamente, em grandes escalas espaciais e temporais, com a
18 especiação ocorrendo em grande parte da plataforma continental ao longo de dezenas de
19 milhões de anos. Em adição, processos de vicariância e dispersão influenciaram profundamente
20 na formação de novas espécies. Portanto, é importante que a exploração da biologia evolutiva
21 dos peixes Neotropicais seja feita à luz de abordagens multidisciplinares para a sua plena
22 compreensão, onde a citogenética representa uma das ferramentas importantes de apoio a
23 estudos sistemáticos e evolutivos.

1 Pelo fato de apresentarem a maior biodiversidade entre os vertebrados, os peixes
2 constituem um grupo extremamente atraente para o estudo de uma série de questões evolutivas.
3 Tem sido sugerido que toda essa diversidade possa ser decorrente de mudanças genéticas
4 possivelmente mais rápidas no genoma dos peixes do que em outros grupos de vertebrados
5 (Venkatesh, 2003). Além da ocorrência de poliploidização, vários eventos de duplicações
6 gênicas independentes parecem ter ocorrido entre os peixes. Há evidências substanciais de que
7 um evento antigo de duplicação do genoma (tetraploidização) esteja relacionado com a
8 diversificação de funções dos genes e especiação em várias linhagens (Zhang et al. 2002). O
9 amplo espectro de sistemas de determinação do sexo encontrado nos peixes também ilustra a
10 plasticidade de seus genomas, com muitas espécies apresentando hermafroditismo, algumas
11 apresentando até mesmo mudança de sexo em um estágio específico de seu ciclo de vida
12 (Ohno, 1967; Devlin & Nakahama, 2002).

13 Embora tradicionalmente os peixes tenham sido alvo de estudos evolutivos ao longo de
14 muitos anos, recentemente eles vêm sendo também utilizados como modelos em pesquisas de
15 genômica e genética molecular, com muitos projetos de seqüenciamento do genoma em curso
16 ou já concluídos. Entre as espécies utilizadas para estes propósitos, destacam o catfish *Ictalurus*
17 *punctatus*, a truta *Oncorhynchus mykiss*, o salmão do Atlântico *Salmo salar*, o stickleback
18 *Gasterosteus aculeatus*, a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, os pufferfishes *Takifugu*
19 *rubripes* e *Tetraodon nigroviridis*, o platyfish *Xiphophorus maculatus*, o medaka *Oryzias*
20 *latipes*, o verdemã *Cobitis taenia* e o popular zebrafish *Danio rerio*, utilizado como modelo em
21 estudos de desenvolvimento e funções gênicas (Mayden et al. 2007).

22 De fato, uma vez que os peixes ocupam uma posição basal na filogenia dos vertebrados,
23 estudos em espécies modelos contribuem para esclarecer diversas questões relacionadas com a

1 organização do genoma e evolução dos vertebrados (**Figura 2**). No entanto, a exploração dessa
2 enorme biodiversidade ainda é um campo a ser em grande parte desbravado. Neste cenário, os
3 estudos citogenéticos vêm trazendo contribuições importantes para o conhecimento do genoma
4 dos peixes. Nas últimas duas décadas, uma grande quantidade de dados tem sido gerada,
5 envolvendo principalmente o mapeamento de seqüências repetitivas de DNA nos cromossomos
6 de diversas espécies de peixes (Martins, 2007). Avanços nos estudos sobre a organização
7 cromossômica dessas seqüências de DNA têm mostrado que elas desempenham um papel
8 importante na organização estrutural e funcional dos genomas (Schueler et al. 2001; Biémont &
9 Vieira, 2006), além de proporcionar novos conhecimentos para a compreensão dos mecanismos
10 de evolução genômica e cariotípica, bem como para o processo de diferenciação dos
11 cromossomos sexuais em muitas espécies de vertebrados.



12 **Figura 2:** Filogenia e tempos de divergência propostos para as diferentes classes de
13 vertebrados, e das subclasses de mamíferos Prototheria (Monotremados) e Theria, que
14 compreende as infraclasses Placentários (Eutheria) e Marsupiais (Metatheria). As imagens são
15 do peixe stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, do sapo *Rana rugosa*, do lagarto *Pogona*
16 *vitticeps*, do emu *Dromaius novaehollandiae*, do ornitorrinco *Ornithorhynchus anatinus*, do
17 canguru *Macropus eugenii* e do roedor *Ellobius tancrei* (modificada de Graves, 2008).

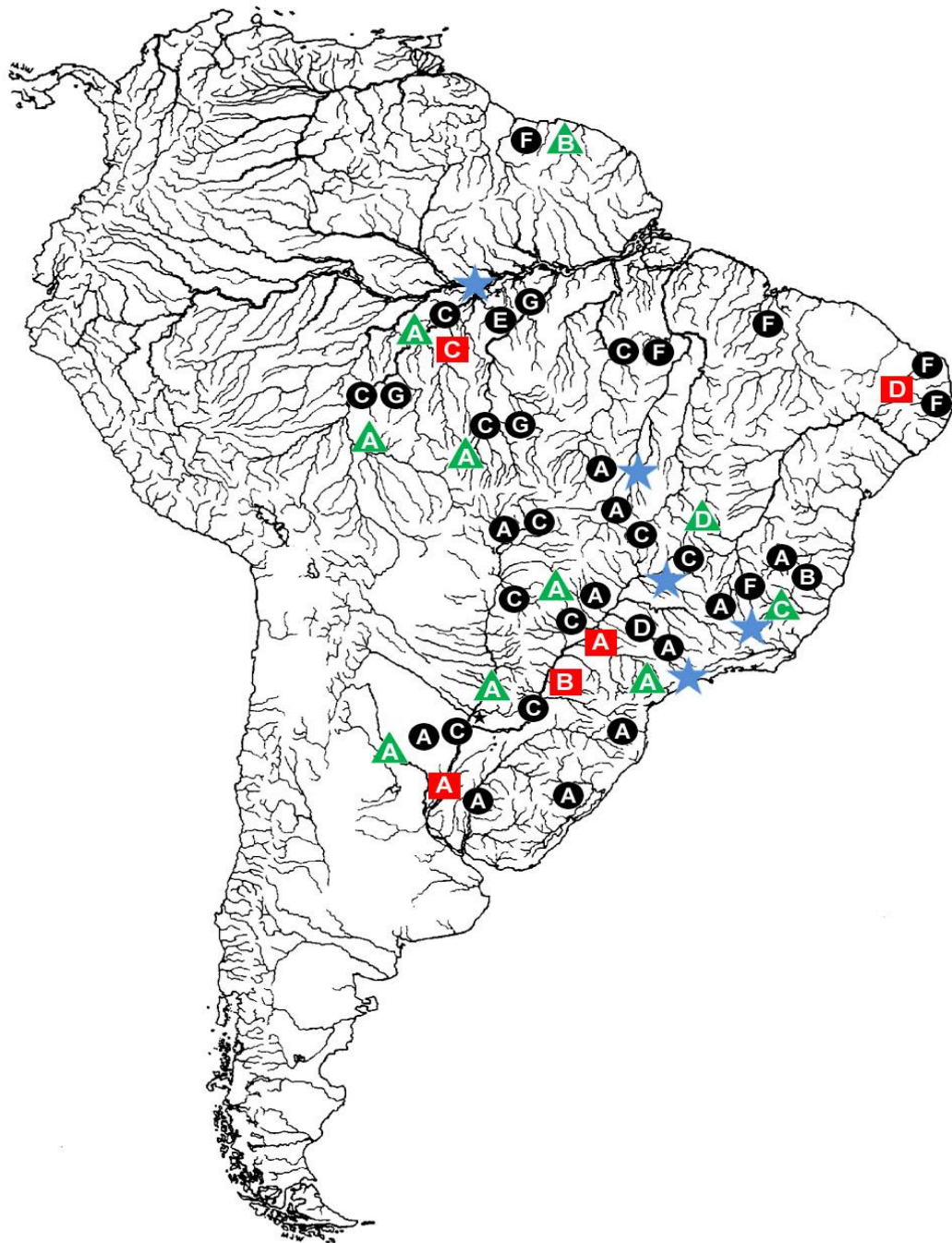
1 **1.3 A família Erythrinidae: aspectos gerais e estudos citogenéticos**

2 A família Erythrinidae, amplamente distribuída na região Neotropical, é relativamente
3 pequena entre os peixes Characiformes, compreendendo apenas três gêneros: *Hoplias* Gill,
4 1903; *Hoplerythrinus* Gill, 1895 e *Erythrinus* Scopoli, 1777, todos endêmicos às Américas do
5 Sul e Central. Esta família é considerada como membro de um clado composto pelas famílias
6 Lebiasinidae, a africana Hepsetidae e Ctenolucidae (Vari et al. 1995). Anteriormente Fink &
7 Fink (1981) também haviam sugerido uma estreita relação dos Erythrinidae com Ctenolucidae
8 e Hepsetidae.

9 Os Erythrinidae são restritos à América do Sul, ocorrendo uma maior diversidade de
10 espécies na bacia Amazônica, sendo popularmente conhecidos como traíras ou trairões
11 (*Hoplias*) e jejús (*Hoplerythrinus* e *Erythrinus*). *Hoplias malabaricus* é o grupo que apresenta a
12 distribuição geográfica mais ampla, aparentemente presente na maioria das bacias hidrográficas
13 sul-americanas (Oyakawa, 2003).

14 Apesar de ser uma família relativamente pequena, em comparação com outros grupos de
15 peixes Neotropicais, a identificação precisa das espécies desta família é bastante problemática.
16 Oyakawa (2003) relata apenas duas espécies para o gênero *Erythrinus* (*E. erythrinus* e *E.*
17 *kessleri*) e três para o gênero *Hoplerythrinus* (*H. unitaeniatus*, *H. cinereus* e *H. gronovii*) e
18 cerca de nove espécies para o gênero *Hoplias*. Entretanto, *H. malabaricus* e *H. lacerdae*
19 correspondem, na realidade, a um grupo de espécies (Oyakawa, 1990). Em uma recente revisão
20 baseada em dados merísticos e morfométricos, foram identificadas cinco espécies distintas para
21 o grupo *H. lacerdae*, ou seja, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H.*
22 *curupira*, estas duas últimas correspondendo a espécies novas (Oyakawa & Mattox, 2009). No

- 1 que se refere ao grupo *H. malabaricus*, a problemática taxonômica permanece ainda a ser
- 2 resolvida.



- 3 **Figura 3:** Distribuição dos cariomorfos A-G de *Hoplias malabaricus* (círculos); grupo *Hoplias*
- 4 *lacerdae* (estrelas); cariomorfos A-D de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (triângulos) e cariomorfos
- 5 A-D de *Erythrinus erythrinus* (quadrados) na América do Sul. (Dados de Cioffi et al. *in press*).

- 1 **Tabela 1:** Dados cariotípicos para a família Erythrinidae. *O “grupo *Hoplias lacerdae*”
 2 engloba várias espécies, porém com o mesmo cariótipo. A-G correspondem aos diferentes
 3 cariomorfos conhecidos para cada espécie.

Espécies / Número diplóides	Cariótipos	Cromossomos sexuais
<i>Hoplias malabaricus</i>		
A 2n=42	♀♂ 42 m/sm	Não-diferenciados
B 2n=42	♀ 40 m/sm + 2 st	XX
	♂ 41 m/sm + 1 st	XY
C 2n=40	♀ 40 m/sm	XX
	♂ 40 m/sm	XY
D 2n=40/39	♀ 40 m/sm	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 39 m/sm	X ₁ X ₂ Y
E 2n=42	♀♂ 40 m/sm + 2a	Não-diferenciados
F 2n=40	♀♂ 40 m/sm	Não-diferenciados
G 2n=40/41	♀ 40 m/sm	XX
	♂ 40 m/sm	XY ₁ Y ₂
<i>Erythrinus erythrinus</i>		
A 2n=54	♀♂ 46 a + 2 st + 6 m	Não-diferenciados
B 2n=54/53	♀ 46 a + 2 st + 6m	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 44 a + 2 st + 7m	X ₁ X ₂ Y
C 2n=52/51	♀ 38 a + 6 st + 8 m/sm	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 36 a + 6 st + 9 m/sm	X ₁ X ₂ Y
D 2n=52/51	♀ 44 a + 2 st + 6 m/sm	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 42 a + 2 st + 7 m/sm	X ₁ X ₂ Y
<i>Hoplerythrinus uniteniatus</i>		
A 2n=48	♀♂ 48 m/sm	Não-diferenciados
B 2n=48	♀♂ 46 m/sm + 2 a	Não-diferenciados
C 2n=52	♀♂ 46 m/sm + 6 a	Não-diferenciados
D 2n=52	♀♂ 44 m/sm + 2 st + 4 a	Não-diferenciados
Grupo <i>Hoplias lacerdae</i> *		
2n=50	♀♂ 50 m/sm	Não-diferenciados

1 Os eritrínídeos apresentam, em geral, grandes variações cariotípicas entre seus
2 representantes (Bertollo et al. 2000; Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz & Bertollo, 2003). Os
3 primeiros estudos citogenéticos neste grupo, com base na análise cromossômica convencional,
4 já mostraram a ocorrência de variações entre populações de *H. malabaricus* em termos de
5 número de cromossomos, composição de cariótipos e distintos sistemas de cromossomos
6 sexuais (Bertollo et al. 1978; 1979; 1983). Além dos estudos convencionais, análises de
7 citogenética molecular provaram ser uma ferramenta valiosa para estudos focados na evolução
8 cariotípica.

9 As espécies do grupo *H. lacerdae* têm apresentado, até o presente momento, uma
10 macroestrutura cariotípica conservada em relação ao número cromossômico diplóide ($2n=50$) e
11 fórmula cariotípica, como todos os cromossomos do tipo meta- e submetacêntricos, sem a
12 presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (Bertollo et al. 1978;
13 Morelli et al. 2007; Blanco et al. 2010). Entretanto, diferenciações no tocante a distribuição de
14 DNAs repetitivos podem ser observadas nos cariótipos de diferentes espécies (Blanco et al.
15 2011). Assim sendo, ao que tudo indica as espécies desse grupo aparentemente se enquadram
16 entre alguns casos conhecidos onde a especiação não foi acompanhada por mudanças
17 acentuadas em nível cromossômico macroestrutural. Este fato representa uma exceção dentre os
18 Erythrinidae, frente à diversidade cariotípica que tem sido geralmente constatada entre as
19 demais espécies dessa família (**Tabela 1; Figura 3**).

20 Embora usualmente referida como uma única entidade taxonômica, *H. malabaricus* possui
21 uma grande diversidade cariotípica, apresentando diferenças populacionais significativas
22 (Bertollo et al. 1983; Dergam & Bertollo, 1990; Bertollo et al. 1997a, 1997b, 2000; Born &
23 Bertollo, 2000; Vicari et al. 2005). Apesar de uma ampla distribuição geográfica, este grupo

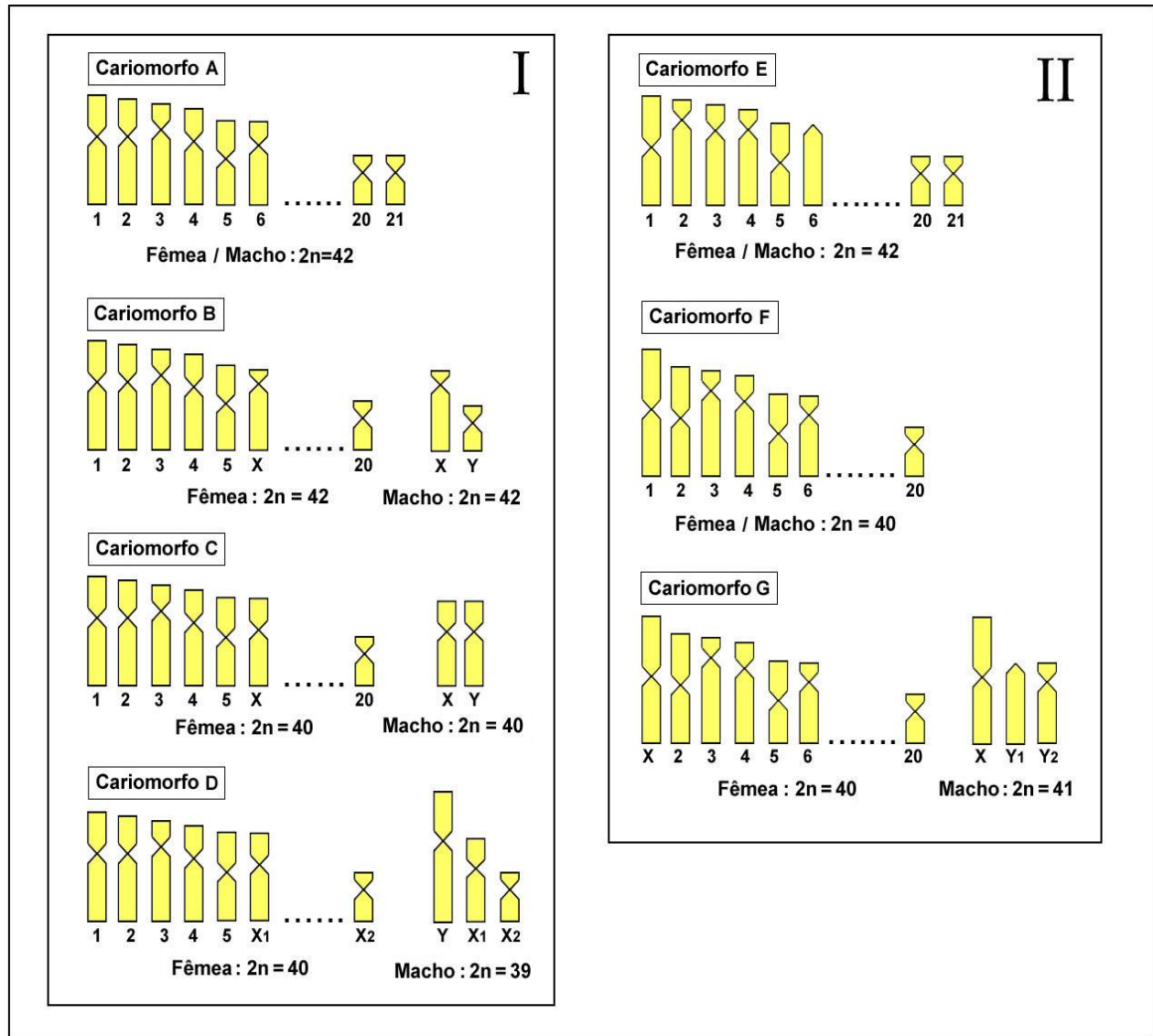
1 apresenta uma baixa capacidade migratória, o que deve favorecer a manutenção de rearranjos
2 cromossômicos em pequenas populações e, conseqüentemente, um aumento na variabilidade
3 cariotípica interpopulacional.

4 Os dados cromossômicos referentes à *H. malabaricus* corroboram a ocorrência de um
5 grupo de espécies, onde sete cariomorfos distintos (A-G) já foram diferenciados pelo número
6 diplóide, morfologia dos cromossomos e sistemas diferenciados de cromossomos sexuais
7 (Bertollo et al. 2000) (**Tabela 1**). Considerando a morfologia cariotípica geral, Bertollo et al.
8 (2000) reconheceram dois grupos cromossômicos maiores em *H. malabaricus*, um deles
9 constituído pelos cariomorfos A, B, C, D (Grupo 1) e o outro pelos cariomorfos E, F, G (Grupo
10 2) (**Figura 4**).

11 O cariomorfo A é caracterizado pela presença de $2n = 42$ cromossomos meta- e
12 submetacêntricos em ambos os sexos, sem um aparente sistema de cromossomos sexuais. O
13 cariomorfo B também possui $2n = 42$, tanto em machos como em fêmeas, sendo a estrutura
14 cariotípica geral semelhante à do cariomorfo A. Entretanto, este cariomorfo pode ser
15 diferenciado por um sistema de cromossomos sexuais exclusivo, do tipo XX/XY, onde as
16 fêmeas apresentam dois cromossomos X subtelocêntricos e os machos apenas um destes
17 cromossomos, juntamente com um pequeno cromossomo submetacêntrico, o menor do
18 complemento cariotípico, correspondendo ao cromossomo Y. O cariomorfo C apresenta $2n =$
19 40 com cromossomos do tipo meta- e submetacêntricos, tanto em machos como em fêmeas,
20 sem um sistema morfologicamente diferenciado de cromossomos sexuais. O cariomorfo D é
21 caracterizado por $2n = 40$ e $2n = 39$ nas fêmeas e nos machos, respectivamente, devido a um
22 sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Bertollo et al. 1997b,
23 2000). O cariomorfo E possui $2n=42$, assim como os cariomorfos A e B. Entretanto,

1 diferencia-se destes últimos pelo tamanho relativamente maior do primeiro par de
2 cromossomos, assim como pela presença de um par de cromossomos acrocêntricos (par 6), o
3 que representa uma característica rara no grupo *H. malabaricus*. O cariomorfo F possui $2n=40$
4 cromossomos nos machos e nas fêmeas, sem um sistema de cromossomos sexuais
5 diferenciados. Diferencia-se do cariomorfo C pela presença de um par metacêntrico grande, o
6 maior em tamanho entre os representantes do grupo *H. malabaricus*, enquanto que o segundo
7 par cromossômico corresponde, tanto no tamanho como na morfologia, ao primeiro par
8 encontrado no cariomorfo E. O cariomorfo G possui uma estrutura cariotípica similar àquela
9 apresentada pelo cariomorfo F, diferenciando-se pela presença de $2n=40$ nas fêmeas e $2n=41$
10 nos machos, devido a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 . O
11 cromossomo X corresponde ao metacêntrico grande que caracteriza o primeiro par do cariótipo,
12 enquanto que o cromossomo Y_1 corresponde a um acrocêntrico e o cromossomo Y_2 a um
13 submetacêntrico, ambos de tamanho médio, sem correspondência no cariótipo das fêmeas. A
14 Figura 3 mostra a distribuição geográfica, até então conhecida, para esses cariomorfos de *H.*
15 *malabaricus*.

16 A provável ocorrência de um grupo de espécies em *H. malabaricus* é reforçado pela
17 simpatria entre alguns cariomorfos, sem evidências de fluxo gênico entre eles (Bertollo et al.
18 2000) Especificamente para os cariomorfos A e C e para os cariomorfos A e D, os resultados
19 obtidos com marcadores genômicos de RAPD-PCR também foram congruentes com ausência
20 de fluxo gênico, promovendo evidências adicionais para os cariomorfos como unidades
21 evolutivas distintas (Dergam et al. 1998).



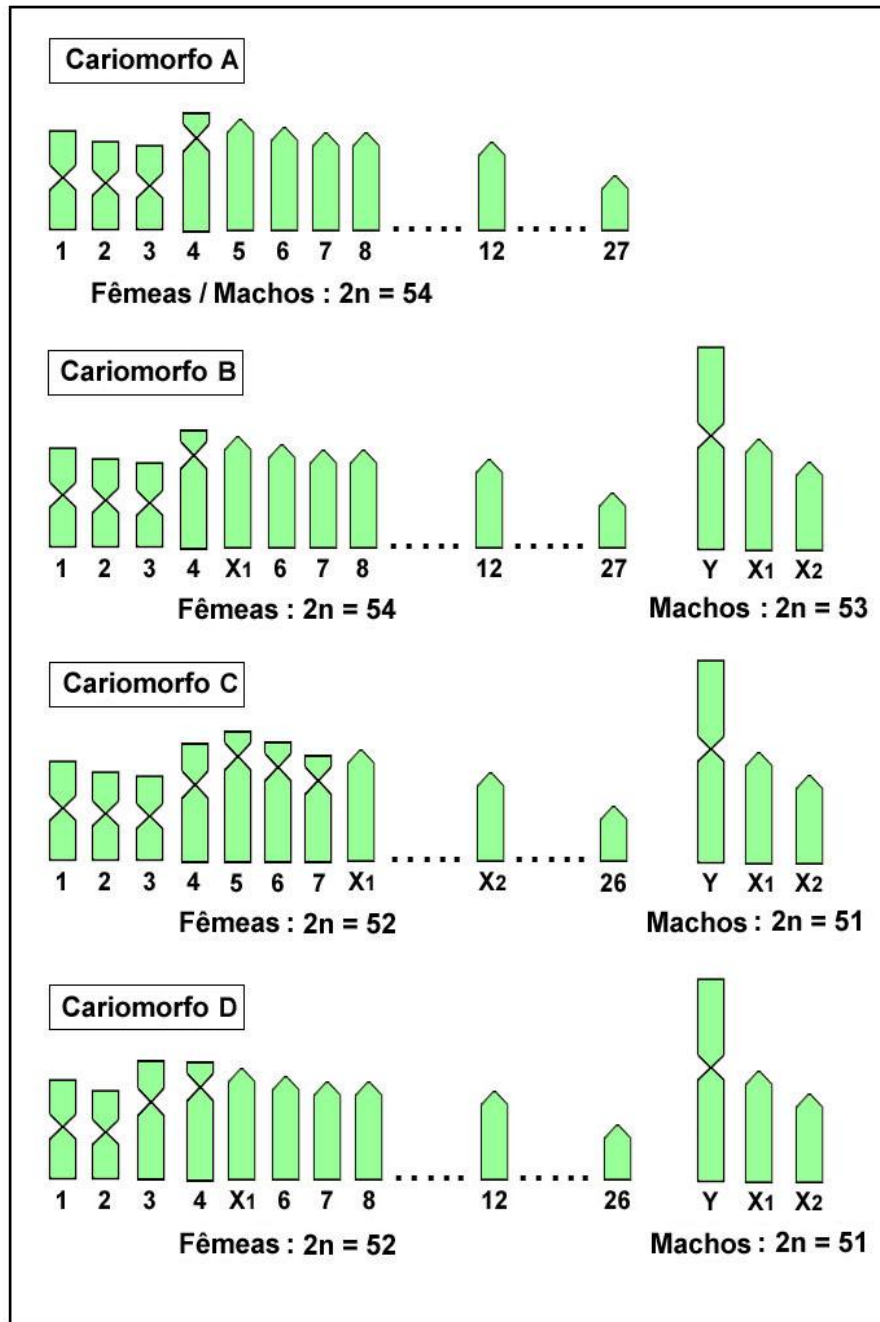
1 **Figura 4:** Variabilidade cromossômica encontrada na espécie *Hoplias malabaricus*. Idiogramas
 2 parciais dos kariomorfos A-D (Grupo I) e E-G (Grupo II), realçando as diferenças observadas
 3 quanto aos números diplóides, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais
 4 (Dados de Cioffi et al. *in press*).

1 Estudos mais recentes conduzidos no grupo I mostraram que os cariomorfos A e B
2 apresentam uma constituição cariotípica geral mais similar com os cariomorfos C e D, apesar
3 das diferenças existentes quanto aos números diplóides e sistemas de cromossomos sexuais. A
4 distribuição de diferentes classes de DNAs repetitivos (incluindo DNA ribossomais, DNAs
5 satélite, seqüências teloméricas, e várias repetições microssatélites), destacou a estreita relação
6 entre estes quatro cariomorfos, dando apoio adicional para a proposição de que eles na verdade
7 constituem um grupo evolutivo bem relacionado dentro de *H. malabaricus*. Foi demonstrada a
8 proximidade evolutiva entre os cariomorfos AB e CD com base nas características específicas
9 que compartilham (Cioffi et al. 2009a). De fato, a fração repetitiva do genoma constitui um
10 marcador muito útil em estudos evolutivos, permitindo a identificação de modificações
11 genômicas significativas durante o curso da evolução desses cariomorfos.

12 Estudos citogenéticos em *Hopleryrhinus* foram inicialmente conduzidos por Giuliano-
13 Caetano (1986), em uma análise comparativa entre populações de *H. unitaeniatus* pertencentes
14 à diferentes bacias hidrográficas do Brasil. Neste estudo foi constatado que diferenças
15 cariotípicas intra- e interpopulacionais também ocorrem nesse grupo, evidenciando uma
16 diversidade “intraespecífica” e a possível ocorrência de espécies crípticas. Na população do Rio
17 Negro (Manaus, AM), foi verificada a presença de 4 citótipos distintos, provavelmente
18 associados a inversões cromossômicas. A somatória desses dados, com os já obtidos em
19 diversas outras populações, foram compilados mostrando uma diversidade cariotípica nessa
20 espécie, tanto numérica como estrutural, com números diplóides variando de $2n=48$ a $2n=52$,
21 associados à números também variáveis de cromossomos acrocêntricos nos cariótipos
22 (Guiliano-Caetano et al. 2001; Diniz et al. 2003). Entretanto, até o presente momento, nenhum
23 heteromorfismo sexual foi detectado nesse gênero de Erythrinidae (**Tabela 1**). Levando-se em

1 conta os dados citogenéticos disponíveis, *H. unitaeniatus* pode também corresponder a um
2 grupo de distintas espécies, requerendo uma análise taxonômica pormenorizada.

3 *Erythrinus* é o gênero citogeneticamente menos conhecido da família Erythrinidae. Dados
4 reunidos em um único estudo, conduzido por Bertollo et al. (2004), também evidenciaram a
5 ocorrência de variações cariotípicas interpopulacionais em *E. erythrinus*, onde quatro
6 cariomórfos (A-D) puderam ser claramente identificados (**Tabela 1**). O cariomorfo A,
7 representado pelas populações de Birigui (SP), Penápolis (SP) e Resistência (AR), caracteriza-
8 se por $2n=54$ cromossomos, sendo $6M + 2ST + 46A$. Os cariomorfos B a D se diferenciam do
9 cariomorfo A pela presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo
10 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. O cariomorfo B, representado pela população de Guaíra (PR), apresenta
11 $2n=54$ cromossomos nas fêmeas ($6M + 2ST + 46A$) e $2n=53$ cromossomos nos machos ($7M +$
12 $2ST + 44A$). Os cariomorfos C e D apresentam $2n=52/51$ cromossomos nas fêmeas e machos,
13 respectivamente, diferindo quanto ao número de cromossomos metacêntricos, subtelocêntricos
14 e acrocêntricos. Assim, o cariomorfo C, representado pela população de Manaus (AM),
15 apresenta uma estrutura cariotípica formada por $6M + 2SM + 6ST + 38A$ nas fêmeas e $7M +$
16 $2SM + 6ST + 36A$ nos machos. Por sua vez, o cariomorfo D, representado pela população de
17 Natal (RN), apresenta o cariótipo composto por $4M + 2SM + 2ST + 44A$ nas fêmeas e $5M +$
18 $2SM + 2ST + 42A$ nos machos. A grande variabilidade cromossômica encontrada em *E.*
19 *erythrinus*, com rearranjos cromossômicos já fixados entre diferentes populações isoladas, além
20 da ocorrência/ausência de cromossomos sexuais diferenciados entre as populações, é também
21 indicativa da existência de um grupo de espécies distintas nesse grupo de Erythrinidae (**Figuras**
22 **3 e 5**).



1 **Figura 5:** Variabilidade cromossômica encontrada na espécie *Erythrinus erythrinus*.
2 Idiogramas parciais dos cariomorfos A-D realçando as diferenças observadas quanto aos
3 números diplóides, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais (Dados de
4 Cioffi et al. *in press*).

1 **1.3.1 Os sistemas de cromossomos sexuais na família Erythrinidae**

2 Nenhum dos espécimes do gênero *Hoplerythrinus* estudados até o presente momento
3 apresentaram cromossomos sexuais heteromórficos (Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz &
4 Bertollo, 2003). O mesmo pode ser dito em relação às espécies do grupo *Hoplidas lacerdae*, que
5 apresentam macroestrutura cariotípica muito conservada sem a presença de cromossomos
6 sexuais morfologicamente diferenciados (Morelli et al. 2007).

7 Por sua vez, no gênero *Erythrinus* algumas populações de *E. erythrinus* apresentam um
8 sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, com diferentes números
9 diplóides ($2n=54/53$ e $52/51$), ao lado de populações com $2n=54$ cromossomos, em ambos os
10 sexos, sem cromossomos sexuais diferenciados. Aparentemente, o cromossomo Y é resultante
11 de fusões cêntricas entre diferentes pares de cromossomos acrocêntricos do cariótipo,
12 resultando em um grande cromossomo metacêntrico (Y), o maior do complemento cariotípico
13 (Bertollo et al. 2004). Provavelmente a diferenciação desse sistema sexual não foi basal,
14 considerando que sua presença não é constante entre as diferentes populações desta espécie.

15 O grupo *H. malabaricus* é o que tem sido mais estudado entre os Erythrinidae no tocante
16 aos cromossomos sexuais, onde vários sistemas, simples e múltiplos, já foram descritos e bem
17 caracterizados em vários cariomorfos, com o uso de diversos marcadores moleculares. No
18 cariomorfo B, portador de um sistema XX/XY, evidências prévias indicavam que a
19 diferenciação deste sistema provavelmente teria ocorrido por um processo de
20 heterocromatinização, resultando em um grande cromossomo X subtelocêntrico, com um
21 conspícuo bloco heterocromático ocupando boa parte do braço longo, co-localizado com um
22 sítio de RON com um comportamento polimórfico (Born & Bertollo, 2000). O mapeamento
23 físico de DNAs repetitivos permitiu verificar que estas seqüências desempenharam um papel

1 importante no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais deste cariomorfo, como
2 evidenciado pelo padrão de distribuição de cinco classes de DNAs repetitivos (Cioffi et al.
3 2010a). Assim, foi observado que os cromossomos sexuais do cariomorfo B e o par
4 cromossômico No. 21 do cariomorfo A aparentam apresentar homeologia entre si, uma vez que
5 a ocorrência de cístrons de DNAr 18S, seqüências (GATA)_n e sítios de 5SHindIII-DNA estão
6 sendo compartilhados por esses cromossomos, reforçando suas possíveis inter-relações. Ao
7 mesmo tempo, esses dados sugerem o possível papel dessas classes de DNA repetitivos na
8 evolução do sistema de cromossomos sexuais XX/XY por um processo de
9 heterocromatinização (Cioffi et al. 2010a).

10 Em relação ao sistema X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y, presente no cariomorfo D, análises meióticas,
11 bandamentos C-, G - e de replicação permitiram uma boa caracterização dos cromossomos
12 sexuais, indicando que este sistema teria se originado a partir de uma fusão cromossômica em
13 tandem (Bertollo et al. 1997a; Bertollo & Mestriner, 1998). Adicionalmente, uma análise
14 comparativa geral entre os distintos cariomorfos de *H. malabaricus*, sugeriu que o cariomorfo
15 D (2n=40 nas fêmeas / 2n=39 nos machos) seria provavelmente derivado de um cariótipo
16 semelhante ao encontrado no cariomorfo C (2n=40 em ambos os sexos) (Bertollo et al. 2000).
17 Novamente, o mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos foi resolutivo, permitindo a
18 identificação de marcadores moleculares associados com a diferenciação desse sistema, além
19 de confirmar sua correlação com cromossomos presentes no cariomorfo C (Cioffi & Bertollo,
20 2010). Assim, o par cromossômico No. 11, presente no cariomorfo C, mostrou uma perfeita
21 correspondência com os cromossomos X₁ e Y do cariomorfo D, devido a presença de uma
22 região proximal CMA₃ positiva, co-localizada com um sítio de DNAr 18S, apontando a
23 associação deste par cromossômico com a origem do neo-cromossomo Y do cariomorfo D.

1 Adicionalmente, a ocorrência de sítios teloméricos intersticiais no cromossomo Y do
2 cariomorfo D fortaleceu a hipótese da origem do sistema X_1X_2Y por um evento de fusão em
3 tandem. Apesar do cariomorfo C não possuir cromossomos sexuais diferenciáveis quanto ao
4 tamanho e morfologia (Bertollo et al. 2000), foi possível verificar que o par No. 11 deste
5 cariomorfo, embora morfologicamente indiferenciado, apresenta um heteromorfismo entre
6 machos e fêmeas no tocante a um sítio de heterocromatina associada ao DNAr 18S, de natureza
7 GC- rica, revelando um sistema de cromossomos sexuais XX/XY em estágio nascente (Cioffi
8 & Bertollo, 2010).

9 O sistema XX/XY_1Y_2 , presente no cariomorfo G de *H. malabaricus*, ainda carece de uma
10 análise mais pormenorizada, tanto por marcadores clássicos (bandamento C, Ag-RONs) como
11 moleculares (mapeamento de seqüências repetitivas). Os dados até então disponíveis sugerem
12 que a origem desse sistema deve estar associada com rearranjos provavelmente relacionados
13 com um cromossomos acrocêntricos e submetacêntricos presentes no cariomorfo E, indicando
14 assim uma origem possivelmente distinta dos demais sistemas de cromossomos sexuais
15 presentes nos outros cariomorfos desta espécie (Bertollo et al. 2000).

16 **1.4 DNAs repetitivos e seu papel na organização genômica dos peixes**

17 Sequências de DNA que apresentam pelo menos duas, ou mais usualmente várias cópias
18 no genoma, podem ser classificadas como repetitivas. Grande parte dos projetos de
19 seqüenciamento realizados nos últimos anos vem mostrando que esta fração genômica é ainda
20 maior do que se supunha. De fato, os DNAs repetitivos correspondem a uma fração
21 considerável do genoma eucariótico, podendo representar mais de 80% do seu tamanho e sendo
22 caracterizadas por uma alta variabilidade (Charlesworth et al. 1994, Gregory 2005, Plohl et al.
23 2008). As seqüências repetitivas de DNA são representadas pelos DNAs satélites (satDNAs),

1 minissatélites, microssatélites e elementos transponíveis, assim como pelas famílias
2 multigênicas compostas de centenas de milhares de cópias, como a das histonas e dos genes de
3 RNA ribossomais (Kedes, 1979, Flavel, 1986 , Prokopowich et al. 2003, Nagoda et al. 2005).
4 Os DNAs satélites representam um exemplo típico de arranjo conjugado de seqüências
5 repetitivas, organizadas em tandem, enquanto que os elementos transponíveis (TE) representam
6 seqüências dispersas no genoma embora, às vezes, possam também estar organizados em
7 blocos nos cromossomos (Long & Dawid 1980, Charlesworth et al. 1994, Sumner, 2003). Por
8 muito tempo as seqüências repetitivas foram classificadas como não-codificantes, embora
9 atualmente seja conhecido que tanto os elementos transponíveis como os DNAs satélites
10 podem ser transcritos.

11 As seqüências repetidas *in tandem* podem ser classificadas em subgrupos de acordo com
12 o tamanho de suas unidades de repetição. As seqüências de DNAs satélites podem variar de
13 1.000 até 10.000 cópias de unidades repetidas, cada uma delas comumente apresentando 100-
14 300 pares de bases. Um segundo grupo das seqüências organizadas em cadeia compreende os
15 minissatélites, que são repetições de aproximadamente 10 a 60 pb (DNA moderadamente
16 repetido), encontradas dispersas no genoma e agrupados nos telômeros. O último grupo dos
17 elementos repetidos *in tandem* é composto pelos microssatélites, que são repetições mais curtas
18 (1 a 5 pb), altamente polimórficas pois apresentam variações tanto no número como no tipo de
19 repetições, podendo ser mono, di, trinucleotídicos, e assim sucessivamente.

20 A maioria das seqüências de DNA repetitivo dispersas é formada por elementos
21 transponíveis (TEs), que têm a capacidade de mover de um local para outro dentro do genoma.
22 Eles incluem os retroelementos que se movem por um mecanismo de "copiar e colar" através
23 de um intermediário RNA e os transposons que se movem diretamente por um mecanismo de

1 “cortar e colar”. Esta é, contudo, uma classificação superficial uma vez que a dinâmica dos TEs
2 é de fato muito complexa. Diversos sistemas de classificação têm sido propostos, incluindo a
3 classificação apenas com base no mecanismo de transposição (Curcio & Derbyshire 2003).
4 Mais recentemente, Wicker et al. (2007) sugeriram uma novo sistema de classificação universal
5 para os TEs. De acordo com esta nomenclatura, tanto os transposons quanto os retroelementos
6 são classificados em várias ordens e superfamílias.

7 O genoma de quase todos os eucariontes contém pelo menos um, mas geralmente todos os
8 tipos de DNAs repetitivos. Essas repetições são realmente componentes naturais dos genomas e
9 cada espécie tem uma biblioteca específica de famílias de elementos repetitivos. De fato, a
10 grande variação encontrada no tamanho do genoma entre os eucariotos é atribuída,
11 principalmente, ao acúmulo de seqüências repetidas (Petrov 2001, Kidwell, 2002). Entretanto,
12 os DNAs repetitivos podem variar entre as espécies sem nenhuma relação óbvia com a
13 complexidade do organismo (Gregory, 2005). O estudo das frações repetitivas pode contribuir
14 para o conhecimento da organização do DNA no núcleo celular, além de serem ótimos
15 marcadores cromossômicos em estudos evolutivos, identificação de um tipo particular de
16 cromossomo, de rearranjos cromossômicos e de cromossomos sexuais.

17 Embora DNAs repetitivos tenham sido muito estudados em invertebrados e mamíferos,
18 em peixes as informações disponíveis são ainda restritas, considerando o grande número de
19 espécies existentes. Entretanto, o advento da hibridização “in situ” fluorescente (FISH),
20 permitindo que seqüências específicas de DNA possam ser localizadas em cromossomos
21 metafásicos ou em núcleos interfásicos, tem propiciado o mapeamento físico de algumas dessas
22 seqüências também entre os peixes, trazendo importantes informações para a caracterização da
23 diversidade e evolução da nossa ictiofauna.

1 As seqüências de DNAs satélites, por exemplo, estão organizadas em grandes clusters
2 localizados majoritariamente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, sendo
3 o principal componente das heterocromatinas. Os centrômeros, que representam a constrição
4 primária de cada cromossomo metafásico dos eucariotos, são fundamentais para a segregação
5 correta dos cromossomos durante a divisão celular. Por sua vez, os telômeros desempenham
6 um papel crítico na manutenção da estabilidade cromossômica, além de estarem envolvidos no
7 processo de replicação do cromossomo. Assim, as seqüências de DNAs repetitivos localizadas
8 nessas estruturas podem desempenhar um papel importante no genoma dos eucariotos. De fato,
9 a organização molecular, localização cromossômica e possíveis funções dos DNAs satélites
10 vêm sendo estudadas em diversos grupos de animais (Clabby et al. 1996; Badaeva et al. 2007),
11 indicando que tais seqüências desempenham um importante papel tanto em nível nuclear como
12 cromossômico (Grewal & Jia, 2007).

13 A distribuição cromossômica da heterocromatina tem sido extensivamente estudada em
14 peixes por métodos citológicos, como o bandeamento C. Entretanto, dados moleculares sobre
15 os DNAs satélites presentes na heterocromatina são restritos à poucas espécies. As primeiras
16 descrições de famílias de DNAs satélites em peixes datam do final dos anos 80 (Datta et al.
17 1988; Moyer et al. 1988). A partir daí, alguns estudos vêm se sucedendo, com importantes
18 contribuições sobre a origem e evolução dessas seqüências repetitivas no genoma dos peixes.
19 Wright (1989), identificou e caracterizou um fragmento *HaeIII*, de 237 pares de bases, no
20 genoma da tilápia *Oreochromis mossambicus*, que se apresentou organizado em tandem. A
21 análise desta seqüência revelou um alto grau de conservação na unidade monomérica e
22 apresentou uma pequena região de 9pb AT rico, regularmente espaçada que, segundo o autor,
23 poderia representar o progenitor da seqüência amplificada. Em outro estudo, Crollius et al.

1 (2000), descreveram a ocorrência de duas famílias de DNA satélites (uma centromérica e outra
2 subtelomérica) no genoma de *Tetraodon nigroviridis*. A família satélite centromérica mostrou-
3 se organizada uniformemente em todos os centrômeros do complemento cariotípico, enquanto
4 que o DNA satélite subtelomérico foi localizado no braço curto da maioria dos cromossomos
5 da espécie, sendo que a organização bastante uniforme destas seqüências repetitivas poderia
6 indicar um mecanismo de evolução em concerto.

7 Mestriner et al. (2000), identificaram um DNA satélite 59% rico em AT no genoma de *A.*
8 *scabripinnis*, com unidades monoméricas de 51pb, denominado As51. Análises por FISH
9 mostraram que este DNA está localizado principalmente nas heterocromatinas distais, em
10 alguns sítios de RONS e no cromossomo B da população analisada. Os resultados obtidos
11 evidenciaram que o macrocromossomo B dessa espécie é um isocromossomo, de origem
12 intraespecífica, que passou por ampliações do DNA satélite As51 em ambos os braços
13 cromossômicos. Em *Prochilodus lineatus*, a localização cromossômica de duas famílias de
14 DNAs repetitivos (SATH1 e SATH2) evidenciou que os pequenos cromossomos B, presentes
15 nesta espécie, mostram estreita correlação com a família SATH1, também encontrada na região
16 pericentromérica de vários cromossomos do cariótipo, suportando uma origem intraespecífica
17 dos Bs (Jesus et al. 2003; Artoni et al. 2006).

18 Uma vez que os cromossomos sexuais presentes nos peixes são ricos em seqüências de
19 DNA repetitivos (Martins, 2007), a investigação da organização cromossômica dessas
20 seqüências pode propiciar evidências sobre a origem e evolução desses cromossomos. A grande
21 maioria das espécies de peixes analisadas não evidencia cromossomos sexuais
22 morfologicamente diferenciados. Entretanto, entre as espécies portadoras de cromossomos
23 sexuais heteromórficos, aproximadamente 64% apresentam heterogametia feminina e 36%

1 heterogametia masculina. Oitenta por cento destes casos correspondem a sistemas de
2 cromossomos sexuais simples e os 20% restantes a sistemas de cromossomos sexuais múltiplos
3 (Centofante et al. 2002). Diferentemente das aves e dos mamíferos, que apresentam
4 cromossomos sexuais na base de sua filogenia, os peixes evidenciam um surgimento
5 independente de sistemas de cromossomos sexuais ao longo do processo evolutivo, onde
6 processos de heterocromatinização, translocações X-autossomo, Y-autossomo e fissões
7 cêntricas desempenharam um papel preponderante (Moreira-Filho et al. 1993; Bertollo et al.
8 1997b; Bertollo & Mestriner, 1998; Almeida-Toledo et al. 2000; Almeida-Toledo et al. 2001).

9 Sequências repetitivas sexo-específicas já foram isoladas e mapeadas nos cromossomos
10 de diversas espécies de peixes, a exemplo de *Leporinus elongatus* (Nakayama et al. 1994;
11 Parise-Maltempo et al. 2007), *Chiondraco hamatus* (Capriglione et al. 1994), *Poecilia*
12 *reticulata* (Nanda et al. 1990), *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin et al. 1991; Stein et al.
13 2001), *Salvelinus namaycush* (Stein et al. 2002), *Oreochromis niloticus* (Harvey et al. 2002;
14 Ezaz et al. 2004), *Parodon hilarii* (Vicente et al. 2003), entre outros. Nos Poecilidae, embora os
15 cromossomos sexuais não sejam diferenciados por coloração convencional, eles podem ser
16 facilmente caracterizados por um grande bloco heterocromático na região telomérica dos
17 cromossomos Y ou W de algumas espécies, rico em DNA repetitivo, o qual se mostra reduzido
18 nos cromossomos X ou Z, respectivamente, sugerindo que o surgimento e o desenvolvimento
19 dessas seqüências tenham sido os primeiros passos na diferenciação citológica desses
20 cromossomos (Nanda et al. 1990). Em *L. elongatus* duas famílias de DNAs satélites sexo-
21 específicas foram isoladas do genoma, cujas seqüências não mostraram clara homologia com
22 nenhuma outra seqüência conhecida (Nakayama et al. 1994). Uma dessas famílias foi
23 localizada, por FISH, em ambos os cromossomos (Z e W), enquanto que a outra parece

1 específica do cromossomo W. Por outro lado, algumas seqüências repetitivas são
2 compartilhadas tanto pelos cromossomos sexuais como pelos autossomos. Assim, Vicente et al.
3 (2003), isolaram e identificaram uma família de DNA satélite, denominado pPh2004, utilizando
4 o método de restrição enzimática do DNA genômico de *Parodon hilarii*. Este DNA foi
5 identificado como uma seqüência monomérica de 200pb e 60% rico em pares de bases AT. A
6 hibridização *in situ* fluorescente evidenciou 14 sítios deste DNA satélite em autossomos, além
7 de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z e um sítio na região terminal
8 do braço curto do cromossomo W. Este padrão de distribuição, juntamente com dados de
9 bandeamentos C e G, permitiu inferir sobre a origem e diferenciação do cromossomo W a partir
10 de um cromossomo ancestral similar ao cromossomo Z dessa espécie e também da espécie *P.*
11 *moreirai*.

12 Em *Hoplias malabaricus*, uma família de DNA repetitivo em tandem, com similaridade a
13 repetições de DNAr 5S, foi isolada a partir do DNA genômico e denominada 5SHindIII-DNA.
14 A clonagem e o seqüenciamento desta família identificaram fragmentos de DNA de 350-360
15 pares de bases, com a presença de inserções, deleções e substituição de bases entre os clones
16 (Martins et al. 2006). A principal diferença entre as unidades de repetição do DNAr 5S e da
17 família 5SHindIII-DNA está na presença da seqüência expandida de um microsátélite TAAA
18 no ITS (espaçador não-transcrito) e duas pequenas deleções internas na região transcricional do
19 RNAr 5S desta família de DNA repetitivo. A transferência de unidades repetitivas do DNAr 5S
20 “verdadeiro” para a posição centromérica pode ter modificado a pressão seletiva sobre esses
21 genes, possibilitando sua multiplicação e dispersão ao longo dos centrômeros de vários pares
22 cromossômicos, como tem sido demonstrado para outras seqüências satélites centroméricas. A
23 primeira cópia de 5SHindIII-DNA pode ter se associado com outra seqüência repetitiva,

1 localizada na heterocromatina centromérica, facilitando a sua dispersão para os outros
2 cromossomos devido à mecanismos de evolução em concerto (Martins et al. 2006). Por sua
3 vez, é igualmente provável que esta família de DNA tenha sido favorecida durante o processo
4 evolutivo, devido a um possível papel no que se refere à estrutura ou à função dos centrômeros.

5 Uma análise comparativa entre os cariomorfos de *H. malabaricus*, *H. lacerdae*, *H.*
6 *unitaeniatus* e *E. erythrinus* mostrou que esta família de DNA satélite é exclusiva de *H.*
7 *malabaricus*, não sendo evidenciada em nenhum dos cromossomos das demais espécies de
8 Erythrinidae, mesmo na espécie congênica, *H. lacerdae* (Ferreira et al. 2007). Entretanto,
9 diferenças quanto ao número e à posição de sítios de 5S*Hind*III-DNA foram detectadas entre os
10 cariomorfos A, D e F de *H. malabaricus*, evidenciando que esse DNA satélite deve ter surgido
11 durante a divergência de *H. malabaricus* dos demais grupos de Erythrinidae e antes da
12 diversificação dos cariomorfos de *H. malabaricus* e, desde então, acompanhado a diferenciação
13 destas formas cariotípicas. Dessa forma, o satélite 5S*Hind*III-DNA mostra-se extremamente
14 promissor como marcador citogenético nos estudos cromossômicos do grupo *H. malabaricus*.

15 Outra classe importante de DNA repetitivo, amplamente estudada no genoma de muitos
16 organismos, é a dos elementos transponíveis (TEs). Em geral, o seu padrão de distribuição na
17 heterocromatina e eucromatina é extremamente variável entre os diferentes genomas. No
18 entanto, parece que os TEs tendem a se acumular preferencialmente nas regiões centroméricas
19 e nas regiões heterocromáticas dos cromossomos. Tais padrões podem ser correlacionados com
20 um papel de seqüências repetidas na estrutura e organização dos centrômeros e das regiões
21 heterocromáticas (Kidwell, 2002).

22 A localização cromossômica de diversos tipos de TEs no genoma do baiacu *Tetraodon*
23 *nigroviridis* mostrou que essas seqüências são geralmente ausentes em regiões ricas em genes

1 (Da Silva et al. 2002). No ciclídeo *Cichla kelberi*, alguns retroelementos (*Rex1*, *Rex3*, *Rex6*)
2 foram predominantemente mapeados na região centromérica em coincidência com as áreas
3 heterocromáticas e também dispersos ao longo da maioria dos cromossomos (Teixeira et al.
4 2009). A presença dos elementos *Rex1* e *Rex3* nas áreas centroméricas e heterocromáticas
5 também foi observado em *Notothenia coriiceps* (Ozouf-Costaz et al. 2004). Dados de
6 mapeamento cromossômico de seqüências *Tc1* são escassos em vertebrados, mas no ciclídeo *C.*
7 *kelberi* este elemento transponível é observado em regiões centroméricas e disperso ao longo
8 dos braços cromossômicos da maioria dos cromossomos (Teixeira et al. 2009). Outro exemplo
9 notável foi observado em *T. nigroviridis*, onde os elementos *Tc1* foram mapeados nos braços
10 curtos heterocromáticos de seis pares cromossômicos (Da Silva et al. 2002).

11 Em dois estudos recentes, os elementos transponíveis *Rex1* e *Rex3* foram isolados e
12 mapeados nos cromossomos de espécies de ciclídeos Africanos e Sul-Americanos (Valente et
13 al. 2011) e de 3 espécies da subfamília Hypoptopomatinae (Ferreira et al. 2011). Os resultados
14 mostraram que eles se encontram compartimentalizados nas regiões heterocromáticas e
15 pericentroméricas, embora sinais dispersos em regiões eucromáticas foram também
16 observados. A presença de TEs em regiões heterocromáticas pode ser correlacionada com o seu
17 papel na estrutura e organização destas regiões (como centrômeros), ou com a menor pressão
18 seletiva que atuam nas regiões ricas em heterocromatina e pobre em conteúdo gênico.

19 Os centrômeros de um grande número de espécies também apresentaram seqüências de
20 TEs intercaladas com seqüências de DNAs satélite (Hua-Van et al. 2005). Fisher et al. (2004),
21 mostraram a co-localização dos elementos transponíveis com minissatélites no genoma do
22 baiacu *T. nigroviridis*. A amplificação dos DNAs satélites, assim como o acúmulo de

1 retroelementos na região centromérica dos cromossomos, indicam um papel importante destas
2 seqüências para a expansão e estabilização desta região cromossômica (Plohl et al. 2008).

3 Apesar da distribuição preferencial de TEs nas regiões não-codificantes, eles têm uma
4 distribuição diferente entre e dentro dos cromossomos, sendo mais freqüentemente associados
5 com os cromossomos sexuais do que com os autossomos, provavelmente devido a maior
6 concentração de heterocromatina nestes cromossomos (Kidwell, 2002). De fato, estas
7 seqüências têm papel importante na diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais. No
8 geral, os dados disponíveis até o presente momento indicam que os elementos transponíveis são
9 importantes componentes estruturais das regiões heterocromáticas e têm desempenhado um
10 papel importante na história evolutiva dos genomas dos peixes.

11 Nos eucariotos superiores, os genes do RNA ribossômico (RNAr) encontram-se
12 organizados como duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S e DNAr
13 5S, as quais são compostas por unidades repetitivas, com centenas a milhares de cópias. O
14 DNA ribossômico 45S compreende os genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5,8S
15 e 28S, os quais se encontram separados por espaçadores internos transcritos (ITS1 E ITS2) e
16 flanqueados pelos espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2) e não transcritos (NTS)
17 (Long & David, 1980). Múltiplas cópias destas unidades correspondem às Regiões
18 Organizadoras de Nucléolos (RONs). Entre os peixes, estas regiões têm mostrado uma grande
19 variabilidade, não somente em relação ao número, posição e tamanho dos cístrons
20 ribossômicos, mas também em relação à atividade diferencial dos mesmos, estando sujeitas a
21 extensos polimorfismos (Foresti et al. 1981; Almeida-Toledo, 1998; Galetti Jr, 1998; Vicari et
22 al. 2006; Capistano et al. 2008).

1 Pendás et al. (1994), analisaram comparativamente a região organizadora de nucléolos do
2 salmão do Atlântico pela coloração com o nitrato de Prata e pelo FISH/DNAr 18S,
3 evidenciando a correspondência entre as Ag-RONs e os sítios de DNAr 18S, como também
4 uma dispersão do DNAr na heterocromatina presente no par cromossômico nucleolar. A
5 correspondência entre as Ag-RONs e os cístrons DNAr foi também evidenciada em outras
6 espécies de peixes, tais como *Salvelinus malma* (Alonso et al. 1999), *Anguilla anguilla* (Viñas
7 et al. 2004), entre muitos outros estudos incluindo diversas espécies Neotropicais. As
8 seqüências de DNAr 5S também tem sido investigadas em várias espécies de peixes teleósteos,
9 mostrando-se um bom marcador cromossômico para o entendimento da dinâmica evolutiva das
10 famílias repetitivas multigênicas no genoma (Martins & Wasko, 2004). Para a maioria das
11 espécies de peixes, os genes de RNAr 5S tem uma posição intersticial nos cromossomos, o que
12 pode sugerir alguma vantagem quanto à esta distribuição no genoma. A maior conservação dos
13 sítios de DNAr 5S na região intersticial dos cromossomos, comparada com a maior variação
14 observada nos sítios de DNAr 45S, pode estar associada com a localização mais comum destes
15 últimos sítios nas regiões teloméricas dos cromossomos, facilitando a sua dispersão (Martins &
16 Galetti, 1999). De acordo com Schweizer & Loidl (1987), regiões teloméricas são mais
17 propícias à transferência de material genético devido às suas proximidades dentro do núcleo
18 interfásico.

19 Sabe-se que os loci de DNAr 45S e 5S podem assumir uma organização sintênica no
20 cromossomo ou podem estar localizados em pares cromossômicos distintos. Entretanto, a
21 localização não-sintênica dos loci das RONS e do DNAr 5S aparenta ser a situação mais
22 comumente observada nos peixes (Lucchini et al. 1993), assim como o padrão de distribuição
23 mais freqüente observado entre os vertebrados (Suzuki et al. 1996). Em eucariotos, os genes de

1 RNAr 45S são transcritos pela enzima nucleolar RNA polimerase I, enquanto os genes RNAr
2 5S são transcritos fora do nucléolo pela enzima RNA polimerase III. É sugerido que tal
3 divergência funcional requer uma localização física diferente dos *clusters* de DNAr 45S e 5S.
4 Outro fato, também relevante, é que a localização sintênica dos clusters 45S e 5S poderia
5 facilitar a ocorrência de translocações entre essas seqüências gênicas, causando interferências
6 nas estruturas bem como nas funções desses genes (Martins & Galetti, 1999).

7 Seqüências teloméricas tem sido uma ferramenta importante na análise de processos
8 evolutivos. Essas seqüências, originalmente isoladas de bibliotecas de DNAs repetitivos
9 humano, consistem de repetições curtas, ricas em Guanina – (TTAGGG)_n – e amplamente
10 distribuídas e conservadas no genoma de vertebrados. Os complexos formados pelas seqüências
11 (TTAGGG)_n com proteínas específicas constituem estruturas altamente especializadas nas
12 extremidades dos cromossomos dos eucariotos – os telômeros – os quais desempenham uma
13 série de funções vitais, tais como conferir estabilidade aos cromossomos e permitir a replicação
14 completa das suas extremidades (Blackburn, 1994). Desta maneira, seqüências (TTAGGG)_n
15 estão presentes nos telômeros dos cromossomos de todos os vertebrados e o seu estudo permite
16 fazer inferências a respeito dos rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica
17 de vários grupos de organismos. O aparecimento de sítios cromossômicos intersticiais da
18 seqüência (TTAGGG)_n tem sido resolutivo na análise da evolução cariotípica envolvendo
19 fusões teloméricas a partir de uma condição ancestral. De fato, há evidências de sítios
20 teloméricos intersticiais (ITS) remanescentes de verdadeiros telômeros, resultantes de
21 rearranjos cromossômicos tais como inversões, fusões cêntricas e em tandem ocorridas durante
22 a evolução cariotípica em várias espécies. No entanto, muitos casos de fusões cromossômicas
23 em tandem ou de fusões cêntricas podem não mostrar os sítios intersticiais esperados,

1 provavelmente pela perda ou redução drástica do DNA telomérico durante esses rearranjos
2 (Schubert et al. 1992).

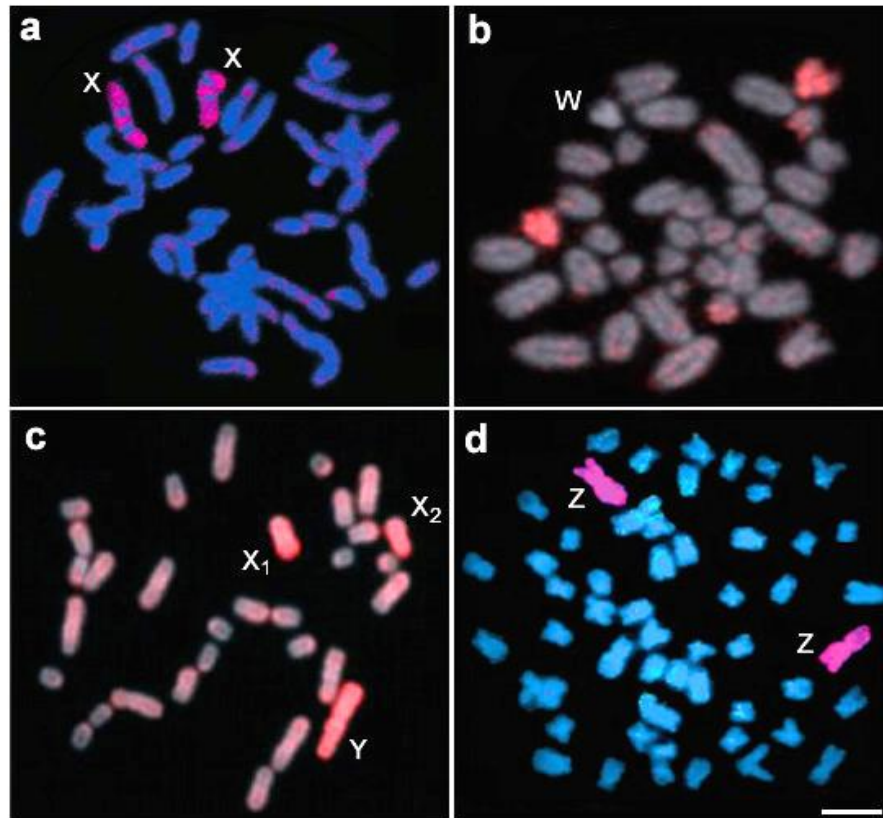
3 Entre os peixes, a localização de seqüências (TTAGGG)_n vem sendo também utilizada na
4 busca de indícios de rearranjos cromossômicos associados aos processos evolutivos. Embora
5 em muitos casos a localização cromossômica dessas seqüências mostre apenas a sua
6 distribuição primária nos telômeros (Meyne et al. 1990; Rossi & Gornung, 2005), sítios não
7 teloméricos têm sido também observados em alguns casos (Reed & Phillips, 1995; Chew et al.
8 2002; Ocalewicz et al. 2004; Cioffi & Bertollo, 2010). Em algumas espécies de trutas e salmões
9 (*Salmo trutta*, *S. salar*, *Onchorhynchus kisutch* e *O. mykiss*), seqüências teloméricas foram
10 localizadas em regiões correspondentes às RONS (Abuín et al. 1996), sugerindo a dispersão
11 desses elementos ao longo da região organizadora de nucléolo. A presença de sítios teloméricos
12 intersticiais em um par cromossômico de *S. salar*, bem como da tilápia do Nilo, *Oreochromis*
13 *niloticus* (Chew et al. 2002), foi considerada indicativa de eventos de fusão cromossômica
14 ocorridos durante a evolução cariotípica dessas espécies.

15 A investigação de DNAs repetitivos nos genomas dos peixes, embora relativamente
16 recente, é uma ferramenta promissora para a análise da organização e evolução genômica desse
17 grupo. Assim, o emprego de DNAs repetitivos, associado a outros procedimentos de análise
18 cromossômica, vêm fornecendo importantes contribuições para o conhecimento do componente
19 heterocromático do genoma bem como da evolução cariotípica geral de diversas espécies de
20 peixes, mostrando-se particularmente eficaz no que se refere à origem, diferenciação e
21 organização de algumas classes de cromossomos, entre as quais se destacam os cromossomos
22 sexuais e os cromossomos B.

1 1.5 Pintura cromossômica e o estudo dos cromossomos sexuais em vertebrados

2 A citogenética molecular tem proporcionado avanços significativos nos estudos da
3 evolução cromossômica, onde a pintura cromossômica se destaca como poderosa auxiliar para
4 o alcance deste objetivo. Esta tecnologia permite a uso de cromossomos totais (wcp- *whole*
5 *chromosome painting*) ou de parte dos cromossomos (pcp – *partial chromosome painting*), que
6 podem ser obtidos por métodos de microdissecção cromossômica ou por citometria de fluxo. O
7 aprimoramento da técnica de hibridização “*in situ*” fluorescente (FISH) e das reações de DOP-
8 PCR (Telenius et al. 1992), permitiram o uso das sondas cromossômicas obtidas em
9 experimentos de FISH. É importante destacar que a pintura cromossômica vem sendo
10 crescentemente utilizada para se ampliar os conhecimentos sobre a evolução cariotípica e dos
11 cromossomos sexuais em diversos grupos biológicos (Grützner et al. 2004; Rens et al. 2004;
12 Ráb et al. 2008; Ventura et al. 2009; Nagamachi et al. 2010; Beklemisheva et al. 2011; Pokorná
13 et al. 2011, entre outros). De fato, trabalhos científicos em diferentes organismos, como
14 plantas, insetos e animais, vem empregando a pintura cromossômica para estas finalidades,
15 especialmente enfocando na evolução dos cromossomos sexuais (**Figura 6**).

16 No ornitorrinco, *Ornithorhynchus anatinus*, o emprego da pintura cromossômica a partir
17 do isolamento de cromossomos individuais revelou a presença de um sistema sexual atípico
18 ($X_1X_2X_3X_4X_5/Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5$) presente nesta espécie, formando uma cadeia cromossômica na
19 meiose masculina (Rens et al. 2004). Esta cadeia de cromossomos sexuais teria evoluído a
20 partir de um par de cromossomos sexuais homólogos ao par ZW presente nas aves e, durante o
21 início da evolução dos mamíferos, quatro pares autossômicos foram translocados para este
22 sistema, dando origem ao sistema sexual múltiplo presente nessa espécie (Grützner et al. 2004,
23 Graves, 2008).



1 **Figura 6:** Experimentos de pintura cromossômica em diferentes espécies de vertebrados. (a)
2 Sonda derivada do cromossomo X de *Microtus cabrerai* hibridizada com os cromossomos de
3 *Arvicola sapidus*; (b) Sonda derivada do cromossomo Z de *Gallus gallus* hibridizadas com os
4 cromossomos do lagarto *Eremias velox*; (c) Sonda derivada do cromossomo Y de *Coleonyx*
5 *elegans* hibridizada com os cromossomos da mesma espécie; (d) Sonda derivada do
6 cromossomo Z de *Triportheus nematurus* hibridizada com os cromossomos da mesma espécie.
7 As imagens são cortesia de (a) Antonio Sanchez (Universidad de Jaén, Espanha) e (b e c) de
8 Martina Pokorná (University of Prague, República Tcheca).

9 Nas aves, uma sonda do cromossomo Z de *Gallus gallus domesticus* pintou ambos os
10 cromossomos Z e W do emu, *Dromaius novaehollandiae*, mostrando uma conservação dos
11 cromossomos Z entre estas duas espécies, bem como a conservação entre as seqüências
12 presentes nos cromossomos Z e W nas aves (Shetty et al. 1999). Esta mesma sonda foi
13 hibridizada em 28 espécies de 17 famílias das principais linhagens de Squamata, crocodilos e
14 tartarugas. Em quase todas as espécies o cromossomo Z se mostrou conservado apesar do

1 grande tempo de divergência entre as linhagens de Sauropsida (répteis, aves e seus
2 antepassados fósseis, incluindo os dinossauros). Além disso, a sonda hibridizou com
3 autossomos em 7 espécies que possuem um sistema ZW. O cromossomo Z mostra-se portanto
4 conservado nesse grupo, ainda que não corresponda ao cromossomo sexual em algumas
5 espécies de Squamata (Pokorná et al. 2011). Adicionalmente, o cromossomo Y do lagarto
6 mexicano *Coleonyx elegans* foi isolado por citometria de fluxo e também utilizado em
7 experimentos de pintura cromossômica. A sonda derivada deste cromossomo hibridizou não
8 somente com o cromossomo Y metacêntrico, mas também com dois cromossomos
9 acrocêntricos, possibilitando concluir que essa espécie de lagarto possui um sistema múltiplo
10 de cromossomos sexuais X_1X_2Y , que evoluiu de forma independente na linhagem dos
11 Squamata (Pokorná et al. 2010).

12 Cromossomos sexuais em espécies de roedores do gênero *Microtus* apresentam algumas
13 características que os tornam um grupo muito interessante para estudar a composição e
14 evolução dos cromossomos sexuais. Duas espécies (*M. cabreræ* e *M. agrestis*) apresentam
15 cromossomos sexuais muito grande (conhecido como "cromossomos sexuais gigantes"),
16 devido à presença de grandes blocos heterocromáticos. Por microdissecção cromossômica,
17 sondas foram geradas a partir do cromossomo X de ambas as espécies e hibridizadas em
18 cromossomos de várias espécies do gênero *Microtus*. Os resultados demonstraram que as
19 regiões eucromáticas dos cromossomos X são altamente conservadas em *Microtus*, como
20 ocorre em outros grupos de mamíferos. Além disso, a presença de sinais em autossomos de
21 diversas espécies sugere que durante a evolução cariotípica desse gênero ocorreram alguns
22 rearranjos entre cromossomos sexuais e autossomos (Marchal et al. 2004).

1 Entretanto, existam poucos trabalhos envolvendo experimentos de pintura cromossômica
2 em peixes. No peixe *Triportheus nematurus*, com um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW,
3 uma sonda específica para o cromossomo Z foi obtida por microdissecção cromossômica,
4 seguido por uma amplificação inespecífica via DOP-PCR (Diniz et al. 2008). Esta sonda foi
5 utilizada em experimentos de FISH em outras espécies do gênero, bem como em espécies de
6 outros gêneros de Characidae relacionados a *Triportheus*, com o intuito de investigar a
7 diferenciação do sistema de cromossomos sexuais. Foi observada uma completa homologia
8 entre os cromossomos Z de todas as espécies de *Triportheus*, enquanto que sinais de hibridação
9 não foram evidenciados nas espécies dos demais gêneros, reforçando a natureza conservada do
10 cromossomo Z, bem como a condição sinapomórfica do sistema ZZ/ZW para o gênero
11 *Triportheus*.

12 Diferentemente das aves e dos mamíferos, que apresentam cromossomos sexuais na base
13 de sua filogenia, os peixes evidenciam um surgimento independente de sistemas de
14 cromossomos sexuais ao longo do processo evolutivo, como observado em Salmonídeos.
15 Phillips et al. (2001), isolaram duas sondas específicas dos braços curtos (Yp) e dos braços
16 longos (Yq) do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush*, obtidas por microdissecção. Estas
17 sondas foram hibridadas nos cromossomos de *Oncorhynchus mykiss* e *O. tshawytscha* e os
18 sinais de hibridação foram detectados em dois pares distintos de autossomos em cada espécie,
19 mostrando a ausência de homologia entre os cromossomos sexuais de *Salvelinus* e
20 *Oncorhynchus*. Em espécies do gênero *Eigenmannia*, foi testada a homologia de dois sistemas
21 XX/XY heteromórficos, presentes em duas populações simpátricas de *E. virescens* e
22 *Eigenmannia* sp. 2, utilizando experimentos de hibridação cruzada com sondas derivadas por
23 microdissecção dos cromossomos X e Y (Henning et al. 2008). Enquanto que as sondas X e Y

1 hibridizaram nos cromossomos sexuais espécie-específicos, nos testes cruzados de FISH ambas
2 as sondas hibridizaram exclusivamente em autossomos, sugerindo origens independentes dos
3 sistemas XY nas populações analisadas.

4 Acredita-se que a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticuss*, apresente um sistema XY de
5 cromossomos sexuais (o maior par de cromossomos), proposto pela análise do complexo
6 sinaptonêmico (Carrasco et al. 1999). Harvey et al. (2002), produziram sondas dos
7 cromossomos X e Y da tilápia do Nilo e mostraram que estas sondas são, de fato, específicas
8 para o maior par de cromossomos, existindo diferenças em relação às seqüências presentes nos
9 dois cromossomos desse par do cariótipo.

10 Assim sendo, o emprego da pintura cromossômica vem fornecendo importantes
11 contribuições para o conhecimento do genoma de diversos grupos de peixes, particularmente
12 no que se refere à origem, diferenciação e organização dos cromossomos sexuais. Justificam-
13 se, assim, os esforços para que essa metodologia possa ser mais amplamente utilizada, com a
14 perspectiva de significativos avanços no tocante à diferenciação e evolução dos sistemas de
15 cromossomos sexuais nas espécies de nossa ictiofauna.

Justificativa e Objetivos

1 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2 Conforme anteriormente evidenciado, os peixes da família Erythrinidae se caracterizam
3 por uma evolução cariotípica divergente, onde se destacam grupos de espécies com uma
4 macroestrutura cariotípica conservada, ao lado de outros com uma diversidade acentuada
5 quanto ao número e morfologia cromossômica. Distintos cariomorfos, já bem caracterizados,
6 evidenciam a priori a ocorrência de prováveis grupos de espécies, hoje englobadas em uma
7 mesma entidade taxonômica. Paralelamente, dentro de um mesmo gênero, como em *Hoplías* e
8 *Erythrinus*, ocorrem representantes portadores de distintos sistemas de cromossomos sexuais
9 heteromórficos, ao lado de representantes apresentando cariótipos homomórficos entre os
10 sexos. Assim sendo, esse grupo de peixes de nossa ictiofauna oferece uma oportunidade
11 excelente para a análise dos eventos evolutivos, quer seja no tocante à diferenciação do
12 cariótipo como um todo, assim como no tocante à diferenciação e evolução de sistemas de
13 cromossomos sexuais, aspecto este que vem despertando interesse crescente na biologia
14 evolutiva nos últimos anos.

15 Estudos recentes de genômica comparativa têm fornecido novas evidências quanto à
16 determinação do sexo nos vertebrados. Assim, por exemplo, os cromossomos sexuais XY e ZW
17 dos mamíferos e aves, respectivamente, evoluíram a partir de pares autossômicos após a
18 aquisição de novos alelos sexo-determinantes. Contudo, em outros vertebrados ocorre uma
19 variedade de eventos de determinação do sexo, como heterogametia XY e ZW independentes e
20 fatores ambientais, parecendo haver transições entre esses sistemas mais frequentes do que
21 previamente suposto (Graves, 2008). A diversidade dos mecanismos determinantes do sexo
22 entre os peixes, e a ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na
23 maioria das espécies, fazem deste grupo um modelo particular para estudos evolutivos,

1 permitindo a possível caracterização de passos iniciais na diferenciação dos cromossomos
2 sexuais. Em geral, esta análise não é possível nos vertebrados superiores, considerando a sua
3 relativa estabilidade nos sistemas sexo-determinantes (Dettai et al. 2007). Dentro deste
4 contexto, os peixes Erythrinidae novamente caracterizam um excelente modelo a ser explorado,
5 considerando os recentes avanços metodológicos da citogenética molecular que permitem uma
6 exploração mais ampla e resolutiva dos eventos associados à evolução do cariótipo, com o
7 mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas de DNA e os procedimentos de
8 microdissecção e pintura cromossômica.

9 Assim sendo, foram consideradas as seguintes propostas para o presente estudo:

10 A) Análise da diferenciação genômica entre populações de *E. erythrinus*, com base na
11 distribuição de diferentes seqüências repetitivas de DNA. Para tanto, além das análises
12 cromossômicas clássicas, foi realizado o mapeamento citogenético de seqüências de DNAs
13 repetitivos em dois cariomorfos (A e D) de *E. erythrinus*, portadores e não portadores de
14 sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos, respectivamente.

15 B) Análise da evolução dos sistemas de cromossomos sexuais em *E. erythrinus* e em *H.*
16 *malabaricus* (representantes do Grupo 1: Figura 4), com base nas homeologias cromossômicas
17 apresentadas pelos respectivos cariomorfos desses dois grupos de espécies. Assim, procurou-se
18 obter sondas cromossômicas por microdissecção do cromossomo Y de *E. erythrinus* e posterior
19 hibridização fluorescente *in situ* (FISH) nos cariomorfos homomórficos dessa espécie, assim
20 como sondas do cromossomo X (cariomorfo B de *H. malabaricus*) e do cromossomo X₁
21 (cariomorfo D de *H. malabaricus*) e posterior hibridização fluorescente *in situ* nos cariomorfos
22 homomórficos dessa espécie (cariomorfos A e C).

1 C) Teste da hipótese da evolução independente entre os sistemas XX/XY encontrados nos
2 cariomorfos B e C de *H. malabaricus*, com base nos resultados obtidos pela hibridização *in situ*
3 cruzada entre esses cariomorfos, com a utilização de sondas de cromossomos totais obtidas por
4 microdissecção dos cromossomos X e X₁ presentes nos cariomorfos B e D respectivamente.

5 D) Teste da hipótese da evolução independente entre os sistemas X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y,
6 encontrados nos cariomorfos D de *H. malabaricus* e *E. erythrinus*, com base nos resultados
7 obtidos pela hibridização *in situ* cruzada entre esses cariomorfos, com a utilização de sondas de
8 cromossomos totais obtidas por microdissecção dos cromossomo X₁ (*H. malabaricus* -
9 cariomorfo D) e do cromossomo Y (*E. erythrinus* - cariomorfo D).

Material e Métodos

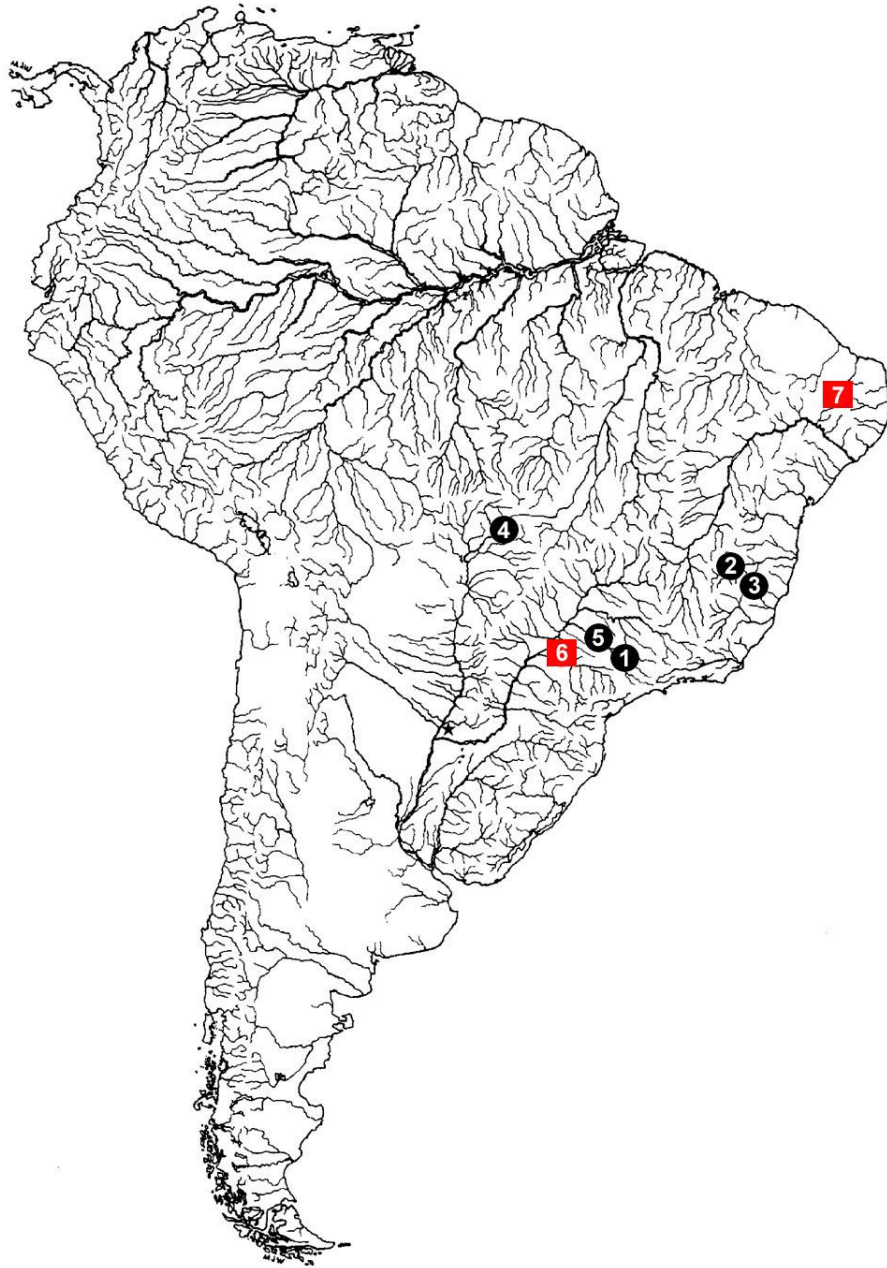
1 3. MATERIAL E MÉTODOS

2 3.1 Amostragens do material biológico

3 Foram analisados espécimes de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* (**Figura 1**)
4 pertencentes a diferentes cariomorfos destas espécies, conforme indicado na **Tabela 1**,
5 oriundos de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (**Figura 2**). Os espécimes analisados
6 foram depositados na Coleção Ictiológica do Departamento de Morfologia (UNESP, Campus
7 de Botucatu, SP), sob os números de registro LBP9014, LBP9015 e LBP9016.



8 **Figura 1.** Vista lateral de um espécime de *Hoplias malabaricus* (1) e de *Erythrinus erythrinus*
9 (2). Barra = 5 cm.



1 **Figura 2.** Mapa do Brasil evidenciando a procedência dos espécimes de *Hoplias malabaricus*
2 (círculos) e *Erythrinus erythrinus* (quadrados) utilizados no presente estudo. **1** = Descalvado,
3 SP (22° 05' 27'' S - 47°45' 55'' O), rio do Pântano – Cariomorfo A; **2 e 3** = Parque Florestal
4 do Rio Doce, MG (20° 15' 48'' S - 42° 54' 0'' O), lagoas da bacia do rio Doce - Cariomorfos A
5 e B, respectivamente; **4** = Poconé , MT (16° 40' 0'' S - 57° 12' 0'' O), rio Bento Gomes –
6 Cariomorfo C; **5** = São Carlos, SP (21° 58' 15'' S - 47° 53' 16'' O), ribeirão Monjolinho –
7 Cariomorfo D; **6**= Penápolis, SP (21°25'15''S - 50°04' 40''O), bacia do rio Tietê – Cariomorfo
8 A; **7** = Parnamirim, RN (5° 54' 56'' S - 35° 15' 46'' O), rio Pirangi – Cariomorfo D.

Tabela 1. Espécimes de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* por locais de coleta, com os respectivos cariomorfos e número de exemplares analisados.

Espécies	Localidade	N
<i>Hoplias malabaricus</i> (Cariomorfo A)	Descalvado (SP) – rio do Pântano	8♂ 6♀
<i>Hoplias malabaricus</i> (Cariomorfo A)	Parque Florestal do Rio Doce (MG) – lagoas: rio Doce	3♂ 2♀
<i>Hoplias malabaricus</i> (Cariomorfo B)	Parque Florestal do Rio Doce (MG) – lagoas: rio Doce	7♂ 8♀
<i>Hoplias malabaricus</i> (Cariomorfo C)	Poconé (MT) – lagoas: rio Bento Gomes	11♂ 9♀
<i>Hoplias malabaricus</i> (Cariomorfo D)	São Carlos (SP) – reservatório da UFSCar: ribeirão Monjolinho	10♂ 7♀
<i>Erythrinus erythrinus</i> (Cariomorfo A)	Penápolis (SP) – bacia do rio Tietê	12♂ 15♀
<i>Erythrinus erythrinus</i> (Cariomorfo D)	Parnamirim (RN) – rio Pirangi	10♂ 13♀

SP = São Paulo, MT = Mato Grosso, MG = Minas Gerais e RN= Rio Grande do Norte

1 3.2 Preparação de cromossomos mitóticos

2 Foi adotada a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978) para preparações
3 cromossômicas *in vivo*, com a injeção de uma solução aquosa de colchicina (0,025%) na região
4 abdominal do peixe, na proporção de 1ml/100g de peso. Posteriormente, o exemplar foi
5 mantido em aquário com aeração, durante 40-50 minutos, sendo posteriormente sacrificado,
6 procedendo-se a retirada do rim anterior. Este material foi lavado em solução hipotônica (KCl
7 0,075M) e transferido para pequenas cubas de vidro, contendo cerca de 10 ml desta mesma
8 solução, sendo então bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação. A fragmentação
9 do material foi completada com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, absorvendo e
10 eliminando várias vezes os fragmentos dos tecidos renais, facilitando assim a separação das

1 células e a obtenção de uma suspensão celular homogênea. A suspensão obtida foi incubada em
2 estufa a 36 - 37°C, durante vinte minutos. O material foi então revolvido cuidadosamente, com
3 auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferido para um tubo de centrífuga, adicionando-se
4 algumas gotas (5-6) de fixador, recém preparado (metanol + ácido acético glacial 3:1). Esta
5 mistura foi novamente revolvida várias vezes e centrifugada por 10 minutos a 500 – 800 rpm,
6 descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se ao sedimento celular 5-7ml de
7 fixador, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo. O material foi revolvido novamente com
8 auxílio da pipeta Pasteur, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última
9 centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de fixador ao sedimento
10 celular, misturando-os bem. A suspensão celular foi então guardada em freezer, acondicionada
11 em pequenos frascos.

12 **3.3 Preparação das lâminas**

13 Três a quatro gotas da suspensão celular foram adicionadas sobre diferentes regiões de
14 uma lâmina bem limpa, mantida em água destilada levemente aquecida (40-50°C), ou sobre
15 uma lâmina seca aquecida ao redor de 40°C, em chapa aquecedora. O excesso de material foi
16 eliminado, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel de filtro. As preparações foram
17 secadas diretamente ao ar e coradas com Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 a
18 6 minutos. O excesso de corante foi retirado pela lavagem da lâmina com água destilada e o
19 material secado ao ar.

20 **3.4 Preparação de cromossomos meióticos**

21 Cromossomos meióticos foram obtidos de acordo com Kligerman & Bloom (1977),
22 conforme descrito em Bertollo & Mestriner (1998). Os testículos foram seccionados em

1 pequenos fragmentos e submetidos a um tratamento hipotônico (KCl 0,075M), por 20-30
2 minutos, seguindo-se a fixação do material em metanol + ácido acético glacial (3:1), durante 30
3 minutos. Repetiu-se o procedimento de fixação pelo menos mais uma vez. Os fragmentos de
4 testículo foram então tratados com algumas gotas de solução de ácido acético glacial 50% e
5 fragmentados com pinças de dissecação até a obtenção de uma suspensão celular homogênea.
6 Gotas desta suspensão foram transferidas para uma lâmina de vidro pré-aquecida (30-40° C),
7 com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta fina. Após ser pingado, o material foi
8 imediatamente sugado com a pipeta, formando um anel celular com aproximadamente 1 cm de
9 diâmetro sobre a lâmina. As preparações foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato,
10 pH 6,8, durante 5 a 6 minutos, lavadas com água corrente e secadas ao ar.

11 **3.5 Análise da heterocromatina C-positiva (bandamento C)**

12 A detecção da heterocromatina C-positiva foi realizada segundo o protocolo descrito por
13 Sumner (1972), com algumas modificações. As preparações cromossômicas foram tratadas
14 com uma solução de HCl 0,2N, a temperatura ambiente, por 13 minutos, lavadas em água
15 destilada e secadas ao ar. Seguiram-se a incubação do material em uma solução de hidróxido de
16 Bário a 5%, a 42°C, por um período de cerca de 70 segundos e uma lavagem rápida em solução
17 de HCl 0,2N e água destilada, com secagem ao ar. A seguir, as preparações foram tratadas com
18 uma solução 2xSSC, a 60°C, por 45 minutos, lavadas em água destilada e coradas com solução
19 Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8), durante 10-20 minutos e secadas ao ar.

20 **3.6 - Coloração por fluorocromos base-específicos DAPI (AT-específico) e Cromomicina** 21 **A₃ (GC-específico).**

22 A coloração por fluorocromos base-específicos foi realizada segundo o protocolo
23 descrito por Sola (1992), com algumas modificações. As preparações foram inicialmente

1 tratadas com uma solução de Distamicina A (0,3 mg/ml) durante 15 minutos, em temperatura
2 ambiente, lavadas em tampão McIlvaine e secadas ao ar. A seguir, o material foi tratado com
3 uma solução de Cromomicina A₃ (0,5 mg/ml) durante 60 minutos (no escuro), lavado em
4 tampão McIlvaine e secado ao ar. Foram adicionados 40 µl de uma solução de DAPI (1,2
5 µg/ml) + *Antifading* (Vectashield) sobre a lâmina, cobrindo-se o material com uma lâminula de
6 vidro e estocado no escuro, por alguns dias, para a estabilização da fluorescência. A análise foi
7 realizada em microscopia de epifluorescência.

8 **3.7 Preparação das sondas para experimentos de hibridização fluorescente** 9 ***in situ* (FISH)**

10 **3.7.1 Famílias multigênicas de DNAr 5S e 18S**

11 A sonda de DNAr 5S incluiu o segmento transcricional do gene DNAr 5S, com 120 pares
12 de bases (pb), e o espaçador não-transcrito (NTS), com 200 pares de bases (Martins et al.
13 2006). A sonda de DNAr 18S correspondeu a um segmento de 1.400 pares de bases do gene
14 DNAr 18S (Cioffi et al. 2009b). Ambas as sondas foram obtidas a partir do DNA nuclear de
15 *Hoplias malabaricus* e previamente clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em células
16 competentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.).

17 **3.7.2 DNA satélite 5SHindIII-DNA**

18 A seqüência de DNA satélite 5SHindIII-DNA, com 360 pb, é composta de um
19 segmento com 95 pb, com similaridade ao gene de RNAr 5S e um segmento com 265 pb,
20 similar ao NTS do gene de RNAr 5S. Esta sonda foi previamente clonada em vetores
21 plasmidiais e propagada em *E. coli* DH5α (Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.) (Martins et al.
22 2006).

1 **3.7.3 Retroelemento Rex3**

2 Inicialmente, o DNA genômico de *E. erythrinus* foi extraído a partir do fígado, de acordo
3 com o método de fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001). A seguir, o retroelemento
4 *Rex3* foi obtido diretamente por PCR, utilizando os primers Rex3f (5'-AGG CGG TGA YAA
5 GCC GCA CTG) e Rex3r (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3 '), como descrito
6 previamente por Volff et al. (1999). O segmento obtido do retroelemento *Rex3* corresponde aos
7 domínios codificantes 1, 2, 2A, A e B do gene da transcriptase reversa. Um aplicon de
8 aproximadamente 500 pb foi isolado a partir do gel e purificado com o kit Sephaglas Band
9 Prep (Pharmacia Biotech).

10 ***Ligação de fragmentos de DNA a vetores de clonagem***

11 Os fragmentos do retroelemento *Rex3*, gerados por PCR e purificados, foram ligados ao
12 vetor de clonagem pGEM-T (Promega, Madison, WI, EUA). A reação, utilizando este vetor,
13 foi realizada acrescentando-se a um tubo 3µl do fragmento de DNA de interesse (produto de
14 PCR purificado), 5µl de tampão de ligação 2x, 1µl da enzima T4 ligase (3U), 1µl do vetor
15 (50ng/µl) e 3µl de água estéril, totalizando um volume de 10µl. A mistura foi agitada
16 cuidadosamente e incubada a 4°C, por cerca de 12 horas.

17 ***Transformação de bactérias competentes e identificação de colônias recombinantes***

18 Foram colocados 50µl de bactérias competentes (*Escherichia coli* DH5α) e 10µl da reação
19 de ligação em tubos estéreis, os quais foram misturados cuidadosamente. Os tubos foram
20 mantidos no gelo por 30 minutos, submetidos a um choque térmico a 37°C, por 40 segundos e
21 transferidos novamente para o gelo, onde permaneceram por mais 2 minutos. Em seguida
22 foram adicionados a cada tubo 950µl de meio líquido LB (peptona 1% /NaCl 0,17M/extrato de

1 levedura 0,5%, pH 7,5), a temperatura ambiente, cuidadosamente misturados. Os tubos foram
2 incubados a 37°C, por cerca de 1 hora, sob agitação (250 rpm) e depois centrifugados, por 20
3 segundos, a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o produto da transformação espalhado
4 em placas de Petri estéreis, contendo meio sólido LB (peptona 1% /NaCl 0,17M/extrato de
5 levedura 0,5%/agar 1,5%, pH 7,5), ampicilina (50mg/ml/ml de meio LB) e 50µl de X-Gal (5-
6 bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galatoside, 50mg/ml). As placas foram incubadas por 16h em
7 estufa a 37°C. No dia seguinte, as colônias de coloração branca, potencialmente portadoras do
8 inserto de interesse nos plasmídios, foram selecionadas e a presença do inserto confirmada por
9 PCR.

10 ***PCR para a confirmação da presença de insertos***

11 As colônias brancas foram replicadas em meio LB sólido e submetidas diretamente à
12 reação de amplificação por PCR. O conjunto de primers utilizados foi o M13F e M13R, que
13 possuem similaridade às regiões que flanqueiam o local de inserção do fragmento no plasmídio.
14 A reação foi realizada com tampão de PCR 10x, 10mM de dNTPs, 50mM de MgCl₂, 10µM de
15 cada primer e 1 unidade de Platinum DNA Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA),
16 totalizando um volume final de 25µl. O programa utilizado no termociclador consistiu em um
17 passo a 95°C por 3 minutos, seguido por 34 ciclos a 95°C por 30 segundos, a 50°C por 1 minuto
18 e a 72°C por 2 minutos. Seguiu-se uma extensão final a 72°C, por 5 minutos. O sucesso da
19 clonagem foi verificado através da checagem do produto resultante da PCR, em gel de agarose
20 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em um transluminador de luz
21 ultravioleta.

1 ***Mini-preparações para a purificação de plasmídios recombinantes (Kit wizard Plus***

2 ***Minipreps DNA purification System – PROMEGA)***

3 As bactérias, contendo os plasmídios recombinantes, cresceram por 16h em 3ml de meio
4 de cultura líquido LB (peptona 1% / NaCl 0,17M , extrato de levedura 0,5%, pH 7,5), acrescido
5 de ampicilina (50mg/ml de meio LB). A seguir as bactérias foram transferidas para tubos de 1,5
6 ml e centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet
7 revolvido em 200µl de solução tampão. Logo após, foram adicionados 200µl da solução de lise
8 celular e os tubos foram invertidos lentamente por 4 vezes. Foram adicionados 200µl de
9 solução de neutralização, invertendo-se novamente os tubos por mais 4 vezes. O lisado foi
10 centrifugado por 5 minutos, a 10.000rpm, e a porção líquida obtida foi transferida para uma
11 seringa acoplada à uma minicoluna, contendo 1 ml de resina de purificação. Vagarosamente a
12 mistura foi filtrada a vácuo, proporcionado pelo acoplamento do êmbolo da seringa. Em
13 seguida, foram adicionados 2ml de solução de lavagem à seringa e a solução foi novamente
14 filtrada, da mesma forma. A seguir, a minicoluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e
15 centrifugada por 2 minutos, a 10.000rpm. Um novo tubo foi acoplado a minicoluna,
16 acrescentando-se 50µl de água deionizada para eluir o DNA. Após 1 minuto de incubação em
17 temperatura ambiente, foi realizada mais uma centrifugação por 20 segundos, a 10.000rpm,
18 para a recuperação do DNA. A minicoluna foi descartada e o tubo com o DNA purificado foi
19 armazenado em freezer a -20°C.

20 ***Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA***

21 Os clones obtidos foram seqüenciados em um seqüenciador ABI Prism 377 DNA
22 sequencer (Perkin-Elmer), com o kit de reação ABI Prism BigDye Terminator Cycle
23 Sequencing Ready (Perkin-Elmer). As seqüências nucleotídicas foram submetidas ao software

1 Blastn (Altschul et al. 1990) para análise de similaridade em relação às sequências depositadas
2 nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) website
3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Pesquisas no BlastN do NCBI identificaram uma
4 similaridade entre a seqüência *Rex3* de *E. erythrinus* e seqüências encontradas entre peixes de
5 outras ordens, tais como Anguilliformes, Perciformes, Beloniformes, Cyprinodontiformes e
6 Tetraodontiformes. Essa seqüência foi depositada com o número de acesso GU989321.

7 **3.7.4 Fração C₀t-1 DNA**

8 Foi feita a extração do DNA genômico de *H. malabaricus* (cariomorfo B) e de *E.*
9 *erythrinus* (cariomorfo D), utilizando o procedimento de fenol-clorofórmio descrito por
10 Sambrook & Russel (2001). Uma biblioteca enriquecida com seqüências repetitivas foi
11 construída, com base na cinética de renaturação de C₀t-1DNA (DNA enriquecido com
12 seqüências alta e moderadamente repetitivas de DNA) (Zwick et al. 1997). Amostras de DNA
13 (200µl de 100–500ng µl⁻¹ de DNA genômico em 0,3M NaCl) foram autoclavadas por 10
14 minutos, a 1,4 atmosferas de pressão e 120°C e o DNA fragmentado foi separado por
15 eletroforese, em um gel a 1%. Os fragmentos de DNA variaram em tamanho de 100 a 1000
16 pares de bases. Amostras de 50µl do DNA fragmentado foram desnaturadas a 95°C, durante 10
17 minutos, colocadas em gelo por 10 segundos e transferidas para um banho de água a 65°C, para
18 reanelamento do DNA. Após 1 minuto, as amostras foram incubadas a 37°C, por 8 minutos,
19 com 1U da enzima S1 nuclease, permitindo a digestão das fitas simples de DNA. As amostras
20 foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com fenol-
21 clorofórmio.

1 **3.7.5 DNA telomérico (TTAGGG)_n**

2 A sonda de DNA telomérico (TTAGGG)_n foi gerada por PCR na ausência de um DNA
3 molde, utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991), produzindo uma
4 amostra heterogênea de moléculas repetitivas de vários tamanhos (variando de 100 a 2000 pb),
5 quando submetidas a um gel de agarose 1%.

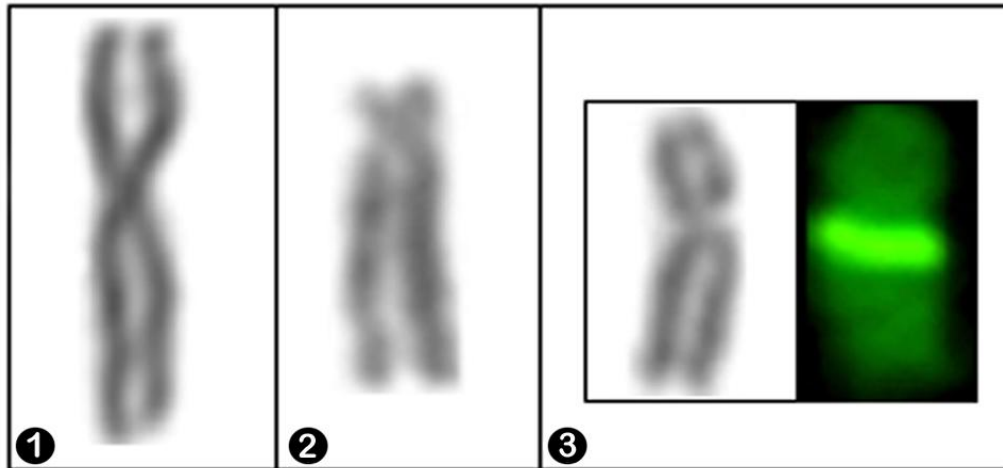
6 **3.7.6 Oligonucleotídeos enriquecidos com microsátélites**

7 Os seguintes oligonucleotídeos enriquecidos com seqüências microsátélites foram
8 utilizados como sondas: d(GA)₁₅, d(CA)₁₅, d(C)₃₀, d(CAC)₁₀, d(GC)₁₅, d(CAA)₁₀, d(A)₃₀,
9 d(CAG)₁₀, d(CAT)₁₀, d(GAG)₁₀, d(TAA)₁₀ e d(CGG)₁₀. Essas seqüências foram marcadas
10 diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, por VBC-Biotech (Viena, Áustria),
11 segundo Kubat et al. (2008), com pequenas modificações.

12 **3.7.7 Cromossomos totais isolados por microdissecção**

13 Três cromossomos sexuais distintos foram microdissectados e utilizados para a
14 preparação de sondas de cromossomos totais e empregados em análises de pintura
15 cromossômica. Para tal, 15 cópias do cromossomo Y de *E. erythrinus* (cariomorfo D - sistema
16 X₁X₂Y), 18 cópias do cromossomo X de *H. malabaricus* (cariomorfo B - sistema XY) e 15
17 cópias do cromossomo X₁ de *H. malabaricus* (cariomorfo D - sistema X₁X₂Y) foram
18 microdissectados a partir de metáfases de machos, utilizando a metodologia descrita por Yang
19 et al. (2009), com pequenas modificações. Diferentemente dos cromossomos X e Y, que são
20 facilmente identificáveis após a coloração convencional com Giemsa, a identificação precisa do
21 cromossomo X₁ é mais problemática. Para tanto, os cromossomos metafásicos do cariomorfo D
22 de *H. malabaricus* foram corados com Cromomicina A₃, a qual revela um grande bloco

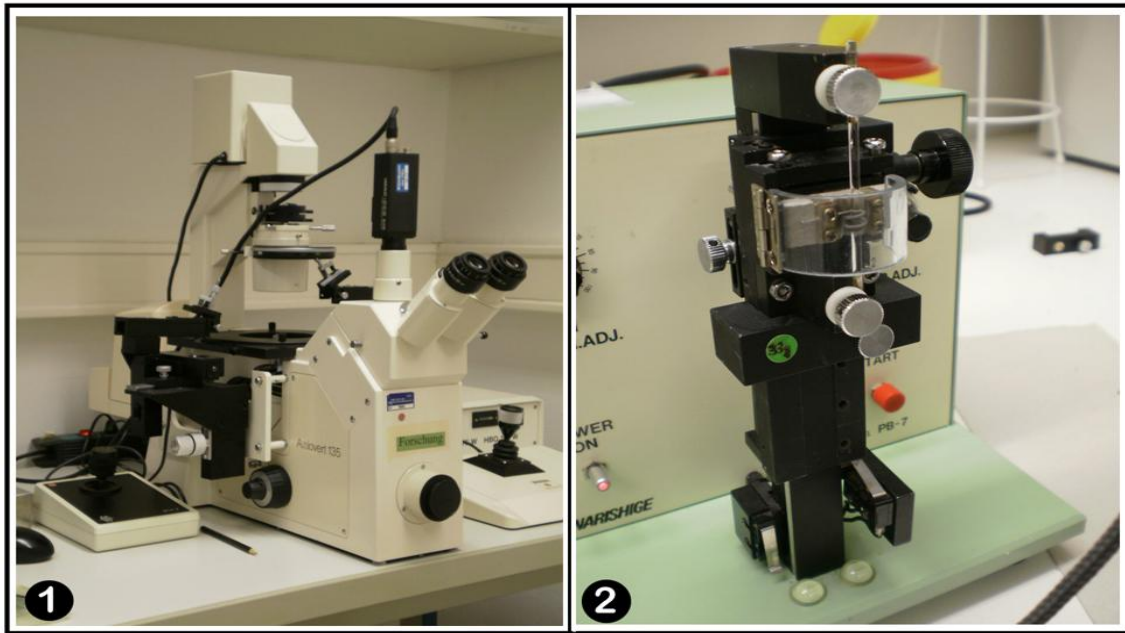
- 1 heterocromático proximal, GC-rico, presente exclusivamente neste cromossomo sexual,
- 2 possibilitando assim a sua microdissecção (**Figura 4**).



- 3 **Figura 3.** Cromossomos sexuais utilizados para a preparação de sondas de cromossomos totais,
- 4 empregadas em análises de pintura cromossômica. (1) Cromossomo Y de *Erythrinus erythrinus*
- 5 (cariomorfo D - sistema X_1X_2Y); (2) cromossomo X de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo B -
- 6 sistema XY); (3) cromossomo X_1 de *H. malabaricus* (cariomorfo D - sistema X_1X_2Y) corado
- 7 com Giemsa e com Cromomicina A_3 , evidenciando o grande bloco heterocromático proximal,
- 8 GC-rico, presente exclusivamente neste cromossomo sexual.

9 ***Preparação das agulhas de das micropipetas***

- 10 As microagulhas foram preparadas em um *puller* modelo PB-7 (Narishige, Japão)
- 11 (**Figura 4**), utilizando bastões de vidro de 2 mm (Schott Glas, Mainz, Alemanha), sendo
- 12 expostas à luz ultra-violeta, por 30 minutos, antes de sua utilização. As micropipetas foram
- 13 preparadas no mesmo aparelho, utilizando pipetas Pasteur de 250 mm (Assistent, Sondheim,
- 14 Alemanha), as quais foram siliconizadas utilizando dimetildiclorosilano 1% em tetracloreto de
- 15 carbono, e incubadas a 100°C, por 30 minutos.



1 **Figura 4.** Equipamentos utilizados no processo de microdissecção cromossômica. (1)
2 microscópio invertido Axiovert 135 (Zeiss, Jena, Alemanha) e (2) aparelho *puller* modelo PB-7
3 (Narishige, Japão).

4 ***Preparação das lamínulas e processo de microdissecção***

5 Três a quatro gotas das suspensões cromossômicas foram adicionadas sobre diferentes
6 regiões de uma lamínula previamente tratada em solução 10xSDS, e coradas com Giemsa 5%
7 por 3 minutos. Posteriormente, a microdissecção foi realizada utilizando um microscópio
8 invertido Axiovert 135 (Zeiss, Jena, Alemanha), com uma agulha de vidro estéril, acoplada a
9 um micromanipulador mecânico (Zeiss, Jena, Alemanha) (**Figura 4**).

10 Após a identificação dos cromossomos de interesse, os mesmos foram isolados com o
11 emprego do micromanipulador. Para isso, a agulha foi cuidadosamente deslocada até uma
12 posição um pouco acima do cromossomo alvo, o qual foi capturado com um movimento
13 contínuo do tipo vai-e-vem (frente-e-trás) da agulha. Uma vez cortado, o fragmento
14 cromossômico foi tocado várias vezes com a ponta da agulha, até que o mesmo fosse retido na

1 mesma. Os fragmentos cromossômicos foram então transferidos para uma micropipeta
2 contendo uma solução coletora (10 mM Tris- HCl pH 7,5, 10 mM NaCl,
3 SDS 0,1%, 1 mM EDTA pH 7,5-8,0,1% Triton X- 100, 500mM proteinase K e 30% de
4 glicerol), e inserida em uma câmara úmida a 60°C por 1 hora.

5 ***Geração de sondas cromossômicas por DOP-PCR***

6 As micropipetas foram quebradas em um tubo do tipo *ependorf* contendo
7 100 mM de dNTPs, 5 mM de primer DOP GMW (5 '-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3')
8 e tampão de diluição Sequenase (24mM Tris HCl,pH 7.5,12mM MgCl₂, 30mM NaCl). O
9 processo de amplificação foi realizado em um termociclador (Axygen Therm-1000). Os oito
10 primeiros ciclos de amplificação foram realizados utilizando a DNA polimerase T7 (USB,
11 Cleveland, EUA), com o seguinte programa: 90°C/1 min; 25°C/2 min; 34°C/2 min. Um passo
12 inicial de desnaturação a 92°C, por 5 minutos, foi adicionado a cada ciclo para inativar a
13 atividade da proteinase K. 0,3U de Sequenase foi adicionada a cada ciclo durante a etapa de
14 reanelamento. O volume da reação foi então aumentado para 50 µl contendo 0,1U de Taq
15 polimerase e 33 ciclos de amplificação foram realizados com o seguinte programa: 92°C/1 min;
16 56°C/2 min; 72°C/2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C. Os
17 produtos das reações de amplificação foram aplicados em um gel de agarose 1% e os
18 fragmentos obtidos tiveram um tamanho entre 0.2 e 0.8 Kb (**Figura 5**).

19 **3.8 Marcação das Sondas**

20 **3.8.1 Sondas de DNAs repetitivos**

21 As diferentes sondas de DNA repetitivos utilizadas foram marcadas com biotina-14-
22 dUTP, utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche, Basel, Suíça) ou com DIG-11-

- 1 dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche, Basel, Suíça), conforme as
- 2 instruções do manual do fabricante.

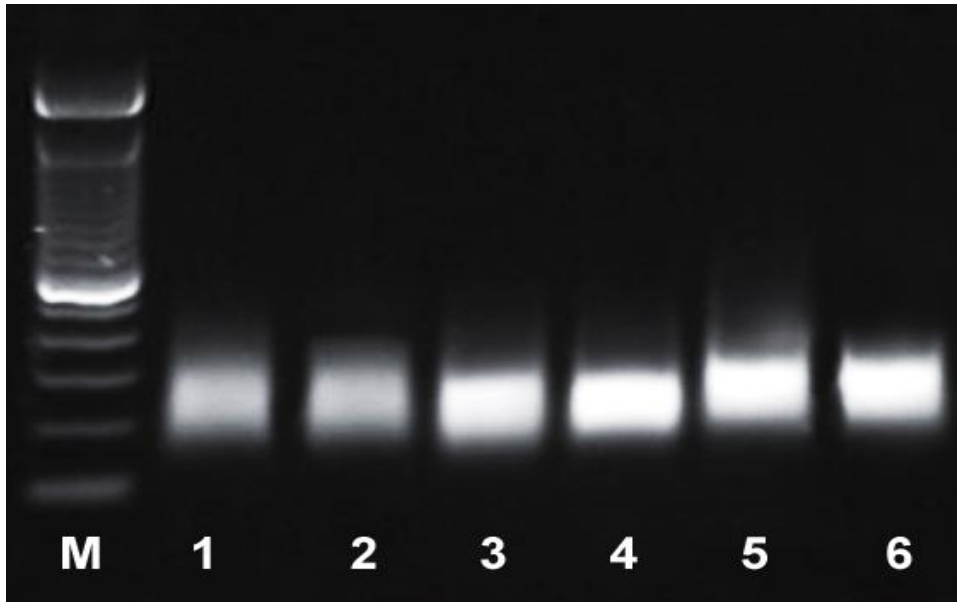


Figura 5. Gel de agarose evidenciando o DNA amplificado dos cromossomos sexuais após a microdisseção. Linhas 1, 2 e 3 correspondem ao DNA dos cromossomos Y, X e X₁, respectivamente. Linhas 4, 5 e 6 correspondem ao DNA dos cromossomos Y, X e X₁ marcados com Spectrum-Orange dUTP, Spectrum-Green dUTP e Cy5-dUTP, respectivamente. M = 100 bp DNA ladder (Invitrogen)

3 3.8.2 Sondas de cromossomos totais

4 As diferentes sondas dos cromossomos totais utilizadas foram marcadas por PCR com
5 Spectrum-Green dUTP (Vysis, Downers Grove, USA), Spectrum-Orange dUTP (Vysis,
6 Downers Grove, EUA) ou com Cy5-dUTP (Amersham, Little Chalfont, Inglaterra), em 28
7 ciclos de DOP-PCR utilizando 1 µL dos produtos iniciais de amplificação por DOP-PCR. Os
8 ciclos de amplificação foram realizados utilizando a Stoffel AmpliTaq Polymerase (Roche,
9 Basel, Suíça), com o seguinte programa: 94°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/2min, com um passo
10 inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos e uma etapa de extensão final de 5 minutos a

1 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram aplicados em um gel de agarose 1% e os
2 fragmentos obtidos tiveram um tamanho entre 0.2 e 0.8 Kb (**Figura 5**).

3 **3.9 Preparação das lâminas, hibridização *in situ* e detecção do sinal**

4 As preparações cromossômicas foram inicialmente desidratadas em uma série de etanol a
5 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho e, a seguir, incubadas com RNase (40 µg/ml),
6 por 1 hora à 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação do DNA cromossômico em
7 formamida 70%/ 2xSSC, o material foi novamente desidratado em série de etanol a 70%, 85%
8 e 100%, 5 minutos em cada banho . As misturas de hibridização, contendo 100ng da sonda
9 desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida, em um volume
10 final de 30µl, foram aquecidas a 100°C, por 10 minutos, e então aplicadas sobre as lâminas e a
11 hibridização realizada por um período de 16-18h, a 37°C, em câmara úmida. No caso de
12 experimentos de dupla-FISH, sondas biotinizadas e marcadas com digoxigenina foram
13 adicionadas concomitantemente no mix de hibridização, em uma proporção de 1:1. As lavagens
14 pós-hibridização foram realizadas em formamida 50%, durante 15 minutos, seguida de uma
15 segunda lavagem em 2xSSC, por 15 minutos e uma última lavagem em 4xSSC, também por 15
16 minutos, a temperatura ambiente. A detecção das sondas foi realizada com avidina-FITC 0,07%
17 conjugados (Sigma, St. Louis, MO, EUA), em tampão C (0.1 M NaHCO₃ , 0,15 M NaCl), por
18 1h, para sondas previamente marcadas com biotina, ou com anti-digoxigenina-rhodamina
19 (Roche, Basel, Suíça), em tampão C (0.1 M NaHCO₃, 0,15 M NaCl), também por 1h, para
20 sondas previamente marcadas com digoxigenina. Em experimentos de dupla-FISH as detecções
21 foram realizadas concomitantemente. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (1,2
22 µg/ml) e foram montados em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, EUA)

1 **3.10 Análises cariotípicas**

2 As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de
3 campo claro, estabelecendo-se o número diplóide modal de cromossomos para cada
4 cariomorfo. Cerca de 30 células foram analisadas para cada metodologia proposta. As imagens
5 das melhores metáfases foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro , Image
6 Pro Plus 4.1 (Media Cybernetic). As preparações com fluorocromos e hibridização fluorescente
7 *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus Bx50, com os filtros
8 apropriados, sendo as imagens capturadas também com a utilização do mesmo software. Os
9 cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm),
10 subtlocêntricos (st) ou acrocêntricos (a), com base na relação de braços proposta por Levan et
11 al. (1964).

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Os resultados obtidos no presente estudo e a sua discussão encontram-se subdivididos na
2 forma de 7 capítulos, os quais correspondem aos artigos científicos listados abaixo que já se
3 encontram publicados ou aceitos para publicação. A versão publicada dos mesmos encontra-se
4 no volume “**Material Suplementar**”, anexo a esta tese.

- 1. Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. 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** (on line) 10:271 (2010).
- 2. Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC. Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. **Cytogenetic and Genome Research** 132:188-194 (2011).
- 3. Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research** 132:289-296 (2011).
- 4. Cioffi MB, Molina WF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Chromosomal distribution of repetitive DNA sequences highlights the independent differentiation of multiple sex chromosomes in two closely related fish species. **Cytogenetic and Genome Research** 134:295-302 (2011).
- 5. Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC. Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes. **BMC Evolutionary Biology** (on line) 11:186 (2011).
- 6. Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC. Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. **Genetica** 139:1065–1072 (2011).
- 7. Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes. An overview from fish scenario. **Journal of Fish Biology** (*in press*).

Capítulo 1

Dispersão de elementos transponíveis associados ao DNA ribossomal no genoma do peixe *Erythrinus erythrinus*. Implicações quanto às modificações genômicas e carioevolução em peixes

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC
BMC Evolutionary Biology 10:271 (2010)

Resumo

1 O peixe, *Erythrinus erythrinus*, apresenta uma grande diversidade interpopulacional, com 4
2 cariomorfos que diferem pelo número e morfologia cromossômica além da presença de
3 cromossomos sexuais heteromórficos. O cariomorfo A tem um número diplóide de $2n = 54$
4 não apresentando cromossomos sexuais diferenciados. O cariomorfo D tem $2n = 52$
5 cromossomos nas fêmeas e $2n = 51$ nos machos, sendo provavelmente derivado do
6 cariomorfo A pela diferenciação de um sistema múltiplo de cromossomos sexuais X_1X_2Y .
7 Neste estudo, nós analisamos os cariomorfos A e D por meio de abordagens citogenéticas
8 com o intuito de avaliar suas relações evolutivas. Diferenças conspícuas na distribuição dos
9 sítios de DNAr 5S e do retrotransposon *Rex3* foram encontradas entre os dois cariomorfos,
10 enquanto nenhuma alteração no padrão de distribuição da heterocromatina e dos sítios de
11 DNAr 18S foram encontradas entre eles. O retrotransposon *Rex3* mostrou-se intersticialmente
12 dispersos na maioria dos cromossomos. Enquanto que no cariomorfo A foi evidenciada uma
13 distribuição compartimentalizada nas regiões centroméricas de apenas dois cromossomos
14 acrocêntricos, no cariomorfo D foram encontrados 22 sítios nos cromossomos acrocêntricos
15 das fêmeas e 21 sítios nos machos. Todos os sítios de DNAr 5S foram co-localizados com os
16 de *Rex3*, sugerindo que estes elementos estão associados no genoma. Adicionalmente, a
17 origem por fusão cêntrica do cromossomo Y metacêntrico no cariomorfo D foi evidenciada
18 pela presença de ITS, assim como pela presença de sítios 5S DNAr/*Rex3* sobre este
19 cromossomo. Nossos resultados indicam que rearranjos cromossômicos e modificações
20 genômicas foram eventos significativos na evolução cariotípica nesta espécie de peixe. Além
21 das fusões cênicas associadas com a diferenciação dos cromossomos sexuais múltiplos do
22 cariomorfo D, pudemos evidenciar um aumento surpreendente de sítios associados de
23 DNAr5S/*Rex3* em contraste com o cariomorfo A. Nesse sentido, *E. erythrinus* emerge como
24 um excelente modelo para uma melhor compreensão dos mecanismos evolutivos
25 relacionados à grande diversidade genômica encontrada em peixes, assim como do genoma
26 dos vertebrados como um todo.

1 **Introdução**

2 Seqüências repetitivas de DNA incluem satélites arranjados em tandem, bem como
3 minissatélites, microssatélites e as repetições dispersas, como os elementos transponíveis (TEs)
4 (Jurka et al. 2005). DNAs satélites mostram-se organizados como longos arranjos de repetições
5 ligadas “head-to-tail”. TEs são segmentos de DNA capazes de se integrar em novos locais no
6 genoma, além de serem capazes de mobilizar seqüências não-autônomas (Volff et al. 2003;
7 Ozouf-Costaz et al. 2004). TEs e DNAs satélite são alguns dos componentes mais importantes
8 do genoma que contribuem para a variação genética dentro e entre as espécies (Biémont, 2008).
9 As possíveis funções destes DNAs repetitivos têm sido foco de diversos estudos, e há
10 indicações de que poderiam desempenhar um papel importante tanto em nível cromossômico
11 bem como nuclear (Larin et al. 1994; Biémont & Vieira, 2006; Feschotte et al. 2007; Longo et
12 al. 2009).

13 O genoma dos peixes contém todos os tipos conhecidos de elementos transponíveis: os
14 transposons clássicos, os elementos transponíveis com repetições invertidas em miniatura e os
15 retroelementos, que incluem os retrotransposons com (LTR) e sem (non-LTR) repetições
16 terminais longas (Volff, 2005). Enquanto os transposons se movem diretamente como
17 moléculas de DNA a partir de um local genômico para outro, os retroelementos se transpõem
18 através de um RNA intermediário. Dentro dos retrotransposons, *Rex* é composta de várias
19 famílias de elementos transponíveis que são abundantes em teleósteos. *Rex3*, o primeiro isolado
20 a partir do peixe modelo, *Xiphophorus*, é um elemento não-LTR relacionados com a família
21 RTE, que apresenta uma ampla distribuição, bem como diferentes padrões de organização no
22 genoma de várias espécies de peixes (Volff et al. 1999; Malik et al. 1998).

1 A organização molecular e o mapeamento citogenético de DNAs repetitivos, incluindo
2 repetições de DNAr (Martins et al. 2006; Vicari et al. 2005; Vicari et al. 2008a; Cioffi et al.
3 2009a; Cioffi et al. 2009b; Blanco et al. 2010; Cioffi & Bertollo, 2010), DNAs satélite (Ferreira
4 et al. 2007; Pazza et al. 2008), as seqüências teloméricas (Cioffi & Bertollo, 2010; Chew et al.
5 2002; Sola et al. 2000) e diversas classes de elementos transponíveis (Volff et al. 2003; Ozouf-
6 Costaz et al. 2004; Mazzuchelli & Martins, 2009; Teixeira et al. 2009), têm sido analisados em
7 um número grande de espécies de peixes. Estes estudos têm demonstrado o enorme potencial
8 que a investigação de DNAs repetitivos oferece para ampliar o nosso conhecimento sobre a
9 diferenciação cariotípica e a evolução dos cromossomos sexuais em peixes (Cioffi et al. 2009a;
10 Cioffi & Bertollo, 2010; Nanda et al. 1990; 2000; 2002; Stein et al. 2001; Parise-Maltempi et
11 al. 2007). Estes componentes genômicos são capazes de alterar a composição molecular dos
12 cromossomos e reduzir a taxa de recombinação entre eles, passos estes que são cruciais na
13 diferenciação dos cromossomos sexuais (Liu et al. 2004; Charlesworth & Charlesworth, 2005;
14 Marchal et al. 2006; Kejnovsky et al. 2009).

15 *Erythrinus* é um gênero relativamente pouco estudado comparativamente aos demais
16 peixes da família Erythrinidae. Até agora, só foram realizadas análises citogenéticas clássicas
17 com a espécie *E. erythrinus*, sendo demonstrada uma grande diversidade cariotípica entre
18 diferentes populações, com a identificação de quatro cariomorfos (A a D) (Bertollo et al. 2004).
19 O cariomorfo A é composto de populações com $2n = 54$ cromossomos, com estruturas
20 cariotípicas muito semelhantes ($6m+2st+46a$) e ausência de cromossomos sexuais
21 diferenciados. Os cariomorfos B, C e D compartilham um sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de
22 cromossomos sexuais, mas diferem quanto ao número diplóide e a morfologia cromossômica.
23 Foi proposto que uma fusão cêntrica, envolvendo dois cromossomos acrocêntricos não-

1 homólogos, teria originado o grande cromossomo Y metacêntrico que caracteriza os
2 cariomorfos B, C e D. e, conseqüentemente, os dois cromossomos não pareados (X_1 e X_2) no
3 cariótipo dos machos. O cariomorfo B tem $2n = 54$ cromossomos ($6m+2st+46a$) nas fêmeas e
4 $2n = 53$ ($7m+2st+44a$) nos machos. Ambos os cariomorfos C e D apresentam $2n = 52/51$
5 cromossomos nas fêmeas e machos, respectivamente, mas diferem em suas fórmulas
6 cariotípicas, ou seja, $6m+2sm+6st+38a$ nas fêmeas e $7m+2sm+6st+36a$ nos machos do
7 cariomorfo C e $4m+2sm+2st+44a$ nas fêmeas e $5m+2sm+2st+42a$ nos machos do cariomorfo
8 D. As características cromossômicas distintas encontradas entre populações isoladas sugerem a
9 ocorrência de espécies distintas neste grupo de peixes (Bertollo et al. 2004).

10 No presente trabalho, novas amostras de populações alopátricas dos cariomorfos A e D
11 foram analisadas, com o emprego de novas abordagens metodológicas de citogenética
12 molecular, com o intuito de se encontrar caracteres adicionais úteis para estudos de genômica
13 comparativa a nível cromossômico, além de proporcionar *'insights'* sobre os caminhos
14 evolutivos neste grupo de peixes. Os resultados mostram que rearranjos cromossômicos e
15 alterações genômicas foram eventos significativos durante o curso da evolução cariotípica deste
16 peixe. Fusões cêntricas foram detectadas e claramente associadas com a diferenciação dos
17 cromossomos sexuais múltiplos presente no cariomorfo D. Além disso, um aumento
18 surpreendente no número de locos DNAr *5S/Rex3* associados foi encontrado no cariomorfo D,
19 em contraste com o cariomorfo A.

20 **Resultados**

21 Cariotipagem e Bandamento C

22 As duas populações mostraram a estrutura cariotípica geral até então encontrada dentro de
23 *Erythrinus*, com a presença de poucos cromossomos acrocêntricos e um grande número de

1 acrocêntricos (**Fig. 1**). A amostra de Penápolis-SP apresentou $2n = 54$ cromossomos
2 $(6m+2st+46a)$ e ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados,
3 característicos de cariomorfo A. A amostra de Natal-RN apresentou $2n = 52$ cromossomos
4 $(4m+2sm+2st+42a)$ nas fêmeas e $2n = 51$ cromossomos $(5m+2sm+2st+42a)$ nos machos, com
5 um sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de cromossomos sexuais múltiplos, presente no cariomorfo D
6 (**Fig. 1**). Em ambos os cariomorfos foram observadas bandas C-positivas conspícuas na região
7 centromérica/pericentromérica de vários cromossomos, bem como na região telomérica de
8 alguns pares. Um bloco heterocromático pequeno, mas significativo, foi encontrado na região
9 intersticial do braço longo dos cromossomos Y e X_1 do cariomorfo D (**Fig. 1**).

10 Seqüência de Nucleotídeos

11 Seqüências de nucleotídeos foram determinadas para os clones de *Rex3*, para confirmar
12 que os fragmentos de DNA isolados por PCR correspondiam a cópias desse retroelemento.
13 Uma dessas seqüências foi depositada no GenBank sob o número de acesso, GU989321.
14 Pesquisas no BlastN do NCBI identificaram uma similaridade entre a seqüência *Rex3* de *E.*
15 *erythrinus* e seqüências encontradas entre peixes de outras ordens, tais como Anguilliformes,
16 Perciformes, Beloniformes, Cyprinodontiformes e Tetraodontiformes.

17 Mapeamento citogenético de DNAr 18S e 5S, do retroelemento *Rex3* e repetições teloméricas 18 *(TTAGGG)*n**

19 Double-FISH com DNAr 5S e 18S apresentaram um padrão de distribuição semelhante
20 para os sítios de DNAr 18S em ambos o cariomorfos A e D. Cinco pares acrocêntricos com
21 sítios teloméricos no braço longo ou curto foram encontrados. Além disso, sítios biteloméricos
22 foram encontrados no par no. 14. Em contraste, uma grande diferença foi observada na
23 distribuição do DNAr 5S. O cariomorfo A apresentou apenas dois sítios de DNAr 5S na região

1 centromérica do par acrocêntrico no. 8, que também possui um sítio telomérico de DNAr 18S
2 em seu braço longo. Embora o cariomorfo D também compartilhou esta condição sintênica
3 observada no cariomorfo A, ele diferenciou-se por apresentar um aumento surpreendente no
4 número de sítios de DNAr 5S, com 22 sítios nas fêmeas e 21 nos machos. Todos estes sítios
5 foram encontrados na região centromérica de cromossomos acrocêntricos, exceto para um sítio
6 localizado no cromossomo Y metacêntrico dos machos. **(Fig. 1).**

7 Duplo FISH com sondas de DNAr 5S e *Rex3* mostrou que as seqüências de *Rex3*
8 apresentam um padrão de distribuição intersticial e disperso ao longo da maioria dos
9 cromossomos em ambos os cariomorfos. Além disso, clusters de *Rex3* foram
10 predominantemente localizados nas regiões centroméricas e co-localizados com blocos
11 heterocromáticos em ambos os cariomorfos, seguindo perfeitamente o padrão de distribuição
12 dos sítios de DNAr 5S **(Fig. 2).**

13 O mapeamento das repetições teloméricas (TTAGGG)_n nos machos do cariomorfo D
14 apresentou sinais teloméricos típicos em ambos os telômeros de todos os cromossomos. Sítios
15 teloméricos intersticiais (ITS) foram localizados apenas nas regiões centroméricas do único par
16 submetacêntrico e no cromossomo Y metacêntrico **(Fig. 3).**

17 **Discussão**

18 Entre os peixes Characiformes, que incluem a família Erythrinidae, o número
19 cromossômico mais freqüente é $2n=54$, e este número pode representar o número diplóide basal
20 desta ordem (Oliveira et al. 2007). Neste contexto, o cariomorfo A de *E. erythrinus*, que tem
21 um número diplóide de $2n = 54$, representaria o cariótipo mais ancestral encontrado no gênero
22 *Erythrinus*. Esta constatação também leva em conta o fato de que este cariomorfo também não
23 apresenta cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. Assim sendo, o cariomorfo

1 D, provavelmente derivado do cariomorfo A, apresenta um número diplóide menor devido a
2 rearranjos cromossômicos e um sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ bem diferenciado de cromossomos
3 sexuais múltiplos. No entanto, apesar das diferenças de números diplóides e a ocorrência de
4 cromossomos sexuais diferenciados, os cariomorfos A e D compartilham uma estrutura
5 cariotípica relativamente semelhante, formada por vários cromossomos acrocêntricos e alguns
6 cromossomos de dois braços com distribuição semelhante de bandas-C e sítios de DNAr 18S.
7 Entretanto, as seqüências repetitivas de DNAr 5S e *Rex3* apresentaram distribuições bastante
8 distintas nos dois cariomorfos.

9 A redução no número de cromossomos frequentemente está associada à ocorrência de
10 fusões cêntricas entre cromossomos acrocêntricos. Com base apenas em dados de citogenética
11 clássica já foi proposto que uma fusão cêntrica deve ter dado origem ao sistema sexual
12 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, encontrado nos cariomorfos B, C e D de *E. erythrinus*. Além disso, foi
13 também proposto que a diferenciação do cariomorfo D foi complementada por uma fusão
14 cêntrica adicional entre dois cromossomos acrocêntricos não-homólogos, originando o único
15 par submetacêntrico encontrado no cariótipo, além de inversões pericêntricas que diminuíram o
16 número de cromossomos metacêntricos e aumentaram o número de cromossomos acrocêntricos
17 (Bertollo et al. 2004). De fato, essa diferenciação cariomórfica foi agora confirmada pelo
18 mapeamento de seqüências repetitivas de DNA (**Fig. 4**).

19 A localização cromossômica do DNAr 5S, do retroelemento *Rex3* e das repetições
20 teloméricas corroboram claramente a fusões cêntricas que ocorreram durante a diferenciação
21 cariotípica do cariomorfo D. O mapeamento de ITS na região centromérica do par
22 submetacêntrico destaca a fusão cêntrica associada com a origem deste par de cromossomos, o
23 qual não é encontrado no cariomorfo A. Da mesma forma, nossos resultados suportam a

1 proposta de origem do cromossomo Y metacêntrico pela ocorrência de outra fusão cêntrica.
2 Como esperado, repetições (TTAGGG)_n também foram encontradas na região centromérica
3 deste cromossomo (**Fig. 3**). ITS têm sido encontrados na região centromérica dos cromossomos
4 de um grande número de espécies de vertebrados, sugerindo que rearranjos cromossômicos
5 podem ocorrer sem a perda dessas seqüências teloméricas (Meyne et al. 1989). A hipótese geral
6 que ITS podem ser remanescentes de rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução
7 do genoma é apoiada por diversas investigações (Ijdo et al. 1991).

8 A localização das seqüências DNAr 5S/*Rex3* na posição centromérica do cromossomos Y
9 é de especial relevância. Essas seqüências foram encontradas na região centromérica de
10 diversos cromossomos acrocêntricos, incluindo os prováveis cromossomos X₁ (no. 5) e X₂ (no.
11 12). O mapeamento de um sítio DNAr 5S/*Rex3* na região centromérica do cromossomo Y
12 indica que esse cromossomo foi originado a partir de uma fusão cêntrica entre os pares
13 acrocêntricos nos. 5 e 12, que deu origem ao cromossomos não-pareados X₁ e X₂ no cariótipo
14 dos machos (**Figs. 1 e 2**). Apesar da identificação do cromossomo X₂ ainda não ser precisa, o
15 cromossomo X₁ parece ser de fato o primeiro par acrocêntrico (no. 5) neste cariótipo. Este
16 resultado é apoiado pelo padrão de bandas C, no qual uma banda C-positiva fraca, mas
17 informativa, ocorre intersticialmente nas regiões correspondentes do cromossomo X₁ e no
18 braço longo do cromossomo Y. É provável que a mesma fusão cêntrica possa estar também
19 relacionada com a origem do sistema sexual X₁X₂Y presente nos cariomorfos B e C, uma vez
20 que este parece ter se originado antes da divergência dos três cariomorfos (Bertollo et al. 2004)
21 (**Fig. 4**).

22 Entretanto, a diferença mais notável entre os cariomorfos A e D foi a distribuição dos
23 sítios associados de DNAr 5S/*Rex3*. Enquanto que apenas um único par de cromossomos foi

1 portador destes sítios no cariomorfo A, um número surpreendentemente grande destes sítios foi
2 encontrado no cariomorfo D, com 22 sítios nas fêmeas e 21 nos machos (**Figs 2 e 4**). *Rex3*, um
3 retrotransposon sem LTR isolado pela primeira vez do peixe *Xiphophorus maculatus*, mostra
4 uma ampla distribuição entre os peixes teleósteos, onde parece estar associado com a evolução
5 de diferentes linhagens (Volf et al. 1999; Malik et al. 1998). Embora o *Rex3* apresente uma
6 localização preferencial na região centromérica de cromossomos em alguns peixes
7 (Mazzuchelli & Martins, 2009; Teixeira et al. 2009; DaSilva et al. 2002; Bouneau et al. 2003;
8 Gross et al. 2009), a distribuição deste retroelemento é amplamente dispersa por todos os
9 cromossomos de várias espécies de peixes Antárticos, com sinais de hibridação intensos em
10 algumas regiões cromossômicas específicas (Ozouf-Costaz et al. 2004). Uma vez que a grande
11 maioria das espécies de peixes estudadas até agora apresenta um número reduzido de sítios de
12 DNAr 5S, com poucas exceções (Affonso et al. 2005; Polleto et al. 2010), o elevado número de
13 sítios de DNAr 5S encontrados no cariomorfo D foi uma característica inesperada.
14 Considerando a hipótese mais provável que o cariomorfo D representa uma forma derivada em
15 relação ao cariomorfo A, nossos resultados demonstram claramente uma enorme dispersão dos
16 elementos associados DNAr 5S/*Rex3* nas regiões centroméricas dos cromossomos
17 acrocêntricos. Nossa proposta é que seqüências do retroelemento *Rex3* pode ter se inserido em
18 seqüências de DNAr 5S e que o complexo DNAr 5S/*Rex3* se moveu e dispersou no cariótipo,
19 embora essa hipótese mereça uma investigação molecular mais apurada para sua confirmação.
20 A clara associação entre as regiões centroméricas dos cromossomos acrocêntricos (**ver**
21 **detalhes na figura 2**), parece ser uma condição favorável para a ocorrência de tal dispersão.

22 Dados anteriores têm sugerido que loci de DNAr podem servir como um nicho ideal para
23 a sobrevivência a longo prazo de TEs (Zhang et al. 2008), como pode ser evidenciado em

1 diversos organismos (Eickbush, 2002; Belyayev et al. 2005; Ye & Eickbush, 2006).
2 Hibridizações *in situ* revelaram um agrupamento permanente de diferentes TEs em RONS, bem
3 como próximos ou inseridos em clusters de DNAr 5S (Belyayev et al. 2005; Raskina et al.
4 2004). Hibridização em fibras extendidas de DNA identificaram inserções de TEs em região de
5 DNAr, a sobreposição de DNAr e regiões enriquecidas com TEs, e pequenos fragmentos de
6 DNAr em regiões TE-enriquecidas. A presença dos TEs dentro ou ao redor de sítios de DNAr
7 aumenta a possibilidade de recombinação, o que parece ser um evento comum na evolução
8 cariotípica de plantas (Raskina et al. 2008). Entre as plantas, a distribuição dos genes de DNAr
9 5S é altamente variável e pode ser parcialmente explicada pela atividade de pequenos
10 retrotransposons não-autônomos chamados Cassandra (Kalendar et al. 2008). Acredita-se
11 atualmente que os TEs tendem a se acumular nas regiões heterocromáticas, uma vez que nestas
12 regiões existem menos genes e uma seleção mais fraca comparativamente às regiões
13 eucromáticas (Venner et al. 2009). Estudos recentes têm proposto que a atividade de TEs é uma
14 possível fonte de mobilidade para os DNAr (Zhang et al. 2008; Raskina et al. 2008). Além
15 disso, têm sido também documentado a capacidade de algumas classes de transposons para
16 capturar genes inteiros e movê-los para diferentes partes do genoma (Jiang et al. 2004; Lai et al.
17 2005).

18 Assim, considerando a correlação entre a ocorrência de rearranjos cariotípicos e a
19 atividade de retrotransposons (Ozouf-Costaz et al. 2004), e que a rápida evolução
20 cromossômica evidenciada em algumas linhagens de vertebrados pode ser conduzida pela
21 atividade de seqüências repetitivas (Wichman et al. 1991), nós consideramos duas alternativas
22 igualmente prováveis na diversificação cariotípica de *E. erythrinus*: (i) os cromossomos desta
23 espécie foram submetidos a rearranjos durante o processo evolutivo mediada pela atividade de

1 retrotransposons ou (ii) diferentes rearranjos, incluindo a posterior mobilização de TEs,
2 promoveu a diferenciação cariotípica entre as populações. No entanto, é difícil afirmar se a
3 mudança no conteúdo ou atividade de TE é a causa ou a consequência de um processo de
4 especiação, uma vez que o verdadeiro papel dos elementos transponíveis na especiação ainda é
5 um assunto em debate (Biémont & Vieira, 2006).

6 Mudanças entre diferentes sistemas de determinação sexual e a rápida evolução dos
7 cromossomos sexuais em peixes podem ser também relacionadas à formação de novas espécies
8 (Barske & Capel, 2008). Recentes estudos comparativos revelam que o genoma nos teleósteos
9 passou por uma alta taxa de quebras de grupos de ligação e rearranjos cromossômicos em
10 relação aos mamíferos, que podem estar ligados à aparente plasticidade de seu genoma (Ravi &
11 Venkatesh, 2008; Venkatesh, 2003). Estudos em modelos de peixes podem, portanto, ajudar a
12 melhor compreender os mecanismos moleculares e evolutivos associados à enorme diversidade
13 genômica encontrada nesse grupo, bem como a evolução do genoma dos vertebrados como um
14 todo.

15 **Conclusão**

16 Nossa investigação *in situ* de seqüências repetitivas de DNA resultou em novas
17 ferramentas úteis para estudos de genômica comparativa a nível cromossômico, além de
18 fornecer “insights” sobre os caminhos da evolução do cariótipo no peixe *E. erythrinus*.
19 Rearranjos cromossômicos e alterações genômicas foram eventos significativos durante a
20 carioevolução deste peixe. A dispersão de elementos transponíveis associados ao DNA
21 ribossomal 5S e a diferenciação do sistema de cromossomos sexuais múltiplos foram marcantes
22 na evolução do cariomorfo D. Considerando o fato de que os peixes ocupam uma posição basal
23 na filogenia dos vertebrados, que apresentam uma diversidade de mecanismos de determinação

1 do sexo e que muitas espécies não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, *E.*
2 *erythrinus* se destaca como um modelo excelente para a melhor compreensão dos mecanismos
3 evolutivos relacionados à grande diversidade genômica encontrada entre os vertebrados.

4 **Métodos**

5 *Espécimes, preparação de cromossomos mitóticos, coloração cromossômica e cariotipagem*

6 Neste estudo, foram analisadas novas amostras de populações dos cariomorfos A e D do
7 peixe *E. erythrinus*. Foram estudados um total de 28 exemplares (16 machos e 12 fêmeas).
8 Treze espécimes (8 machos e 5 fêmeas) do cariomorfo A foram obtidas na região de Penápolis
9 – Estado de São Paulo, e 15 espécimes (8 machos e 7 fêmeas) do cariomorfo D foram obtidos
10 na região de Natal – Estado do Rio Grande do Norte. Estas amostras pertencem a diferentes
11 bacias hidrográficas brasileiras, que estão isoladas por milhares de quilômetros.

12 Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensões celulares do rim anterior
13 usando o método convencional de secagem ao ar (Bertollo et al. 1978). Os experimentos
14 seguiram condutas éticas, sendo os animais foram anestesiados antes do sacrifício. Os
15 cromossomos foram sequencialmente corados com Giemsa e submetidos ao bandamento C,
16 utilizando hidróxido de Bário para detectar a heterocromatina C-positiva (Sumner, 1972).
17 Cerca de 30 metáfases foram analisadas por espécime, para determinar o número diplóide e a
18 estrutura cariotípica. As imagens foram captadas pelo sistema de software CoolSNAP, imagem
19 Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, E.U.A.), acoplado a um microscópio
20 Olympus BX50 (Olympus, Ishikawa, Japan). Os cromossomos foram classificados como
21 metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) ou acrocêntricos (a) de acordo
22 com as relações de braços (Levan et al. 1964).

1 Sondas cromossômicas

2 Foram utilizadas duas seqüências de DNAs repetitivos, isoladas diretamente do genoma
3 de *Hoplias malabaricus*, outra espécie da família Erythrinidae. A primeira sonda incluiu
4 cópias repetidas de DNAr 5S, contendo 120 pares de bases (pb) do gene codificante (DNAr 5S)
5 e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS) (Martins et al. 2006). A segunda sonda
6 correspondeu a um segmento de 1.400 pares de bases do gene do RNAr 18S, obtido por PCR a
7 partir do DNA nuclear (Cioffi et al. 2009a). As sondas de DNAr 5S e 18S foram clonadas em
8 vetores plasmidiais e propagadas em células competentes de *E. coli* DH5 α . (Invitrogen, San
9 Diego, CA, E.U.A.).

10 O retroelemento *Rex3*, foi obtido diretamente por PCR a partir do genoma de *E.*
11 *erythrinus*, utilizando os primers Rex3f (5'-AGG CGG TGA YAA GCC GCA CTG) e Rex3r
12 (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3 '), como descrito previamente (Volf et al. 1999;
13 Ozouf-Costaz et al. 2004). O segmento obtido do retroelemento *Rex3* corresponde aos
14 domínios codificantes 1, 2, 2A, A e B do gene da transcriptase reversa (Volf et al. 1999). Um
15 fragmento amplificado por PCR (~ 500 pb) foi isolado a partir do gel, purificado com o kit
16 Sephaglas Band Prep (Pharmacia Biotech), ligado com o plasmídeo pGEM-T (Promega), o
17 qual foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen). Os clones
18 obtidos foram seqüenciados em um seqüenciador ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-
19 Elmer), com o kit de reação ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Perkin-
20 Elmer). A seqüência de nucleotídeos foi submetida a pesquisas no BlastN (Altschul et al.
21 1990), no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) - website
22 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) - para a identificação de similaridades da seqüência
23 isolada com seqüências depositadas no banco de dados do GenBank.

1 A sonda de DNAr 5S foi marcada com biotina-14-dATP, de acordo com especificações
2 do fabricante (Bionick Labeling System, Invitrogen, San Diego, CA, USA). As sondas de
3 DNAr 18S e *Rex3* foram marcadas com DIG-11-dUTP, de acordo com especificações do
4 fabricante (Roche, Mannheim, Germany).

5 Sequências de DNA telomérico (TTAGGG)_n foram também utilizadas como sonda,
6 gerada por PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit, Roche), na ausência de um DNA molde,
7 utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991).

8 Hibridização Cromossômica

9 A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada nos cromossomos mitóticos, sob
10 alta estringência (Pinkel et al. 1986). Os cromossomos foram incubados com RNase (40
11 µg/ml) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação do DNA em formamida
12 70%/ 2xSSC à 70°C, as lâminas foram incubadas em 2xSSC por 4 minutos, à 70°C. As
13 misturas de hibridização contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de
14 dextrano, 2xSSC e 50% de formamida, em um volume final de 30µl, foram aquecidas a 100°C
15 por 10 minutos e então aplicadas sobre as lâminas. A hibridização foi realizada por um período
16 de 16 a 18 horas em câmara úmida, a 37°C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em
17 2xSSC à 37°C durante 5 minutos, seguida de uma segunda lavagem em 2xSSC de 15 min e
18 uma última lavagem em 4xSSC por 15 min, em temperatura ambiente. A detecção dos sinais de
19 hibridização foi realizada com avidina-FITC conjugada (Sigma, St. Louis, MO, USA) para a
20 sonda de DNAr 5S e com anti-digoxigenina-rodamina (Roche, Mannheim, Germany) para as
21 sondas de DNAr 18S, *Rex3* e (TTAGGG)_n. As lavagens pós hibridização foram realizadas em
22 um “shaker”, a 150 rpm. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (1,2 µg/ml) e as
23 lâminas foram montadas em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, USA). As análises de

- 1 FISH foram realizadas utilizando um microscópio de epifluorescência (Olympus Corporation,
- 2 Ishikawa, Japan).

3 **Referências Bibliográficas**

- 4 As referencias bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

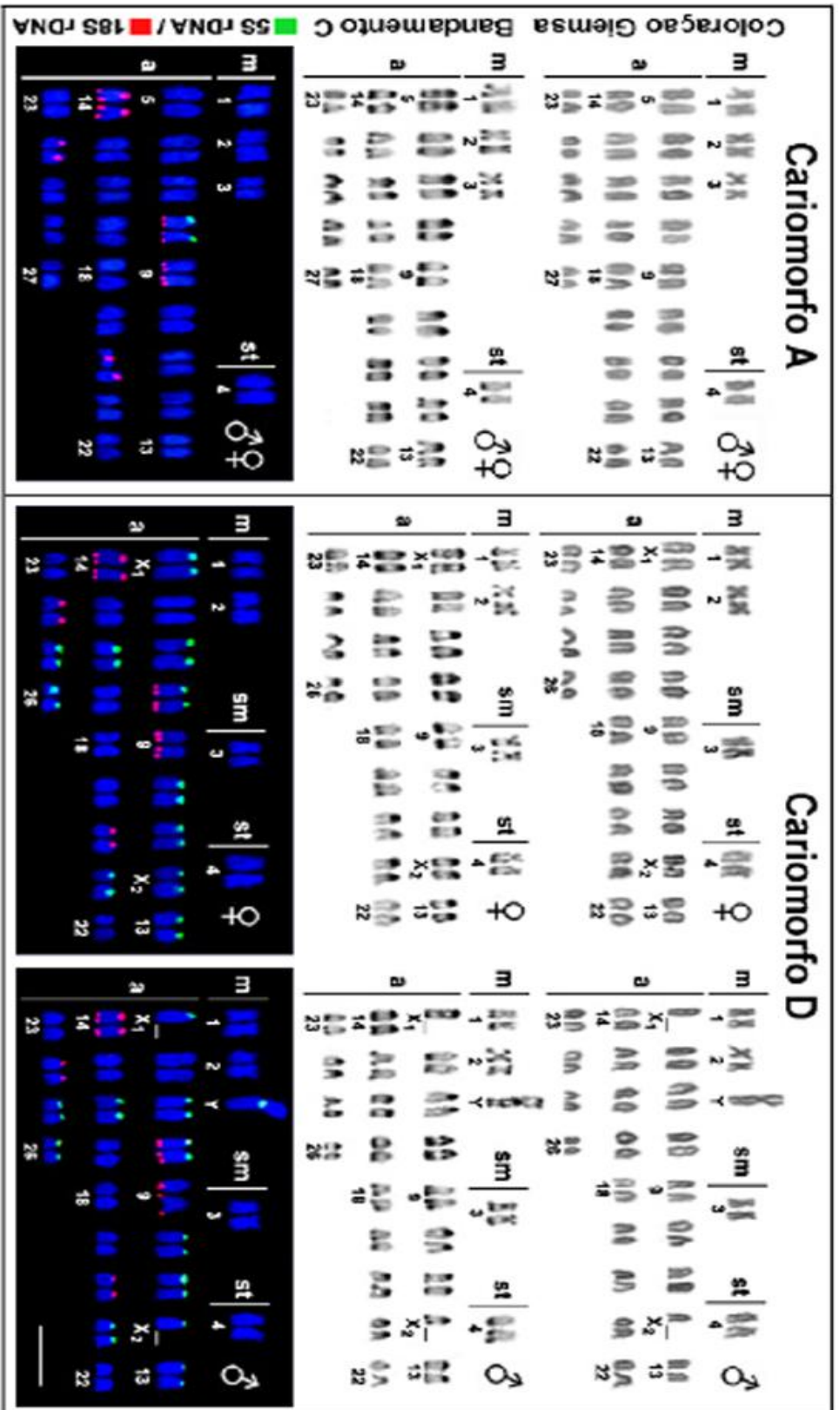
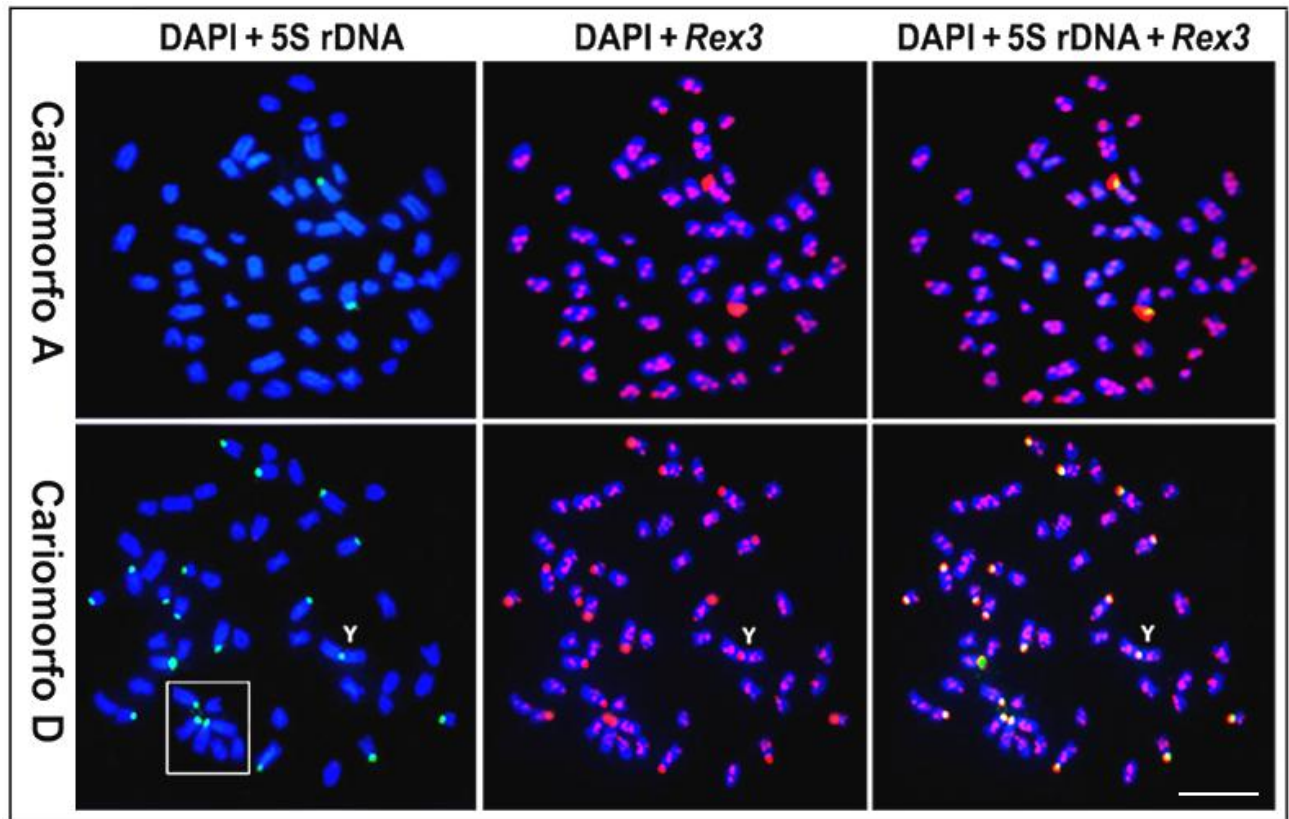
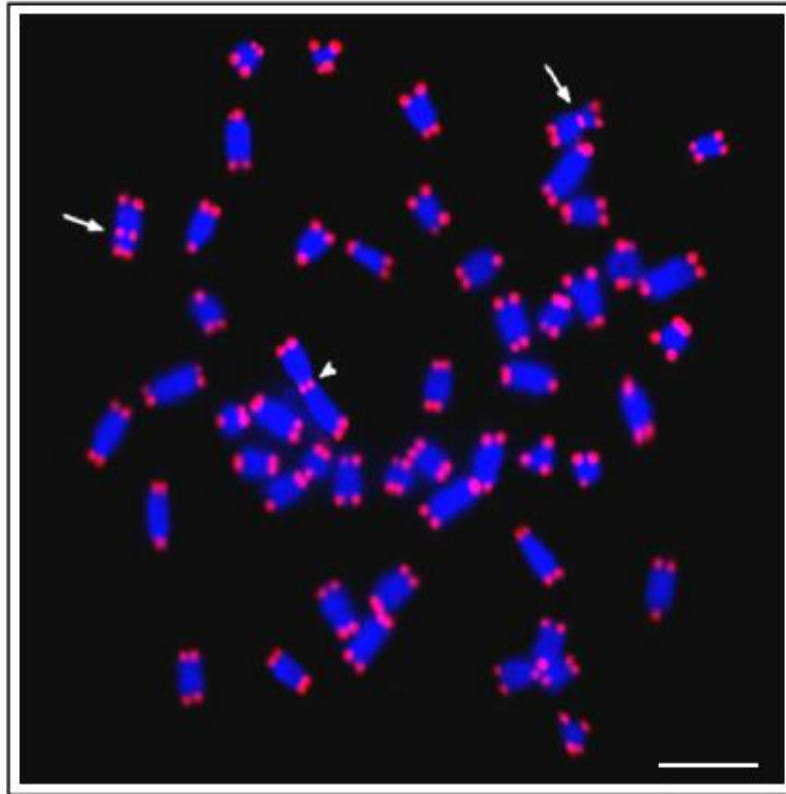


Figura 1. Cariótipos de machos e fêmeas de *Erythrinus erythrinus* (cariomorfos A e D) sob diferentes análises citogenéticas. Os cariótipos, organizados por coloração sequencial com Giemsa e bandaamento-C, foram hidridizados com seqüências de DNAr 5S e 18S, após dupla-FISH. Observar o aumento significativo de sítios de DNAr 5S no cariomorfo D. m, cromossomos metacêntricos; sm, cromossomos submetacêntricos; st, cromossomos subteloicêntricos; a, cromossomos acrocêntricos. Barra = 5 μm.

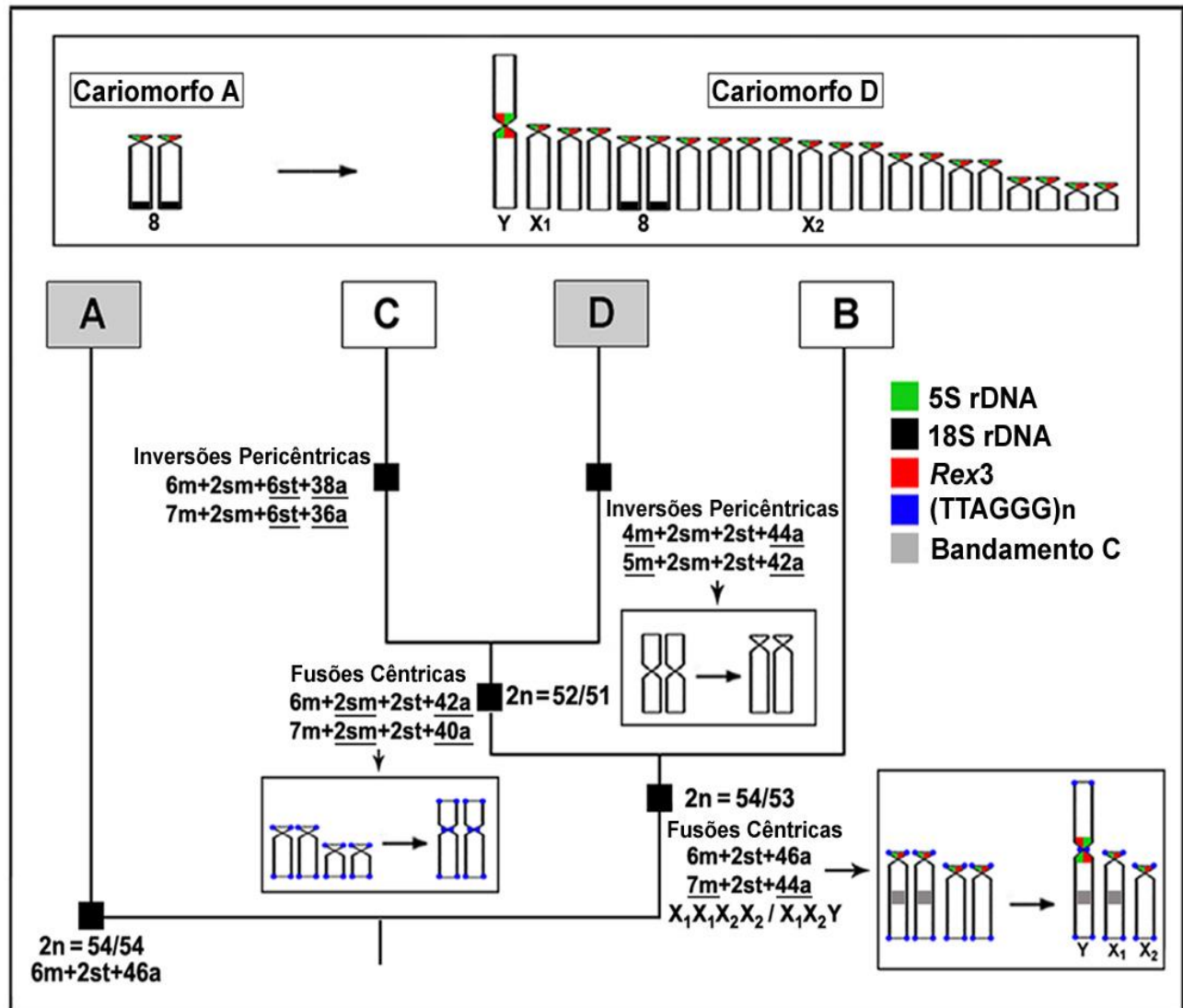
Figuras



1 **Figura 2.** Metáfases dos cariomorfos A e D de *Erythrinus erythrinus* mostrando a localização
2 do DNAr 5S e do retroelemento *Rex3* nos cromossomos, com o emprego de dupla-FISH.
3 Observar o padrão intersticial disperso de *Rex3* em ambos os cariomorfos e sua co-localização
4 com o DNAr 5S na região centromérica dos cromossomos. A caixa indica a clara associação de
5 alguns cromossomos acrocêntricos, que foi vista em quase todas as preparações
6 cromossômicas. O cromossomo Y está sendo indicado. Barra = 5 μ m.



1 **Figura 3.** Metáfase de um macho de *Erythrinus erythrinus*, cariomorfo D, mostrando a
2 localização das seqüências teloméricas em ambos os telômeros dos cromossomos. Além disso,
3 ITS foram encontrados na região centromérica do único par submetacêntrico do cariótipo
4 (setas) e do grande cromossomo Y metacêntrico (cabeça de seta). Bar = 5 μ m.



1 **Figura 4.** Visão geral da evolução cariotípica proposta para os cariomorfos A-D de *Erythrinus*
 2 *erythrinus*, com base em suas características cariotípicas e os resultados de mapeamento por
 3 FISH para os cariomorfos A e D. As principais alterações cromossômicas, à partir de um
 4 provável cariótipo basal (2n=54; 6m+2st+46a) estão sublinhadas. A figura acima ilustra o
 5 esquema da distribuição cromossômica de DNAr 18S e das seqüências DNAr 5S /Rex3 no
 6 carioformo A e a expansão na distribuição das seqüências DNAr 5S/Rex3 no carioformo D,
 7 incluindo o cromossomo Y, o X₁ e o provável X₂. As diferentes cores representam as sondas
 8 utilizadas nas análises de FISH.

Capítulo 2

Distribuição cromossômica de microssatélites no genoma do peixe *Hoplias malabaricus*, com enfoque nos cromossomos sexuais

Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC
Cytogenetic and Genome Research 132:289-296 (2011)

Resumo

1 Foi estudado o mapeamento físico, por hibridização fluorescente *in situ* (FISH), de doze
2 microssatélites mono-, di- e trinucleotídeos, nos cromossomos de dois cariomorfos (B e D)
3 do peixe *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecido como traíra. Enquanto que o
4 cariomorfo B apresenta um sistema de cromossomos sexuais simples (XX/XY), o
5 cariomorfo D apresenta um sistema múltiplo ($X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$). Os padrões de
6 distribuição de diferentes microssatélites ao longo dos cromossomos variaram
7 consideravelmente. Sinais fortes de hibridização foram observados nas regiões
8 subteloméricas e heterocromáticas de diversos autossomos, com um acúmulo diferencial
9 nos cromossomos sexuais. Um grande acúmulo foi encontrado na região heterocromática
10 do cromossomo X do cariomorfo B, enquanto que, microssatélites foram mapeados
11 preferencialmente em ambos os centrômeros dos cromossomos X, bem como nas regiões
12 correspondentes do cromossomo neo-Y do cariomorfo D. Nossos resultados corroboram os
13 modelos que prevêem o acúmulo de seqüências repetitivas de DNA em regiões de
14 recombinação reduzida. Este processo mostra-se, no entanto, contrastante com o observado
15 em sistemas múltiplos, onde a redução da recombinação deve ter sido facilitada pelos
16 rearranjos cromossômicos diretamente associados com a origem deste tipo de sistemas.

1 **Introdução**

2 Os peixes representam um excelente modelo para a análise evolutiva dos cromossomos
3 sexuais, considerando a ausência de cromossomos sexuais diferenciados na maioria das
4 espécies, juntamente com a presença de distintos sistemas de cromossomos sexuais neste
5 grupo, o que contrasta com a estabilidade dos sistemas de cromossomos sexuais presente nos
6 vertebrados superiores. Curiosamente, as seqüências de DNAs repetitivos acumularam-se
7 diferencialmente nos cromossomos sexuais dos peixes comparativamente ao encontrado nos
8 autossomos, evidenciando assim o papel potencial dessas seqüências na diferenciação dos
9 cromossomos sexuais de peixes (Nanda et al. 1990; Martins, 2007 ; Cioffi et al. 2010a).

10 *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), é um peixe de água doce Neotropical que apresenta
11 uma diversidade cariotípica notável, caracterizada pela presença de sete cariomorfos bem
12 diferenciados (Bertollo et al. 2000). Quatro sistemas de cromossomos sexuais ocorrem nesta
13 espécie nominal, ou seja, XX/XY (cariomorfo B), $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (cariomorfo D),
14 XX/XY_1Y_2 (cariomorfo G), além de um sistema XX/XY em estágio inicial de diferenciação
15 (cariomorfo C) (Bertollo et al. 2000; Cioffi & Bertollo, 2010). No cariomorfo B ($2n = 42$), o
16 sistema XX/XY é caracterizado por um cromossomo X subtlocêntrico de tamanho médio e
17 por um cromossomo Y pequeno, o menor submetacêntrico no cariótipo. Neste cariomorfo a
18 diferenciação dos cromossomos sexuais ocorreu pelo acúmulo de seqüências repetitivas de
19 DNA, com um enriquecimento incomum dessas seqüências no cromossomo X (Born &
20 Bertollo, 2000; Cioffi et al. 2010a). Por outro lado, o cariomorfo D ($2n = 40$ fêmeas/ $2n = 39$
21 machos) é caracterizado por um sistema de cromossomos sexuais múltiplos, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$.
22 Neste caso, o neo-cromossomo Y, específico dos machos, é um cromossomo submetacêntrico
23 grande, resultante da fusão em tandem de um cromossomo Y ancestral, de tamanho médio, com

1 um pequeno autossomo submetacêntrico (Bertollo et al. 1997). Da mesma forma, algumas
2 seqüências repetitivas de DNA mostram-se associadas com a diferenciação deste sistema de
3 cromossomos sexuais (Cioffi & Bertollo, 2010).

4 Neste trabalho, foi caracterizada a distribuição cromossômica de diferentes classes de
5 microssatélites no genoma dos cariomorfos B e D de *H. malabaricus*, com destaque para a
6 distribuição nos cromossomos sexuais.

7 **Materiais e Métodos**

8 Doze machos de *H. malabaricus* pertencentes ao cariomorfo B, e onze machos
9 pertencentes ao cariomorfo D, foram coletados na bacia do rio Doce (Parque Estadual do Rio
10 Doce, Estado de Minas Gerais, Brasil) no córrego Monjolinho (Reservatório da UFSCar,
11 Estado de São Paulo, Brasil), respectivamente. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a
12 partir de suspensões celulares do rim anterior, usando o método convencional de secagem ao ar
13 (Bertollo et al. 1978).

14 Experimentos de hibridização fluorescente em *in situ* foram realizados conforme descrito
15 por Kubat et al. (2008), com pequenas modificações. Nós utilizamos os seguintes
16 oligonucleotídeos como sondas: d(GA)₁₅, d(CA)₁₅, d(C)₃₀, d(CAC)₁₀, d(GC)₁₅, d(CAA)₁₀,
17 d(A)₃₀, d(CAG)₁₀, d(CAT)₁₀, d(GAG)₁₀, d(TAA)₁₀ e d(CGG)₁₀. Essas seqüências foram
18 marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, por VBC-Biotech (Viena,
19 Áustria). Devido ao tamanho reduzido das seqüências dos microssatélites utilizadas, foram
20 aplicadas condições de baixa exstringência em nossos experimentos de FISH. As condições
21 empregadas foram otimizadas para a obtenção de sinais específicos e reprodutíveis para todas
22 as sondas de microssatélites, apesar da sua diferente composição e temperatura de “melting”.
23 Quando utilizamos lavagens pós-hibridação mais rigorosas do que normalmente usamos em

1 nossos experimentos de FISH (0.1xSSC, 42°C, Lengerova et al. 2004), nenhum sinal foi
2 observado, enquanto que em condições de menor estringência ou de não lavagens muitos sinais
3 inespecíficos foram observados (dados não mostrados). A sonda desnaturada (500ng de DNA)
4 foi aplicada sobre a lâmina, coberta com uma lamínula de plástico, e hibridizadas por 18 horas
5 a 37°C. As lâminas foram então lavadas em temperatura ambiente, duas vezes por 5 min. em 2x
6 SSC, e uma vez por 1 min. em PBS 1x. As lâminas foram analisadas utilizando um
7 microscópio Olympus Provis e a análise de imagens foi realizada utilizando o software ISIS
8 (Metasystems).

9 **Resultados**

10 Nós estudamos a distribuição cromossômica de diferentes microssatélites nos cariomorfo
11 B e D de *Hoplias malabaricus*, usando hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Foram
12 utilizados os seguintes oligonucleotídeos marcados - d(A)₃₀, d(C)₃₀, d(CA)₁₅, d(GA)₁₅, d(GC)₁₅,
13 d(CAA)₁₀, d(CAG)₁₀, d(CGG)₁₀, d(CAC)₁₀, d(CAT)₁₀, d(GAG)₁₀, d(TAA)₁₀. Um padrão
14 discreto de bandas foi observado para alguns microssatélites, enquanto outros foram
15 uniformemente distribuídos ao longo dos cromossomos. Em geral, um mesmo padrão de
16 distribuição foi encontrado nos autossomos de ambos os cariomorfos, considerando a
17 distribuição de um dado microssatélite. No entanto, os cromossomos sexuais demonstraram um
18 notável acúmulo de vários microssatélites, normalmente localizado em suas regiões
19 heterocromáticas.

20 Distribuição cromossômica de microssatélites nos autossomos

21 As sondas d(GA)₁₅, d(CA)₁₅, d(C)₃₀, d(GC)₁₅ e d(CAA)₁₀, forneceram um rico padrão de
22 bandas na região subtelomérica da maioria dos cromossomos, com alguns sinais mais fortes e

1 dispersos do que outros. Os microssatélites $d(A)_{30}$ e $d(TAA)_{10}$ promoveram fortes sinais
2 dispersos em toda a extensão de todos os cromossomos, destacando a sua presença dispersa no
3 genoma de *H. malabaricus*. No entanto, algumas bandas específicas altamente repetitivas
4 foram características de alguns pares de cromossomos, onde a maioria das sondas foram mais
5 ou menos clusterizadas em torno das regiões subteloméricas, enquanto outras apresentaram
6 uma localização centromérica. Particularmente, houve uma notável diferença no padrão de
7 hibridização da sonda $d(CGG)_{10}$ entre os cariomorfos B e D. Esta sonda mostrou um padrão de
8 distribuição disperso em todos os autossomos do cariomorfo B e um acúmulo notável nas
9 regiões subteloméricas de quase todos os cromossomos do cariomorfo D. Os microssatélites
10 trinucleotídicos $d(CAC)_{10}$, $d(CAG)_{10}$, $d(CAT)_{10}$ e $d(GAG)_{10}$ produziram um padrão de
11 distribuição disperso e, portanto, mais espalhados ao longo dos cromossomos. Entre eles,
12 $d(CAG)_{10}$ apresentou o menor número de sinais de hibridização, sobretudo no cariomorfo D,
13 com alguns sinais fracos nas regiões heterocromáticas de apenas alguns cromossomos (**Figuras**
14 **1 e 2**).

15 *Distribuição cromossômica de microssatélites nos cromossomos sexuais*

16 O tamanho dos cromossomos X e Y do cariomorfo B diferem significativamente devido a
17 um acúmulo da heterocromatina localizado no braço longo do cromossomo X.
18 Concordantemente, este cromossomo mostrou uma forte concentração da maioria dos
19 microssatélites nesse conspícuo bloco heterocromático, ao contrário do padrão encontrado para
20 o cromossomo Y. Os microssatélites $d(C)_{30}$, $d(A)_{30}$, $d(GAG)_{10}$, e $d(CGG)_{10}$ apresentaram o
21 maior acúmulo, enquanto $d(GA)_{15}$, $d(CA)_{15}$ e $d(TAA)_{10}$ apresentaram apenas um ligeiro
22 acúmulo no cromossomo X. Além disso, os microssatélites $d(CAC)_{10}$, $d(GC)_{15}$, $d(CAA)_{10}$,
23 $d(CAG)_{10}$ e $d(CAT)_{10}$ foram distribuídos uniformemente ao longo deste cromossomo, com

1 apenas alguns sinais fracos nas áreas heterocromáticas. A maioria dos microssatélites no
2 cromossomo Y foi ligeiramente acumulada nas regiões de heterocromatina centromérica e/ou
3 telomérica. Novamente, as seqüências d(C)₃₀, d(A)₃₀, d(GAG)₁₀, e d(CGG)₁₀ apresentaram um
4 maior acúmulo na região telomérica deste cromossomo (**Figura 1**).

5 Curiosamente, o padrão de hibridização encontrado para os cromossomos X₁, X₂ e neo-Y
6 do cariomorfo D foi muito diferente daquele encontrado para os cromossomos X e Y do
7 cariomorfo B. Vários microssatélites, inclusive d(CA)₁₅, d(GA)₁₅, d(C)₃₀, d(GC)₁₅, d(GAG)₁₀ e
8 d(TAA)₁₀, mostraram graus de acumulação variáveis ao longo do cromossomo neo-Y. Dado
9 que o cromossomo neo-Y foi originado a partir de um evento de fusão em tandem, envolvendo
10 os homólogos ancestrais dos cromossomos X₁ e X₂, não é surpreendente que o mesmo padrão
11 geral de distribuição dos microssatélites tenha sido encontrado nas regiões correspondentes
12 destes cromossomos. As repetições d(CAG)₁₀ apresentaram o menor acúmulo em todos os
13 cromossomos sexuais. As repetições d(CA)₁₅, d(C)₃₀, d(A)₃₀, d(CAT)₁₀ e d(CGG)₁₀ foram
14 abundantes apenas na região centromérica dos cromossomos X₁ e neo-Y. O microssatélite mais
15 acumulado foi o d(C)₃₀, encontrado no cromossomo X₂ e na região correspondente do neo-Y
16 (segmento final do braço longo). Da mesma forma, os microssatélites d(GA)₁₅, d(CAC)₁₀,
17 d(TAA)₁₀ e d(CGG)₁₀ foram abundantes no braço longo do X₁ e na região correspondente
18 (braço curto) do cromossomo neo- Y (**Figura 2**). A **Figura 3** evidencia um ideograma
19 resumindo a distribuição global de todos os microssatélites nos cromossomos sexuais.

20 **Discussão**

21 Distribuição cromossômica dos microssatélites nos autossomos

22 No presente estudo, nós utilizamos hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para analisar a
23 distribuição de diferentes microssatélites no genoma de dois cariomorfos (B e D), do peixe *H.*

1 *malabaricus*. Todas as sondas que usamos geraram sinais evidentes nas regiões eucromáticas e
2 heterocromáticas dos cromossomos, mas preferencialmente localizados nos segmentos
3 heterocromáticos. Um grande acúmulo dos microssatélites d(GA)₁₅, d(CA)₁₅, d(C)₃₀, d(GC)₁₅
4 d(CAA)₁₀, d(A)₃₀ e d(TAA)₁₀ foi encontrado no genoma de ambos os cariomorfos,
5 especialmente nas regiões subteloméricas. Alguns destes microssatélites já foram também
6 detectados em condições de acúmulo em outras espécies de peixes. Por exemplo, os peixes
7 Siluriformes, *Imparfinis schubarti* (Heptapteridae), *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae) e
8 *Rineloricaria latirostris* (Loricariidae), apresentaram um acúmulo notável de ambos os
9 microssatélites d(GA)₁₅ e d(A)₃₀ em regiões teloméricas dos cromossomos (Vanzela et al.
10 2002). Além disso, em *Danio rerio* (zebrafish) as repetições d(CA)₁₅ e d(GC)₁₅ foram
11 preferencialmente localizadas em regiões centroméricas e teloméricas (Shimoda et al. 1999).
12 Esse acúmulo preferencial em locais específicos pode indicar regiões cromossômicas onde os
13 microssatélites estão presentes como arranjos bastante perfeitos ou degenerados. A comparação
14 da evolução de microssatélites entre vários grupos taxonômicos poderiam melhor elucidar os
15 processos relacionados às diferenças na dinâmica de seus genomas (Kejnovsky et al. 2009a).

16 Os padrões de distribuição geral de microssatélites não indicaram um modo universal de
17 evolução comum para ambos os cariomorfos de *H. malabaricus*. Os microssatélites diferiram
18 drasticamente em suas concentrações genômicas, sugerindo que as repetições mais abundantes
19 podem desempenhar um papel significativo na geração da diversidade genética de *H.*
20 *malabaricus*. Além disso, os padrões de distribuição de alguns microssatélites, tais como
21 d(CAG)₁₀, d(CAC)₁₀, d(CGG)₁₀, d(C)₃₀ e d(CAT)₁₀, foram distintos entre os cariomorfos B e D,
22 indicando que eles podem também contribuir para a diferenciação genética entre as distintas
23 formas cariotípicas deste grupo de peixes.

1 *Distribuição cromossômica de microssatélites nos cromossomos sexuais*

2 No presente estudo foi dado um enfoque particular para o padrão de distribuição dos
3 microssatélites nos cromossomos sexuais. Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que
4 esta abordagem foi direcionada entre os peixes.

5 Uma análise comparativa revelou que no cariomorfo B, as regiões heterocromáticas
6 correspondentes dos cromossomos X e Y têm padrões relativamente similares de distribuição
7 dos microssatélites. Dados anteriores também mostraram a presença de diferentes seqüências
8 repetitivas de DNA mapeadas sobre esses cromossomos, como um sítio do satélite 5S*Hind*III-
9 DNA na região centromérica, bem como uma concentração da seqüência (GATA)_n na região
10 proximal do braço longo de ambos os cromossomos X e Y (Cioffi et al. 2010a). Diferentes
11 microssatélites foram acumulados na região heterocromática do cromossomo X, reforçando
12 nossa proposta anterior de que esse cromossomo acumula mais DNAs repetitivos do que o
13 cromossomo Y (Cioffi et al. 2010a), sugerindo o seu provável envolvimento na diferenciação
14 deste cromossomo.

15 Entre os peixes, um processo de heterocromatinização mostra-se comumente associado
16 com a diferenciação dos sistemas ZW e XY de cromossomos sexuais (Galetti Jr. & Foresti,
17 1996; Moreira-Filho et al. 1993; Artoni et al. 2001; Almeida-Toledo et al. 2000). Da mesma
18 forma, no cariomorfo B de *H. malabaricus*, um aumento no conteúdo de heterocromatina
19 conduziu à diferenciação do cromossomo X e contribuiu para o aumento de seu tamanho em
20 comparação com o cromossomo Y. Os sistemas simples de cromossomos sexuais originam-se a
21 partir da supressão da recombinação entre os membros de um par de autossomos e da gradual
22 divergência entre si (Ohno, 1967). Conseqüentemente, ocorre a degeneração de genes e o
23 acúmulo de seqüências repetitivas de DNA nessas regiões não-recombinantes (Charlesworth et

1 al. 2005; Bergero & Charlesworth, 2009). À medida que os microssatélites acumularam nas
2 regiões de heterocromatina do cromossomo X, antes da expansão recente do genoma, eles
3 poderiam desencadear a divergência evolutiva dos cromossomos X e Y e, posteriormente, ter
4 aumentado o tamanho do cromossomo X.

5 Ao contrário do cariomorfo B, o sistema de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y ,
6 encontrado no cariomorfo D, foi originado a partir da fusão em tandem de um cromossomo Y
7 em estágio inicial de diferenciação e um autossomo. Embora também tenha sido verificada a
8 associação de várias seqüências repetitivas de DNA com a diferenciação deste sistema, não
9 houve acúmulo detectável de heterocromatina nos cromossomos sexuais, ao contrário do que
10 ocorre no cariomorfo B (Cioffi & Bertollo, 2010). Portanto, a estabilidade do mecanismo
11 cromossômico de determinação do sexo no cariomorfo D depende da segregação alternada dos
12 cromossomas X_1 e X_2 em relação ao cromossomo neo-Y, a partir do trivalente meiótico. Na
13 verdade, isso é evidente neste cariomorfo uma vez que frequências semelhantes dos dois tipos
14 de espermatócitos ($n = 20, X_1X_2$; $n = 19, \text{neo-Y}$) são produzidos durante a meiose (Bertollo &
15 Mestriner, 1998). Assim, a diferenciação de sistemas múltiplos é resultante dos rearranjos
16 cromossômicos ocorridos durante a sua própria origem. Além disso, a heterocromatina que está
17 presente nos cromossomos sexuais é "pré-existente", o que significa que não há um aumento
18 significativo na quantidade de heterocromatina, diferentemente do que ocorre em outros
19 sistemas sexuais, como XY e ZW. Os rearranjos cromossômicos ocorridos em sistemas sexuais
20 múltiplos podem, por si só, reduzir ou suprimir a recombinação em locais próximos a pontos de
21 quebra (Vieira et al. 2003), sugerindo a não necessidade de outros eventos para desencadear
22 esse processo. Este modelo pode também explicar por que quase todos os microssatélites
23 mapeados no cromossomo neo-Y têm aproximadamente o mesmo padrão de distribuição das

1 regiões cromossômicas correspondentes dos cromossomos X_1 e X_2 (**Figura 3**). Apesar desta
2 semelhança, foi observado que alguns microssatélites apresentaram um padrão um pouco
3 diferenciado como, por exemplo, as repetições $d(C)_{30}$ e $d(GA)_{15}$ que estão acumuladas no braço
4 longo do cromossomo neo-Y, indicando a ocorrência de certo grau de diferenciação a partir do
5 homólogo ancestral do cromossomo X_2 (**Figuras 2 e 3**).

6 É possível que o acúmulo de microssatélites desempenhe um papel importante na
7 evolução dos cromossomos sexuais. Este fato poderia ser uma consequência de sua capacidade
8 de adotar conformações incomuns de DNA, incluindo “hairpins”, “triplex”, “tetraplex” ou
9 “sticky DNA” (Kejnovska et al., 2003, Wells et al., 2005, Sakamoto et al., 1999). Interações
10 potenciais de “sticky DNA” podem reunir regiões distantes do mesmo cromossomo, facilitando
11 assim processos baseados em recombinação, como conversão gênica. Na verdade, o papel da
12 conversão gênica na formação de grandes palíndromos e a proteção dos genes localizados no
13 cromossomo Y tem sido demonstrados em humanos (Skaletsky et al. 2003). Da mesma forma,
14 o processo de conversão gênica foi sugerido como um mecanismo de homogeneização de
15 elementos transponíveis localizados no cromossomo Y (Kejnovsky et al. 2007). As
16 conformações “Non-B” de DNA, adotadas pelos microssatélites, podem servir como pontos de
17 quebra para grandes rearranjos, tais como inversões, as quais são consideradas tendo um papel
18 chave na evolução dos cromossomos sexuais (Kejnovsky et al. 2009b).

19 A supressão de recombinação é um pré-requisito para a estabilidade de sistemas sexuais
20 determinados geneticamente. Portanto, a acumulação maciça de seqüências repetitivas,
21 incluindo microssatélites, geralmente ocorre em regiões não-recombinantes. Desta forma,
22 nossos resultados estão de acordo com os modelos que prevêm um acúmulo de seqüências
23 repetitivas de DNA em regiões com recombinação muito reduzida, como perto de centrômeros

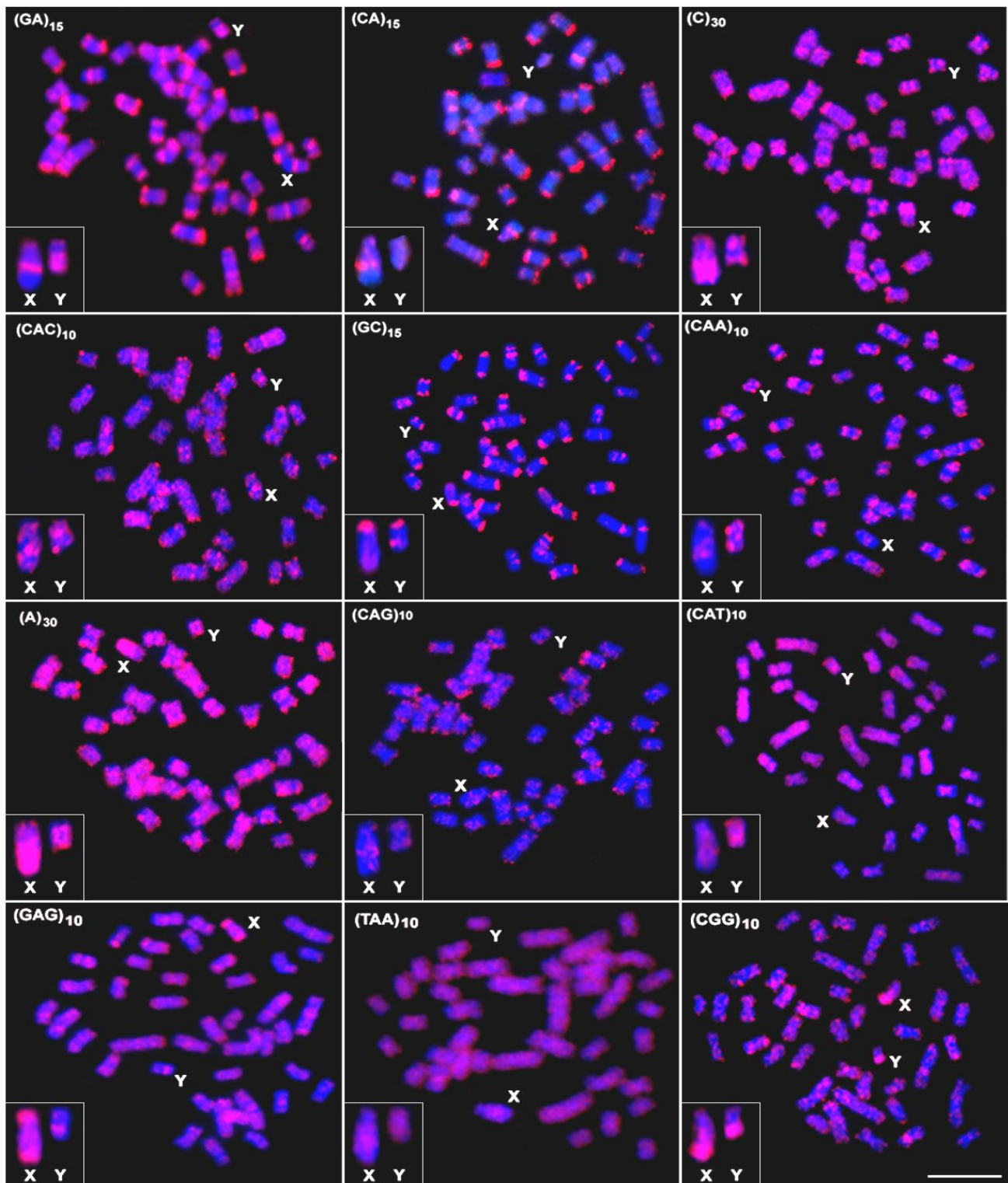
1 e telômeros, onde os satélites são normalmente acumulados, formando as partes
2 heterocromáticas dos cromossomos (Charlesworth et al. 1994; Stephan & Cho, 1994).

3 Em resumo, nós ilustramos um cenário comparativo quanto à distribuição de
4 microssatélites em dois sistemas distintos de cromossomos sexuais de peixes, um sistema
5 simples XY e um múltiplo X_1X_2Y . Nós também demonstramos o provável envolvimento de
6 tais seqüências na origem e diferenciação dos cromossomos sexuais. Nós propusemos que a
7 distribuição diferencial dos microssatélites ao longo dos cromossomos, em ambos os sistemas,
8 é um reflexo direto dos seus modos de origem. Portanto, o acúmulo de seqüências repetitivas
9 parece ser importante em sistemas XY, talvez representando um passo inicial para reduzir a
10 recombinação entre os dois cromossomos ancestrais indiferenciados. No cariomorfo B de *H.*
11 *malabaricus* (sistema XY) os microssatélites acumularam-se no grande bloco heterocromático
12 do cromossomo X, enquanto, por exemplo, na planta dióica *Silene latifolia* (sistema XY em
13 estágio inicial de diferenciação) os microssatélites são preferencialmente concentrados no
14 cromossomo Y (Kubat et al. 2008). Já no cariomorfo D de *H. malabaricus* (sistema X_1X_2Y) a
15 distribuição dos microssatélites no neo-cromossomo Y reflete a sua origem a partir de dois
16 cromossomos progenitores. Assim, vários processos determinando o dinamismo dos
17 microssatélites na evolução dos cromossomos sexuais podem estar em ação, incluindo a
18 acumulação de DNAs repetitivos tanto em regiões não-recombinantes ou heterocromáticas dos
19 cromossomos sexuais e amplos rearranjos cromossômicos que originaram os sistemas múltiplos
20 de cromossomos sexuais.

21 **Referencias Bibliográficas**

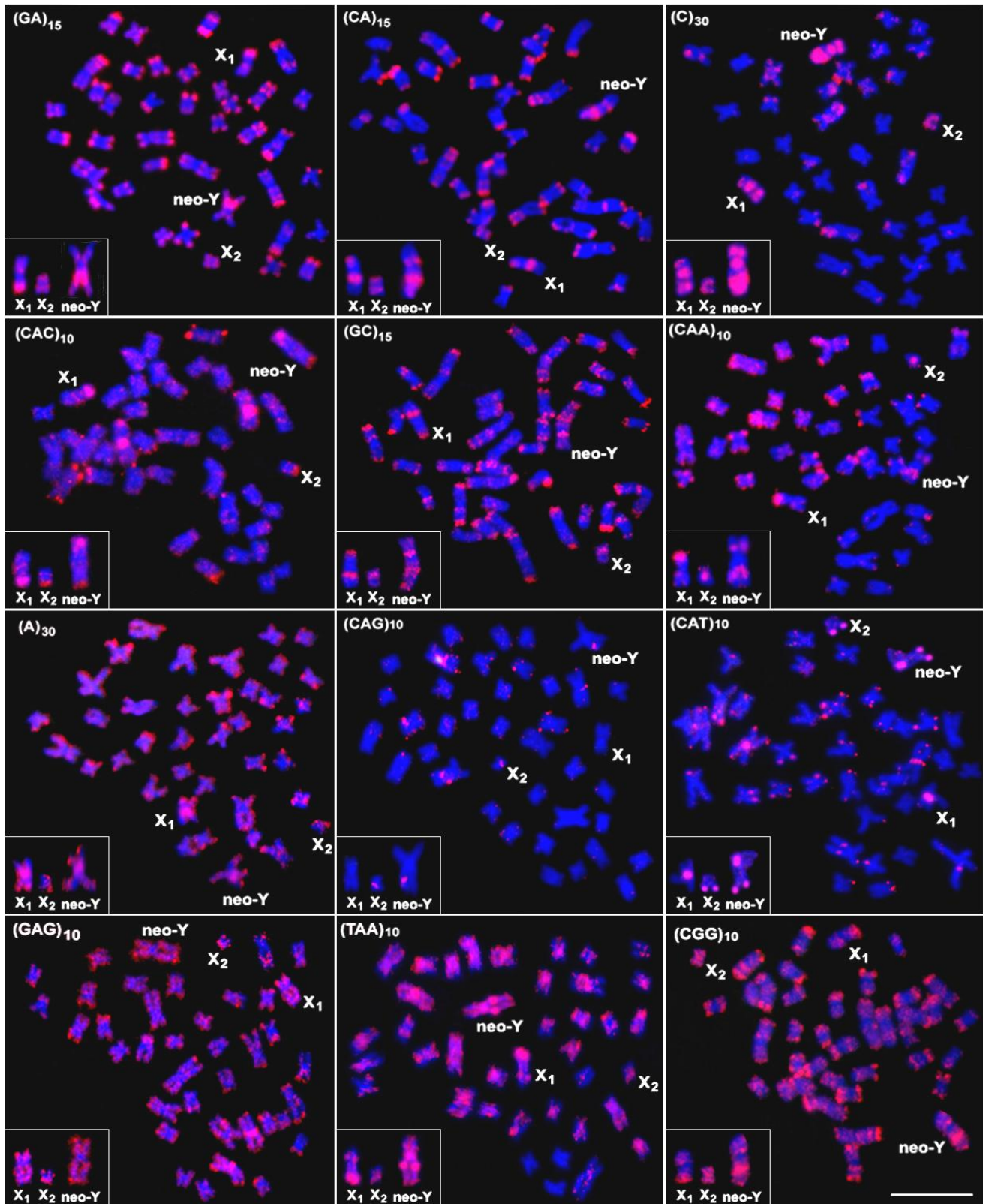
22 As referencias bibliográficas deste Capítulo encontram-se reunidas ao final desta tese.

Figuras



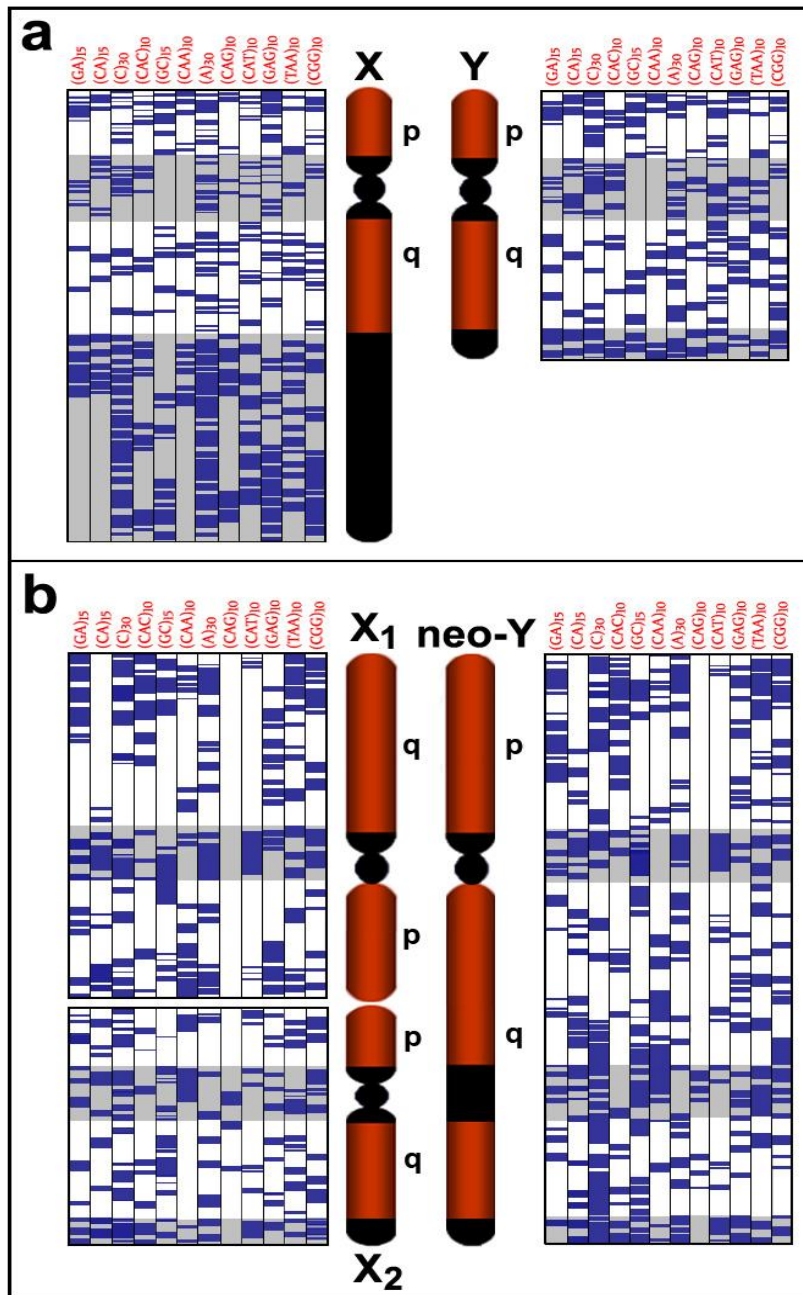
(Legenda na próxima página)

- 1 **Figura 1.** Cromossomos metafásicos mitóticos de machos de *Hoplias malabaricus*
- 2 (cariomorfoB) com um sistema de cromossomos sexuais XY, hibridizados com diferentes
- 3 microssatélites. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (azul) e as sondas de
- 4 microssatélites foram diretamente marcadas com Cy3 durante a síntese (sinais vermelhos). Os
- 5 cromossomos X e Y estão indicados e ampliados nos detalhes. Barra = 5 μ m.



(Legenda na próxima página)

- 1 **Figura 2.** Cromossomos metafásicos mitóticos de machos de *Hoplias malabaricus*
- 2 (cariomorfo D) com um sistema de cromossomos sexuais X_1X_2Y , hibridizados com diferentes
- 3 microssatélites. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (azul) e as sondas de
- 4 microssatélites foram diretamente marcadas com Cy3 durante a síntese (sinais vermelhos). Os
- 5 cromossomos X_1 , X_2 , e neo- Y estão indicados e ampliados nos detalhes. Barra = 5 μm .



1 **Figura 3.** Mapa esquemático dos cromossomos sexuais de *Hoplias malabaricus*, destacando os
 2 padrões de distribuição de microssatélites, a partir de dados de FISH. (a) cromossomos X e Y
 3 do cariomorfo B e (b) cromossomos X₁, X₂ e Y do cariomorfo D. Os segmentos em preto e as
 4 barras azuis representam as regiões heterocromáticas e os padrões de distribuição dos
 5 microssatélites nos cromossomos, respectivamente. Notar o acúmulo de microssatélites no
 6 cromossomo X do cariomorfo B, em contraste com a relativa ausência de acúmulo nos
 7 cromossomos sexuais do cariomorfo D. Este diagrama mostra a origem do braço longo do
 8 cromossomo neo-Y, resultante da fusão em tandem dos braços curtos de dois cromossomos
 9 semelhantes aos cromossomos X₁ e X₂.

Capítulo 3

DNAs Repetitivos e Diferenciação dos Cromossomos Sexuais em Peixes Neotropicais

Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC
Cytogenetic and Genome Research 132: 188-194 (2011)

Resumo

1 Os processos que atuam na diferenciação dos cromossomos sexuais ainda não estão
2 completamente esclarecidos. No entanto, tem sido demonstrado que o acúmulo de
3 seqüências repetitivas de DNA representa um dos primeiros passos nos estágios iniciais de
4 diferenciação dos cromossomos sexuais. Além disso, as regiões com recombinação
5 ausente ou suprimida têm uma tendência para acumular essas seqüências de DNA e, por
6 essa razão, a ausência de recombinação entre os cromossomos sexuais favorece, por si só,
7 o acúmulo de seqüências repetitivas sobre esses cromossomos durante a evolução. A
8 diversidade de mecanismos de determinação do sexo em peixes, somada à ausência de
9 cromossomos sexuais heteromórficos em muitas espécies, faz deste grupo um modelo útil
10 para compreender melhor os processos evolutivos dos cromossomos sexuais em
11 vertebrados, considerando que os peixes ocupam a posição basal na filogenia deste grupo.
12 Nesta revisão, nós destacamos o acúmulo preferencial e enriquecimento de DNAs
13 repetitivos em cromossomos sexuais de muitas espécies de peixes Neotropicais, em
14 comparação com os autossomos. Esse fenômeno tem sido observado tanto entre
15 cromossomos sexuais indiferenciados, bem como morfologicamente diferenciados,
16 evidenciando o papel dessas seqüências na diferenciação dos cromossomos sexuais dos
17 peixes, gerando diferenças na morfologia e tamanho desses cromossomos.

1 **Introdução**

2 Os DNAs repetitivos constituem uma grande fração do genoma dos eucariotos (Jurka et
3 al. 2005), incluindo satélites arranjados em tandem, minisatélites, microssatélites e elementos
4 dispersos, tais como os transposons e retrotransposons (Charlesworth et al. 1994). A
5 organização cromossômica dessas seqüências de DNA tem proporcionado novas perspectivas
6 para a compreensão e evolução do genoma e tem sido úteis para revelar o processo de
7 diferenciação dos cromossomos sexuais em muitas espécies de vertebrados.

8 Avanços nos estudos de seqüências de DNAs repetitivos não-codificantes têm mostrado
9 que estas seqüências desempenham um papel importante na organização estrutural e funcional
10 do genoma (Schueler et al. 2001; Biémont & Vieira, 2006). Uma clara correlação entre
11 cromossomos sexuais e os DNAs repetitivos têm sido evidenciada em vários estudos (Singh et
12 al. 1976; Nanda et al. 1990; Nishioka et al. 1993; Erlandsson et al. 2000; Schmid et al. 2002;
13 Vicente et al. 2003; Steinemann e Steinemann, 2005; Hobza et al. 2006; Marchal et al. 2006;
14 Matsubara et al. 2006; Vicari et al. 2008b; Kejnovsky et al. 2009a; Wang et al. 2009; Cioffi &
15 Bertollo, 2010a, b; Cioffi et al. 2010), indicando que a diferenciação dos cromossomos sexuais
16 está freqüentemente associada com o acúmulo de seqüências repetitivas de DNA nesses
17 cromossomos. É bem conhecido o fato de que DNAs repetitivos podem também ocorrer e se
18 acumulam nos autossomos de diversos organismos. Entretanto, os cromossomos sexuais são
19 locais preferidos para o acúmulo desses elementos, uma vez que este processo é favorecido
20 pela ausência ou baixa freqüência de recombinação nesses cromossomos (Charlesworth et al.
21 2005).

22 Postula-se que alterações estruturais e/ou mudanças no DNA devem ocorrer para a
23 diferenciação dos cromossomos sexuais, a fim de alcançar a supressão total ou parcial do

1 crossing-over entre os cromossomos ancestrais X e Y homomórficos (Ohno, 1967). Acredita-se
2 que o acúmulo de seqüências repetitivas, que resulta fundamentalmente de processos de
3 transposição e amplificação, tenha início nas proximidades da região sexo-determinante,
4 favorecida pela ausência ou baixa freqüência de recombinação nesta área. A supressão da
5 recombinação favorece o acúmulo de mutações gênicas, levando à deleção de genes
6 funcionalmente inativos bem como o acúmulo de seqüências de DNA repetitivo, gerando uma
7 diferenciação morfológica e de tamanho durante os primeiros estágios da evolução dos
8 cromossomos sexuais (Bull, 1983). Nesse sentido, o acúmulo de heterocromatina também
9 poderia levar a uma redução de recombinação entre os cromossomos sexuais. No entanto, se o
10 processo de heterocromatinização representa a causa ou a consequência de uma recombinação
11 reduzida é uma questão que continua a ser resolvida (Charlesworth et al. 1994).

12 Nos vertebrados superiores cromossomos sexuais diferenciados, assim como sistemas de
13 determinação do sexo relativamente estáveis, são encontrados na base da filogenia. Em
14 contraste, a maioria das espécies de peixes não apresenta cromossomos sexuais heteromórficos,
15 embora já tenham sido encontrados diferentes sistemas cromossômicos de determinação sexual
16 nesse grupo (Dettai et al. 2007). Isso faz deste grupo, o mais antigo entre os vertebrados, um
17 bom modelo para analisar a evolução da diferenciação dos cromossomos sexuais, uma vez que
18 este processo pode ser seguido desde a ausência de cromossomos sexuais até a sua presença,
19 através de vários estágios de diferenciação.

20 **O acúmulo de seqüências de DNA repetitivo nos cromossomos sexuais de peixes**

21 Alguns sistemas distintos de cromossomos sexuais diferenciados já foram encontrados
22 entre os peixes (Bertollo et al. 2000; Almeida-Toledo & Foresti, 2001; Devlin & Nagahama,
23 2002). Como em outros vertebrados, os cromossomos sexuais dos peixes podem também ser

1 enriquecidos com seqüências repetitivas de DNA (Martins, 2007), como mostrado pelo
2 isolamento e mapeamento de seqüências sexo-específicas neste grupo (Nanda et al. 1990;
3 Devlin et al. 1991; Capriglione et al. 1994; Nakayama et al. 1994;. Stein et al. 2001;. 2002;
4 Harvey et al. 2002;. Vicente et al. 2003; Ezaz et al. 2004; Parise-Maltempo et al. 2007; Wang et
5 al. 2009).

6 Embora a maioria dos peixes não apresente cromossomos sexuais diferenciados, a
7 presença desses cromossomos pode, em alguns casos, ser evidenciada por um acúmulo
8 diferencial de DNAs repetitivos. Isto é ilustrado em algumas espécies de Poeciliidae, onde os
9 cromossomos sexuais não podem ser identificados através da coloração convencional, mas
10 podem ser facilmente caracterizados por um bloco heterocromático diferencial, rico em
11 seqüências de DNA repetitivo, localizado na região telomérica dos cromossomos Y e W.
12 Apesar desta mesma região heterocromática estar presente nos cromossomos X e Z, ela se
13 apresenta mais reduzida, sugerindo que o acúmulo de DNAs repetitivos está relacionado com a
14 diferenciação inicial dos cromossomos sexuais (Nanda et al. 1990). Uma condição semelhante
15 também ocorre na enguia elétrica, *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo et al. 2001), onde
16 uma amplificação de segmentos heterocromáticos não foi encontrada no cromossomo Y, mas
17 apenas no cromossomo X.

18 A família Parodontidae, exclusivamente Neotropical, é caracterizada por uma grande
19 conservação cariotípica numérica, na qual todas as espécies apresentam $2n = 54$ cromossomos.
20 Enquanto algumas espécies aparentemente não apresentam cromossomos sexuais
21 diferenciados, outras têm um claro sistema sexual heteromórfico ZZ / ZW. Todas essas
22 espécies compartilham um mesmo processo de diferenciação dos cromossomos sexuais, pelo
23 aumento de segmentos heterocromáticos e o acúmulo de DNAs repetitivos no cromossomo W a

1 partir de um par homomórfico ancestral (Centofante et al. 2002;. Vicente et al. 2003;. Rosa et
2 al. 2006; Vicari et al. 2006). Uma família de DNA satélite, composta por uma unidade de 200
3 bp (pPh2004), foi isolada a partir do genoma de *Parodon hilarii*, pela restrição do DNA
4 genômico (Vicente et al. 2003). Análises de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) detectaram
5 a presença deste DNA satélite em ambos os cromossomos sexuais Z e W, bem como em alguns
6 outros autossomos.

7 Uma situação similar também ocorre em outro gênero Neotropical, *Leporinus*
8 (Anostomidae), onde um sistema de cromossomos sexuais ZZ / ZW é compartilhado por várias
9 espécies. Como na família Parodontidae, o cromossomo W é amplamente heterocromático e
10 enriquecido em seqüências repetitivas (Galetti Jr. et al. 1995;. Koehler et al. 1997; Molina et al.
11 1998). Particularmente em *L. elongatus*, três famílias de DNA satélite foram isoladas e
12 utilizadas como sondas para análise de FISH. Uma delas, denominada L5, foi encontrada em
13 ambos os cromossomos Z e W, enquanto que a segunda família, denominada L46, foi
14 específica para o cromossomo W (Nakayama et al. 1994). A terceira, LeSpeI, foi um elemento
15 repetitivo sexo-específico disperso, mostrando padrões distintos de distribuição exclusivamente
16 em dois cromossomos (W1 e W2) das fêmeas. Assim, foi sugerido que ao invés de um sistema
17 ZZ/ZW de cromossomos sexuais, esta espécie poderia apresentar um sistema de cromossomos
18 sexuais múltiplos do tipo $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$, onde ambos os cromossomos Z_2 e W_2 são
19 também portadores de RONS (Parise-Maltempo et al. 2007).

20 *Characidium* (Crenuchidae) e *Triportheus* (Characidae) são gêneros Neotropicais bem
21 analisados, portadores de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW.
22 Diferenças notáveis ocorrem em relação ao tamanho e a morfologia dos cromossomos Z e W
23 entre as espécies de *Characidium* onde, além de deleções e/ou inversões, a

1 heterocromatinização parece ter desempenhado um papel relevante na diferenciação do
2 cromossomo W, o qual podem se mostra totalmente heterocromáticos (Vicari et al. 2008a).
3 Situação semelhante é encontrada no gênero *Triportheus*, o sistema ZW parece caracterizar
4 uma condição sinapomórfica exclusiva entre os componentes da grande família Characidae
5 (Artoni et al. 2001; Diniz et al. 2008). No entanto, neste caso, enquanto o cromossomo Z é
6 muito conservado, o cromossomo W apresenta uma grande diferenciação morfológica entre as
7 espécies e populações. Uma sonda do cromossomo Z de *T. nematurus* foi obtida por
8 microdissecção e usada para análises de FISH em outras espécies de *Triportheus*. Uma
9 completa homologia foi encontrada entre os cromossomos Z, enquanto que apenas pequenos
10 sinais positivos foram encontrados nos cromossomos W. Além da redução de tamanho, os
11 cromossomos W sofreram mudanças acentuadas em sua composição em relação aos
12 cromossomos Z, uma vez que apenas uma pequena região, geralmente localizada no braço
13 curto, manteve homologia com os cromossomos Z (Diniz et al. 2008).

14 Elementos transponíveis, os quais são esperados ocorrer em abundância nas regiões
15 cromossômicas onde a recombinação é reduzida, também podem ser acumulados nos
16 cromossomos sexuais (Charlesworth et al. 1994). Vários relatos referem-se à acumulação de
17 retroelementos nos cromossomos sexuais de diferentes táxons (Steinemann & Steinemann,
18 1992; Erlandsson et al. 2000; Abe et al. 2002; Rohr et al. 2002; Marchal et al. 2006, Cermak et
19 al. 2008). O grande acúmulo de elementos transponíveis interfere fortemente na atividade dos
20 genes e este é um passo importante na morfogênese dos cromossomos sexuais (Steinemann &
21 Steinemann, 2005).

22 Os resultados mencionados acima destacam o papel potencial de seqüências repetitivas de
23 DNA para a diferenciação dos cromossomos sexuais em vários grupos de peixes Neotropicais.

1 Entretanto, a associação entre a diferenciação dos cromossomos sexuais e o acúmulo de DNAs
2 repetitivos nem sempre é evidente, e o uso de marcadores moleculares pode ajudar a descobrir
3 o papel exato dos DNAs repetitivos durante este processo. Por exemplo, Ser et al. (2010)
4 identificaram quatro cromossomos sexuais distintos em peixes ciclídeos, nos quais diferentes
5 genes foram recrutados em cada cromossomo para um novo papel na determinação do sexo.
6 Estes dados forneceram evidências adicionais de que os mecanismos de determinação do sexo
7 podem ser muito instáveis em linhagens de peixes. A presença de quatro loci sexo-
8 determinantes e o estado relativamente indiferenciado dos cromossomos sexuais destas
9 espécies novamente mostram como os peixes podem ser um excelente modelo para estudos
10 evolutivos sobre a diferenciação dos cromossomos sexuais e a determinação do sexo.

11 ***Hoplias malabaricus*: um excelente modelo para estudos de diferenciação e evolução dos**
12 **cromossomos sexuais em peixes**

13 *Hoplias malabaricus*, um peixe Erythrinidae Neotropical com ampla distribuição, é
14 caracterizado por uma grande diversidade cariotípica. Sete cariomorfos (A - G) são facilmente
15 distinguíveis no que diz respeito a forma, tamanho ou número diplóide dos cromossomos, bem
16 como a presença/ ausência de cromossomos sexuais (Bertollo et al. 2000). Três cariomorfos (A,
17 E e F) não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, enquanto outros três mostram
18 cromossomos sexuais bem diferenciados, incluindo um sistema XX/XY no cariomorfo B, um
19 sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ no cariomorfo D e um sistema XX/XY₁Y₂ no cariomorfo G
20 (Bertollo et al. 2000). Por sua vez, o cariomorfo C apresenta um sistema XX / XY em estágio
21 inicial de diferenciação (Cioffi & Bertollo, 2010). Portanto, diferentes sistemas de
22 cromossomos sexuais, bem como distintos estágios evolutivos de sua diferenciação, podem ser
23 encontrados nesta espécie. Variação na quantidade de diferentes tipos de DNAs repetitivos se

1 mostra associada com a diversidade genômica e a evolução dos cromossomos sexuais em *H.*
2 *malabaricus*. O mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas deu suporte para a
3 caracterização dos cariomorfos como unidades evolutivas distintas, além de mostrar uma clara
4 tendência dos cromossomos sexuais acumularem DNAs repetitivos (Cioffi et al. 2009a, 2010a;
5 Rosa et al. 2009).

6 O cariomorfo B ($2n = 42$, para ambos os sexos) é caracterizado por um sistema de
7 cromossomos sexuais bem diferenciados do tipo XX / XY, onde o cromossomo X é o único
8 subtelocêntrico encontrado no cariótipo de ambos os sexos, enquanto que o cromossomo Y é o
9 menor submetacêntrico no cariótipo masculino. Além disso, o cromossomo X também é
10 facilmente reconhecido por um conspicuo bloco heterocromático presente no longo braço
11 (Born & Bertollo, 2000). De fato, o mapeamento cromossômico de diferentes seqüências de
12 DNA repetitivos indicaram que a diferenciação do cromossomo X ocorreu pelo acúmulo dessas
13 seqüências no seu braço longo, contrariamente ao cromossomo Y onde este acúmulo não
14 ocorreu (Cioffi et al. 2010a).

15 Ambos os cromossomos X e Y apresentam sítios do satélite 5S *HindIII*-DNA na região
16 centromérica e uma concentração de seqüências (GATA) n nos braços longos (**fig. 1**). 5S*HindIII*
17 é uma família de DNA satélite isolada do genoma de *H. malabaricus*, mostrando uma
18 localização exclusiva nas regiões centroméricas de vários cromossomos desta espécie (Martins
19 et al. 2006). Repetições (GATA) n representam o principal componente de um DNA satélite
20 isolado do cromossomo W da cobra *Elaphe radiata*, desempenhando um papel importante na
21 evolução dos cromossomos sexuais em várias espécies eucarióticas (Eppelen et al. 1982;. Singh
22 & Jones, 1982; Jones & Singh, 1985). Embora essas duas classes de DNAs repetitivos foram
23 mapeadas nos cromossomos sexuais do cariomorfo B de *H. malabaricus*, nenhuma diferença

1 significativa foi encontrada nos cromossomos X e Y (**Figura 1**), sugerindo que as repetições de
2 5SHindIII-DNA e seqüências (GATA)_n não estiveram diretamente relacionadas com a
3 diferenciação destes cromossomos. Por outro lado, o cromossomo X difere claramente do Y
4 por um sítio conspícuo de DNAr 18S ocupando uma grande extensão de seu braço longo
5 (**Figura 1**), a qual é também caracterizada como uma região de heterocromatina GC-rica,
6 evidenciando a participação dessas seqüências na diferenciação desse cromossomo (Born &
7 Bertollo, 2000; Cioffi et al. 2010a). Nos machos, as seqüências de DNAr 18S não são
8 observadas no cromossomo Y, indicando que as mesmas devem ter sido excluídas a partir da
9 forma ancestral deste cromossomo (Cioffi et al. 2010a).

10 Em sistemas de cromossomos sexuais XX / XY, o cromossomo Y geralmente mostra uma
11 clara tendência a acumular DNAs repetitivos, tornando-se largamente heterocromático. Em *H.*
12 *malabaricus*, entretanto, os resultados acima, assim como mapeamento por FISH de uma fração
13 Cot-1 DNA, mostrou que o acúmulo de seqüências alta- e moderadamente repetitivas de DNA
14 ocorreu no X, mas não no cromossomo Y (Cioffi et al. 2010a). Nesse sentido, o cariomorfo B
15 de *H. malabaricus* enfatiza um enriquecimento incomum de DNAs repetitivos no cromossomo
16 X, associada à diferenciação do sistema XX/XY.

17 Seqüências repetitivas foram também capazes de identificar um sistema nascente de
18 cromossomos sexuais XX / XY no cariomorfo C (2n = 40 para ambos os sexos), com
19 cromossomos X e Y diferindo por uma amplificação pequena, porém significativa, de DNAs
20 repetitivos em um sítio proximal nos braços longos desses cromossomos (**Figura 1b**). Esta
21 condição heteromórfica foi claramente evidenciada tanto pela coloração CMA₃ e FISH com
22 sondas de DNAr 18S. No entanto, esta pequena diferenciação entre os cromossomos X e Y não
23 foi suficiente para promover um heteromorfismo de tamanho entre eles, indicando um sistema

1 nascente de cromossomos sexuais neste cariomorfo, a partir de cromossomos distintos daqueles
2 que caracterizam o sistema XY no cariomorfo B (Cioffi & Bertollo, 2010). O acúmulo de
3 repetições em tandem podem representar os passos iniciais na diferenciação dos cromossomos
4 sexuais, gerando assincronia na replicação do DNA e, assim, reduzindo a frequência de
5 crossing-over entre eles, o que corresponde a um requisito importante para a diferenciação
6 destes cromossomos (Charlesworth et al. 2005).

7 Por sua vez, o cariomorfo D de *H. malabaricus* ($2n = 40$ nas fêmeas/ $2n = 39$ nos machos),
8 é caracterizado por um sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, exclusivo para este
9 cariomorfo. Estudos anteriores demonstraram que ocorreu uma fusão de um cromossomo
10 submetacêntrico pequeno, semelhante ao X_2 , no braço curto de um cromossomo
11 submetacêntrico maior, semelhante ao X_1 , originando o braço longo do grande cromossomo
12 neo-Y, presente nos espécimes do sexo masculino (Bertollo et al. 1997).

13 O mapeamento de DNAs repetitivos permitiu verificar a associação destas seqüências
14 com a diferenciação dos cromossomos sexuais nesse cariomorfo (Cioffi & Bertollo, 2010). O
15 conspícuo sítio proximal de heterocromatina GC-rica e de DNAr 18S, encontrado nos braços
16 longos dos cromossomos X e Y do cariomorfo C, também foi localizado na mesma região no
17 cromossomo X_1 , bem como no braço curto do cromossomo neo-Y deste cariomorfo.
18 Coincidentemente, o cromossomo neo-Y também apresentou o sítio menos conspícuo de CMA_3
19 encontrado no cromossomo Y do cariomorfo C, enquanto o cromossomo X_1 apresentou o sítio
20 mais conspícuo (**Figura 1c**), evidenciando, assim, que os cromossomos X_1 e o neo-Y do
21 cariomorfo D foram derivados a partir dos cromossomos XY presentes no cariomorfo C (Cioffi
22 & Bertollo, 2010).

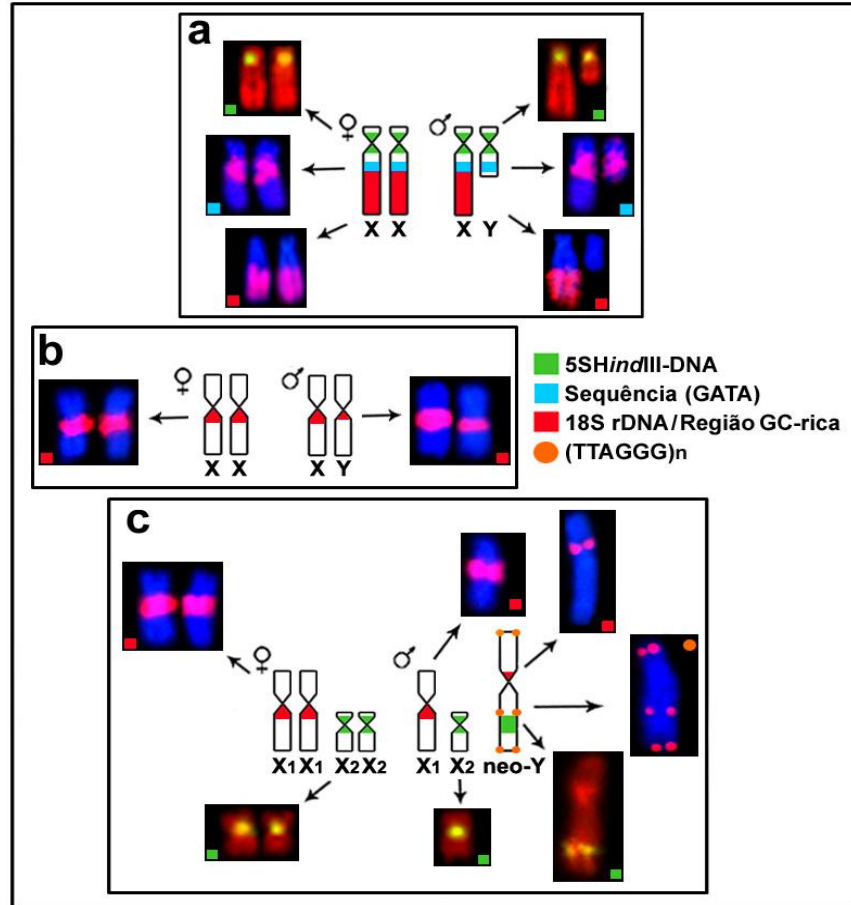
1 Além disso, o satélite 5SHindIII-DNA foi mapeado na região centromérica do
2 cromossomo X₂ e intersticial no braço longo do neo-Y, sendo este último o único sítio não-
3 centromérico em todo o cariótipo. Estes achados sugerem que este sítio intersticial corresponde
4 ao centrômero do cromossomo submetacêntrico X₂, que foi fusionado no braço curto do
5 cromossomo Y ancestral encontrada no cariomorfo C, dando origem ao grande cromossomo
6 neo-Y do cariomorfo D. Além disso, foi também evidenciado que esse cromossomo se
7 comporta como um componente dicêntrico estável no cariótipo (Bertollo et al. 1997; Bertollo &
8 Mestriner, 1998; Martins et al. 2006). Sequências teloméricas intersticiais também foram
9 mapeadas no braço longo do cromossomo neo-Y (**Figura 1c**), que são supostamente restos de
10 DNA teloméricos dos cromossomos rearranjados, reforçando, portanto, a origem desse
11 cromossomo por meio de uma fusão em tandem (Cioffi & Bertollo, 2010).

12 Em resumo, *H. malabaricus* é caracterizada por uma notável variação nos cromossomos
13 sexuais, incluindo casos bem diferenciados (XX / XY e X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y) e um sistema
14 nascente (XX / XY), além de outro sistema múltiplo (XX/XY₁Y₂) presente no cariomorfo G,
15 mas que ainda necessita ser melhor explorado quanto à sua origem e diferenciação. Os dados
16 obtidos até o momento têm demonstrado uma estreita relação entre cromossomos sexuais e o
17 acúmulo de diferentes tipos de DNAs repetitivos, os quais contribuiram para a diferenciação
18 desses cromossomos, tanto nos sistemas diferenciados como nascentes. Na verdade, os padrões
19 de distribuição de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais nos diferentes cariomorfos de *H.*
20 *malabaricus* destacam a plasticidade da diferenciação dos cromossomos sexuais nesta espécie,
21 caracterizando-a como um excelente modelo para estudar a evolução dos cromossomos sexuais
22 entre os vertebrados.

1 **Referências Bibliográficas**

2 As referencias bibliográficas deste capítulo encontram-se agrupadas no final da tese.

Figura



1 **Figura 1.** Distribuição cromossômica de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais do peixe
2 *Hoplias malabaricus*. **a** Sistema XX/XY do cariomorfo B: ambos os cromossomos X e Y
3 possuem um sítio de 5SHindIII-DNA na região centromérica, bem como uma concentração
4 intersticial da seqüência (GATA)_n nos braços longos. A diferenciação dos braços longos do
5 cromossomo X ocorreu pelo aumento da quantidade de heterocromatina GC-rica e de cistrons
6 de DNAr 18S. Note a abundância de seqüências repetitivas acumuladas no cromossomo X, em
7 contraste com o cromossomo Y. **b** Sistema XX/XY do cariomorfo C: passos iniciais da
8 diferenciação dos cromossomos sexuais, onde o X e Y diferem apenas ligeiramente devido à
9 amplificação de heterocromatina GC-rica e de sítios de DNAr 18S no cromossomo X. **c**
10 Sistema X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y do cariomorfo D: os cromossomos X₁ e neo-Y evidenciam
11 heterocromatina GC-rica, bem como sítios de DNAr 18S proximais, conforme encontrado nos
12 cromossomos X e Y do cariomorfo C. O satélite 5SHindIII-DNA foi mapeado na região
13 pericentromérica do cromossomo X₂ e intersticialmente no braço longo do cromossomo neo-Y,
14 corroborando a fusão em tandem entre o cromossomo X₂ e o cromossomo Y ancestral do
15 cariomorfo C, originando o cromossomo neo-Y do cariomorfo D. Um ITS foi encontrado no
16 braço longo do cromossomo neo-Y, reforçando a origem desse cromossomo por uma fusão em
17 tandem. Idiogramas representativos dos diferentes cromossomos sexuais são também
18 apresentados, destacando a correlação direta entre os DNAs repetitivos e a diferenciação dos
19 cromossomos sexuais (modificado de Cioffi & Bertollo, 2010 e Cioffi et al. 2010a).

Capítulo 4

Distribuição cromossômica de seqüências repetitivas de DNA evidencia a diferenciação independente dos cromossomos sexuais múltiplos em duas espécies de peixes estreitamente relacionadas

Cioffi MB, Molina WF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC
Cytogenetic and Genome Research 134: 295-302 (2011)

Resumo

1 Foi analisada a distribuição de seis seqüências repetitivas de DNA nos cromossomos sexuais
2 mitóticos e meióticos de duas espécies de peixes eritrínideos, *Hoplias malabaricus* e
3 *Erythrinus erythrinus*, ambas com um sistema de cromossomos sexuais múltiplos
4 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, utilizando a *hibridização in situ* com fluorescência. O padrão de
5 distribuição dessas seqüências foi distinto para cada espécie. Enquanto algumas seqüências
6 foram espécies-específicas, outras se mostraram presentes nos cromossomos das duas
7 espécies, porém com localização diferente. Estes dados, juntamente com os diferentes tipos
8 morfológicos dos cromossomos sexuais e os rearranjos cromossômicos distintos associados
9 com a formação dos cromossomos neo-Y, corroboram a plasticidade da diferenciação dos
10 cromossomos sexuais na família Erythrinidae. Os resultados obtidos evidenciam que os
11 cromossomos sexuais podem seguir distintos padrões de diferenciação, ainda que
12 considerando um mesmo tipo de sistema sexual presente em espécies co-familiares.

1 **Introdução**

2 A clara correlação entre cromossomos sexuais e os DNAs repetitivos tem sido apontada
3 por vários estudos. A organização cromossômica de seqüências repetitivas de DNA tem
4 proporcionado novas perspectivas na compreensão da evolução genômica em muitas espécies,
5 demonstrando que a diferenciação dos cromossomos sexuais é freqüentemente associada com o
6 acúmulo de tais seqüências de DNA (Singh et al. 1976; Nanda et al. 1990; Nishioka et al. 1993;
7 Schmid et al. 2002; Vicente et al. 2003; Steinemann & Steinemann, 2005; Hobza et al. 2006;
8 Marchal et al. 2006; Matsubara et al. 2006; Vicari et al. 2008b, Wang et al. 2009; Cioffi &
9 Bertollo, 2010; Cioffi et al. 2010a).

10 Diferentemente dos vertebrados superiores, que além de apresentarem um sistema estável
11 de determinação sexual com origem na base da filogenia (Dettai et al. 2007), os peixes
12 apresentam uma grande diversidade nos seus mecanismos de determinação sexual. Além da
13 ausência de cromossomos sexuais diferenciados na maioria das espécies, essa diversidade faz
14 dos peixes um bom modelo para analisar o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais
15 em vertebrados.

16 Erythrinidae é uma pequena família de peixes Characiformes, amplamente distribuída na
17 América do Sul, e que compreende apenas três gêneros (*Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*).
18 Esta família apresenta uma grande diversidade cromossômica, bem caracterizada por distintos
19 cariomorfos, além da presença de cromossomos sexuais morfologicamente já diferenciados
20 (Bertollo, 2007), ao lado de outros em um estágio inicial de diferenciação (Cioffi & Bertollo,
21 2010). *Hoplias malabaricus*, apresenta uma notável diversificação cariotípica com sete
22 cariomorfos (A a G) facilmente distinguíveis pelos números diplóides, forma e tamanho dos
23 cromossomos e diferentes sistemas de cromossoma sexuais (Bertollo et al. 1986, 2000). Três

1 sistemas de cromossomos sexuais bem diferenciados ocorrem neste grupo, ou seja, XX/XY no
2 cariomorfo B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ no D cariomorfo e XX/XY₁Y₂ no cariomorfo G (Bertollo et
3 al. 2000), bem como um sistema nascente XX/XY encontrado no cariomorfo C (Cioffi &
4 Bertollo, 2010). Em contraste, os cariomorfos A, E e F apresentam cariótipos homomórficos
5 entre os sexos. Por sua vez, *Erythrinus erythrinus*, é outra espécie da família Erythrinidae com
6 4 cariomorfos (A a D) já identificados. O cariomorfo A compreende populações com uma
7 estrutura cariotípica muito semelhante, sem cromossomos sexuais diferenciados, enquanto os
8 cariomorfos B, C e D compartilham um sistema de cromossomos sexuais do tipo
9 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, mas diferem quanto ao número diplóide e morfologia cromossômica
10 (Bertollo et al. 2004).

11 No presente estudo, foi realizada uma análise comparativa entre distintos marcadores nos
12 cromossomos sexuais X_1X_2Y dos cariomorfos D de *H. malabaricus* e *E. erythrinus*, pelo
13 mapeamento de seis classes de DNAs repetitivos (DNAr 18S, DNAr 5S, *Rex3*, (TTAGGG)_n,
14 Cot1-DNA e o satélite 5*SHindIII*-DNA) nos cromossomos mitóticos e meióticos. A
15 distribuição contrastante das seqüências repetitivas em ambas as espécies apoiam a
16 diferenciação independente dos cromossomos sexuais X_1X_2Y nessas duas espécies
17 estreitamente relacionadas.

18 **Material e Métodos**

19 *Espécimes, Preparação dos Cromossomos e Cariotipagem*

20 Onze machos de *H. malabaricus* (cariomorfo D), foram obtidos na região de São Carlos
21 (SP), e 8 machos de *E. erythrinus* (cariomorfo D), foram obtidos na região de Natal (Rio
22 Grande do Norte), pertencentes a diferentes bacias hidrográficas brasileiras, isoladas por
23 milhares de quilômetros.

1 Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensões celulares do rim anterior
2 usando o método convencional de secagem ao ar (Bertollo et al. 1978). Os cromossomos
3 meióticos foram obtidos de acordo com Kligerman & Bloom (1977), como descrito em
4 Bertollo & Mestriner (1998). Para a análise convencional os cromossomos foram corados com
5 solução de Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6,8 por 5 a 6 minutos. As imagens das metáfases
6 foram capturadas pelo sistema de software CoolSNAP, imagem Pro Plus 4.1 (Media
7 Cybernetics, Silver Springs, MD, E.U.A.), acoplado a um microscópio Olympus BX50
8 (Olympus, Ishikawa, Japan). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m),
9 submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) ou acrocêntricos (a), de acordo com as relações de
10 braços (Levan et al. 1964).

11 Sondas

12 Três seqüências de DNAs repetitivos, isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus*,
13 foram utilizadas. A primeira sonda incluiu cópias repetidas de DNAr 5S, contendo 120 pares
14 de bases (pb) do gene codificante (DNAr 5S) e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito
15 (NTS). A segunda sonda incluiu cópias da seqüência de DNA satélite 5SHindIII-DNA com 360
16 pb, contendo um segmento com 95 pb, com similaridade ao gene de RNAr 5S, e um segmento
17 com 265 pb similar ao NTS da primeira sonda. A terceira sonda correspondeu a um segmento
18 de 1.400 pares de bases do gene do RNAr 18S, obtido por PCR a partir do DNA nuclear (Cioffi
19 et al. 2009a). Todas estas sondas foram clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em
20 células competentes de *E. coli* DH5 α . (Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.).

21 O DNA genômico de *H. malabaricus* e *E. erythrinus* foram extraídos utilizando o
22 procedimento de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russel (2001). Para ambas as
23 espécies, uma biblioteca enriquecida com seqüências repetitivas foi construída com base na

1 cinética de renaturação de C_{0t} -1DNA (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente
2 repetitivas de DNA) (Zwick et al. 1997).

3 O retroelemento *Rex3*, foi obtido diretamente por PCR a partir do DNA nuclear de *E.*
4 *erythrinus*, como descrito previamente (Volff et al. 1999). A sonda de DNAr 5S foi marcada
5 por *nick-translation* com biotina-14-dATP, de acordo com especificações do fabricante
6 (Bionick Labeling System, Invitrogen, San Diego, CA, USA). As sondas de DNAr 18S,
7 5S*Hind*III-DNA, Cot1-DNA e *Rex3* foram marcadas por *nick-translation* com DIG-11-dUTP,
8 de acordo com especificações do fabricante (Roche, Mannheim, Germany). Adicionalmente,
9 uma sonda de DNA telomérico (TTAGGG)_n foi gerada por PCR (PCR DIG-Probe Synthesis
10 Kit, Roche) na ausência de um DNA molde utilizando os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅
11 (Ijdo et al. 1991).

12 Hibridização Cromossômica

13 A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada sob altas condições de
14 extringência nos cromossomos mitóticos e meióticos (Pinkel et al. 1986). Os cromossomos
15 metafásicos foram incubados com RNase (40 µg/ml) por 1 hora à 37°C. Após a desnaturação
16 do DNA cromossômico em formamida 70%, 2 × SSC à 70°C, as preparações foram incubadas
17 em 2 x SSC por 4 min à 70 °C. A mistura de hibridização (100 ng da sonda desnaturada, 10
18 mg/ml de sulfato de dextrano, 2 × SSC e formamida 50% em um volume final de 30 µL) foi
19 aplicada sobre as lâminas e a hibridização foi realizada durante uma noite à 37 °C, em uma
20 câmara úmida contendo 2 x SSC. Duas lavagens pós-hibridização foram realizadas em um
21 agitador (150 rpm) à 37 °C, a primeira em formamida 50%, 2 × SSC por 15 min, e a segunda
22 em 2 × SSC por 15 min. A lavagem final foi realizada em 4 × SSC a temperatura ambiente, por
23 15 min. Avidina-FITC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada para a detecção do sinal da

1 sonda de DNAr 5S e anti-digoxigenina rodamina (Roche, Mannheim, Alemanha) foi usada para
2 detectar as sondas de DNAr 18S, 5S*Hind*III-DNA, Cot1-DNA, *Rex3* e a seqüência
3 (TTAGGG)_n. Os cromossomos foram corados com DAPI (1,2 µg/ml) em solução de *Antifading*
4 (Vector, Burlingame, CA, EUA).

5 **Resultados**

6 *Cariótipo e Mapeamento de seqüências repetidas de DNA em cromossomos sexuais mitóticos*

7 Os machos das duas espécies apresentaram padrão cariotípico que caracteriza o
8 cariomorfo D de cada grupo, ou seja, $2n = 39$ cromossomos (14m + 25sm) em *H. malabaricus*
9 e $2n = 51$ cromossomos (5m + 2sm + 2st+ 42a) em *E. erythrinus*, com a presença de um
10 sistema de cromossomos sexuais múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Enquanto os cromossomos
11 sexuais são todos submetacêntricos em *H. malabaricus*, em *E. erythrinus* o X_1 e X_2 são
12 acrocêntricos e o Y é o maior cromossomo metacêntrico do cariótipo (**Figura 1**).

13 O DNAr 5S foi mapeado na região centromérica dos cromossomos X_1 , X_2 e Y de *E.*
14 *erythrinus*, enquanto os cromossomos sexuais de *H. malabaricus* não apresentaram sítios de
15 DNAr 5S. Por sua vez, enquanto os cromossomos sexuais de *E. erythrinus* não apresentaram
16 sítios de DNAr 18S, em *H. malabaricus* foram encontrados conspícuos sítios proximais nos
17 braços longos e curtos dos cromossomos X_1 e Y, respectivamente. O satélite 5S*Hind*III-DNA
18 também foi mapeado exclusivamente nos cromossomos sexuais de *H. malabaricus*, com uma
19 localização centromérica no cromossomo X_2 e uma intersticial no braço longo do cromossomo
20 Y (**Figura 2**).

21 Para ambas as espécies, o padrão de hibridização da fração de Cot-1 DNA coincidiu com
22 os sítios de heterocromatina C-positiva, incluindo as regiões centroméricas, intersticiais e
23 teloméricas dos cromossomos. O padrão de hibridização da sonda Cot1-DNA foi semelhante

1 nos cromossomos X_2 das duas espécies, apresentando sítios centroméricos e teloméricos nos
2 braços longos. Entretanto, algumas diferenças evidentes puderam ser detectadas em relação aos
3 cromossomos X_1 e Y. Enquanto o cromossomo X_1 de *H. malabaricus* só apresentou um sítio
4 Cot-1 DNA centromérico, o cromossomo X_1 de *E. erythrinus* mostrou um sítio intersticial
5 característico no seu braço longo além de um centromérico. Diferentemente, o cromossomo Y
6 apresentou sítios Cot-1 DNA centroméricos e intersticiais em ambas as espécies, bem como
7 sítios teloméricos discretos nos braços longos em *H. malabaricus* e nos braços curtos em *E.*
8 *erythrinus* (**Figura 2**).

9 O retrotransposon não-LTR *Rex3* mostrou um padrão de distribuição mais disperso ao
10 longo dos cromossomos das duas espécies. No entanto, *clusters* conspícuos foram destacados
11 na região centromérica dos cromossomos X_1 , X_2 e Y de *E. erythrinus*. Repetições (TTAGGG)_n
12 foram caracteristicamente localizadas na região telomérica dos cromossomos. Além disso, um
13 sítio exclusivo telomérico intersticial foi encontrado no cromossomo Y, ocupando a região
14 mediana de seu braço longo em *H. malabaricus* e em sua região centromérica em *E. erythrinus*
15 (**Figura 2**).

16 Cromossomos Meióticos

17 Os cromossomos meióticos de machos de *H. malabaricus* e *E. erythrinus* foram
18 analisados em células espermatogoniais, prófase I inicial e diacinese-diplóteno.

19 *Células espermatogoniais.* As células espermatogoniais de *H. malabaricus* apresentaram
20 39 cromossomos, de acordo com o cariótipo do sexo masculino. Dois sítios de DNAr 5S foram
21 mapeados intersticialmente no braço longo de um par autossômico metacêntrico, enquanto que
22 dez sítios de DNAr 18S foram identificados: oito na região telomérica dos autossomos e dois
23 com localização intersticial nos cromossomos X_1 e Y (**Figura 3a**). FISH com a sonda de

1 5S*Hind*III-DNA detectou 22 sítios centroméricos para este DNA satélite, incluindo aqueles
2 localizados no cromossomo X₂ e aquele encontrado na região intersticial do braço longo do
3 cromossomo Y, sendo nenhum deles co-localizado com os sítios de DNAr 5S (**Figura 3b**). As
4 células espermatogoniais de *E. erythrinus* apresentaram 51 cromossomos, conforme o
5 esperado. Dentre estes, 20 cromossomos acrocêntricos apresentaram sítios centroméricos de
6 DNAr 5S, incluindo os cromossomos X₁ e o X₂, além de um sítio centromérico presente no
7 cromossomo Y metacêntrico. Cinco pares cromossômicos exibiram sítios teloméricos de DNAr
8 18S, incluindo aqueles com localizações biteloméricas (**Figura 3f**).

9 *Células em prófase I inicial.* Durante a primeira divisão meiótica, *H. malabaricus* e *E.*
10 *erythrinus* apresentaram 18 e 24 bivalentes, respectivamente, além de um trivalente
11 característico. Enquanto os bivalentes correspondem aos pares autossômicos, o trivalente é
12 formado pelos cromossomos X₁, X₂ e Y. FISH com sondas de DNAr 5S e *Rex3* mostrou que o
13 retroelemento *Rex3* apresentou-se disperso ao longo da maioria dos cromossomos em *H.*
14 *malabaricus* (**Figura 3c**). Um padrão de hibridização semelhante também foi encontrado em *E.*
15 *erythrinus*, porém com *clusters* de *Rex3* co-localizados com o DNAr 5S na região centromérica
16 de vários cromossomos (**Figura 3g**). Dupla-FISH com sondas de DNAr 5S e 18S em *H.*
17 *malabaricus* evidenciou um sítio de DNAr 5S e cinco sítios de DNAr 18S emparelhados,
18 devido a sinapse dos cromossomos homólogos nos estágios de zigóteno/ paquíteno (**Figura**
19 **3d**). Em *E. erythrinus*, as células no mesmo estágio mostraram 10 sítios de DNAr 5S pareados,
20 incluindo aqueles localizados no trivalente sexual correspondentes aos cromossomos X₁, X₂ e
21 Y, além de seis sítios de DNAr 18S (**Figura 3h**).

22 *Células em diplóteno/diacinese.* Em *H. malabaricus*, essas células apresentaram um e
23 cinco sítios de DNAr 5S e 18S, respectivamente, incluindo o sítio de DNAr 18S presente no

1 trivalente sexual, como o esperado (**Figura 3e**). Concordantemente, onze sítios de *5SHindIII*-
2 DNA também foram detectados durante esta fase, sendo dez deles localizados nos bivalentes
3 (dados não mostrados) e um localizado no trivalente sexual (**Figura 3e, detalhe**). Em *E.*
4 *erythrinus*, cinco e dez pares cromossômicos exibiram sítios de DNAr 18S e 5S,
5 respectivamente, como foi observado nas células da prófase iniciais, incluindo o sítio de DNAr
6 5S localizado no trivalente sexual (**Figura 3i**).

7 **Discussão**

8 Cromossomos sexuais múltiplos surgem normalmente de fusões cêntricas, translocações
9 ou fusões em tandem entre cromossomos sexuais ancestrais (X ou Z; Y ou W) e autossomos.
10 Um rearranjo Y-autossomo leva ao surgimento de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2$ nas fêmeas
11 e cromossomos sexuais X_1X_2Y nos machos, onde o cromossomo neo-Y parcialmente composto
12 pelos cromossomos Y e autossomo ancestral. Conseqüentemente, um característico trivalente
13 sexual é formado na meiose dos machos pelo pareamento dos cromossomos X_1 , X_2 e o neo-Y
14 (White, 1973). Nos peixes, o sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ já foi descrito em espécies de
15 diferentes famílias (Murofushi et al. 1983; Pezold, 1984, Suzuki et al. 1988; Morescalchi et al.
16 1992; Almeida-Toledo et al. 2000; Bertollo et al. 2000, 2004; Caputo et al. 2001; Ueno &
17 Takai, 2008). Em vários casos, o neo-Y é um cromossomo metacêntrico, enquanto os
18 cromossomos X_1 e X_2 são acrocêntricos, sugerindo a ocorrência de rearranjos Robertsonianos
19 na formação destes sistemas.

20 Embora possuam diferentes números diplóides, os cariomorfos D de *H. malabaricus* ($2n$
21 = 39/40) e *E. erythrinus* (51/52) compartilham um sistema de cromossomos sexuais múltiplos
22 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. A priori, isso poderia sugerir uma relação estreita entre tais sistemas, com
23 uma provável origem em comum antes da divergência dos gêneros *Hoplias* e *Erythrinus*. No

1 entanto, o mapeamento comparativo de seqüências repetitivas de DNA apontou para um
2 processo de diferenciação independente para os cromossomos sexuais de ambas as espécies.

3 A presença de seqüências de DNA repetitivo nos cromossomos X_1 , X_2 e Y nos permitiu
4 verificar a associação dessas seqüências com os cromossomos sexuais. Além de
5 morfologicamente diferentes, os cromossomos sexuais de *H. malabaricus* e *E. erythrinus*
6 também diferem no padrão de distribuição das seqüências dos DNAs repetitivos analisados.
7 Todos os cromossomos sexuais de *H. malabaricus* são submetacêntricos, sendo o cromossomo
8 Y originado por uma fusão em tandem (Cioffi & Bertollo, 2010), como aqui também destacado
9 pela presença de seqüências teloméricas intersticiais (ITS) e um sítio 5S*Hind*III-DNA
10 intersticial no braço longo do cromossomo neo-Y (**Figuras 2 e 4**). No entanto, em *E. erythrinus*
11 os cromossomos X_1 e X_2 são acrocêntricos, enquanto o cromossomo Y é um metacêntrico
12 grande, todos eles exibindo sítios de DNAr 5S, Cot-1 DNA, *Rex3* e repetições teloméricas em
13 suas regiões centroméricas (**Figura 2**). Estas características corroboram a ocorrência de uma
14 fusão cêntrica entre homólogos ancestrais dos cromossomos X_1 e X_2 , levando à formação do
15 cromossomo neo-Y (**Figura 4**). Seqüências de DNAr 5S associadas com as regiões
16 heterocromáticas centroméricas têm sido consideradas propiciadoras de rearranjos
17 cromossômicos, tais como fusões cêntricas, em uma espécie de peixe do gênero *Chromis*
18 (Molina & Galetti, 2002). Embora não seja claro o papel de seqüências específicas de DNA na
19 origem de rearranjos cromossômicos, o *pool* de diferentes seqüências repetitivas que foram co-
20 localizadas na região da heterocromática centromérica dos cromossomos X_1 e X_2 de *E.*
21 *erythrinus* indicam um processo evolutivo dinâmico para essas regiões. É provável que esse
22 processo possa ter favorecido a ocorrência de rearranjos cromossômicos associados com a
23 origem do cromossomo neo-Y nesta espécie.

1 Os dados meióticos confirmaram a distribuição diferencial dos DNAs repetitivos nos
2 cromossomos de ambas as espécies. As células espermatogoniais diplóides, bem como aquelas
3 em estágios de prófase inicial e diplóteno/diacinese, mostraram os padrão de distribuição
4 esperado para essas repetições, tanto nos cromossomos individuais como em condições de
5 pareamento durante a meiose (**Figura 3**), corroborando resultados prévios obtidos pela análise
6 dos cromossomos mitóticos em células somáticas (Cioffi et al. 2009a, 2010b; Cioffi &
7 Bertollo, 2010). O trivalente sexual em *H. malabaricus* apresentou sítios de DNAr 18S
8 correspondentes aos encontrados nos cromossomos X₁ e neo-Y; a seqüência 5S*Hind*III-DNA
9 foi mapeada na região centromérica do cromossomo X₂ e localizado intersticialmente no braço
10 longo do cromossomo neo-Y. Já o trivalente sexual de *E. erythrinus* apresentou sítios *Rex3* e
11 DNAr 5S co-localizados, correspondentes aos situados na região centromérica dos
12 cromossomos X₁, X₂ e neo-Y.

13 Seqüências repetitivas de DNA têm se acumulado nos cromossomos sexuais dos peixes
14 de uma maneira diferente do padrão encontrado nos autossomos, indicando assim um papel
15 potencial na diferenciação dos cromossomos sexuais nos peixes (Nanda et al. 1990; Martins,
16 2007 ; Cioffi et al. 2010a). Assim, embora os cromossomos sexuais das duas espécies de
17 *Erythrinidae* acumulem seqüências repetitivas, os caminhos evolutivos associados a tais
18 acúmulos foram distintos. Aparentemente as seqüências incluídas na heterocromatina dos
19 cromossomos sexuais foram selecionadas aleatoriamente e amplificadas em cada espécie. De
20 fato, é conhecido que a maioria das repetições presentes nos cromossomos sexuais são espécie-
21 específicas e altamente variáveis, mesmo entre táxons estreitamente relacionadas (Tom et al.
22 1984; Itoh & Mizuno, 2002; Marchal et al. 2004; Hughes et al. 2010), sugerindo que uma

1 amplificação rápida e diferenciação molecular ocorreram repetidamente após a divergência a
2 partir de um ancestral comum.

3 Cromossomos sexuais heteromórficos evoluíram muitas vezes, de forma independente,
4 em diferentes linhagens de plantas e animais. Duas espécies de plantas pertencentes ao gênero
5 *Silene*, *S. colpophylla* e *S. latifolia*, são caracterizadas pela presença de um sistema de
6 cromossomos sexuais do tipo XX/XY. No entanto, os cromossomos sexuais de ambas as
7 espécies evoluíram a partir de diferentes pares autossômicos, ou seja, apresentam uma origem
8 independente nestas espécies intimamente relacionadas (Mrackova et al. 2008). Em vertebrados
9 superiores, os sistemas de cromossomos sexuais foram caracterizados como sendo
10 polimórficos, indicando a natureza evolutiva dinâmica desses sistemas (Graves, 2008).
11 Matsubara et al. (2006), investigaram a conservação da homologia de ligação dos cromossomos
12 sexuais de cobra com os seres humanos e aves, através do mapeamento genético comparativo,
13 concluindo que os cromossomos sexuais desses três grupos foram todos derivados de diferentes
14 pares autossômicos a partir de um ancestral comum, diferenciando-se de forma independente
15 em cada linhagem. Curiosamente, embora compartilhando o mesmo sistema ZZ/ZW, os
16 autossomos que foram convertidos em cromossomos sexuais nas aves foram diferentes
17 daqueles que deram origem a esses cromossomos em cobras. Nos peixes, cromossomos sexuais
18 não-homólogos também foram relatados para algumas espécies relacionadas (Phillips et al.
19 2001;. Devlin & Nagahama, 2002; Woram et al. 2003;. Takehana et al. 2007; Henning et al.
20 2008). A explicação mais plausível para tais casos é que diferentes genes primários de
21 determinação sexual podem ter evoluído em cromossomos diferentes, onde um gene
22 autossômico, ou uma cópia gênica duplicada, adquiriu uma nova mutação e deu origem ao
23 desenvolvimento de machos ou fêmeas, resultando em um novo gene de determinação sexual e

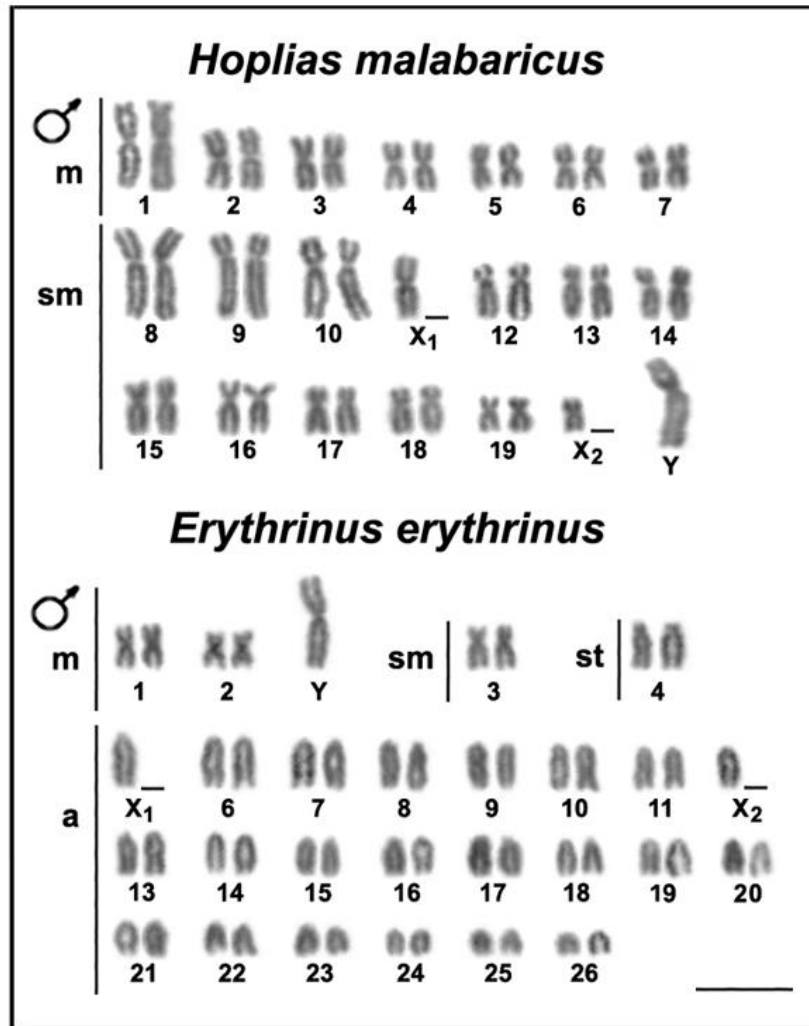
1 o surgimento de novos cromossomos sexuais a partir de autossomos diferentes (Takehana et al.
2 2007).

3 Em resumo, a família Erythrinidae é caracterizada por espécies com ou sem cromossomos
4 sexuais diferenciados. Além de diferentes tipos de sistemas, há representantes deste grupo que
5 compartilham um mesmo sistema de cromossomos sexuais, como é o caso dos cariomorfos D
6 de *H. malabaricus* e *E. erythrinus* ora analisados, tornando esta família de peixes um excelente
7 modelo para o estudo da evolução dos cromossomos sexuais. Em *H. malabaricus*, os
8 cromossomos sexuais X_1X_2Y se originaram de cromossomos XY ancestrais em um estágio
9 inicial de diferenciação (Cioffi & Bertollo, 2010). Igualmente, o sistema X_1X_2Y de *E.*
10 *erythrinus* parece ser também derivado de um par ancestral XY ainda morfologicamente
11 indiferenciado, para o qual ainda não foi evidenciado nenhum marcador específico para os
12 cromossomos X e Y (**Figura 4**). No entanto, as extensivas variações envolvendo os vários tipos
13 de DNAs repetitivos mostram que os cromossomos sexuais passaram por diferentes processos
14 de diferenciação nestas duas espécies cofamiliares. O padrão distinto de distribuição dos DNAs
15 repetitivos, juntamente com os diferentes tipos morfológicos dos cromossomos sexuais e os
16 distintos rearranjos cromossômicos associados com a formação dos cromossomos neo-Y,
17 destacam a plasticidade de diferenciação dos cromossomos sexuais nestes peixes. Entretanto,
18 embora estas características apontem para uma origem independente, os dados disponíveis até o
19 momento não permitem excluir uma origem comum para os sistemas sexuais a partir de
20 possíveis cromossomos homeólogos. Esta questão deve ser focada em nossos futuros estudos.

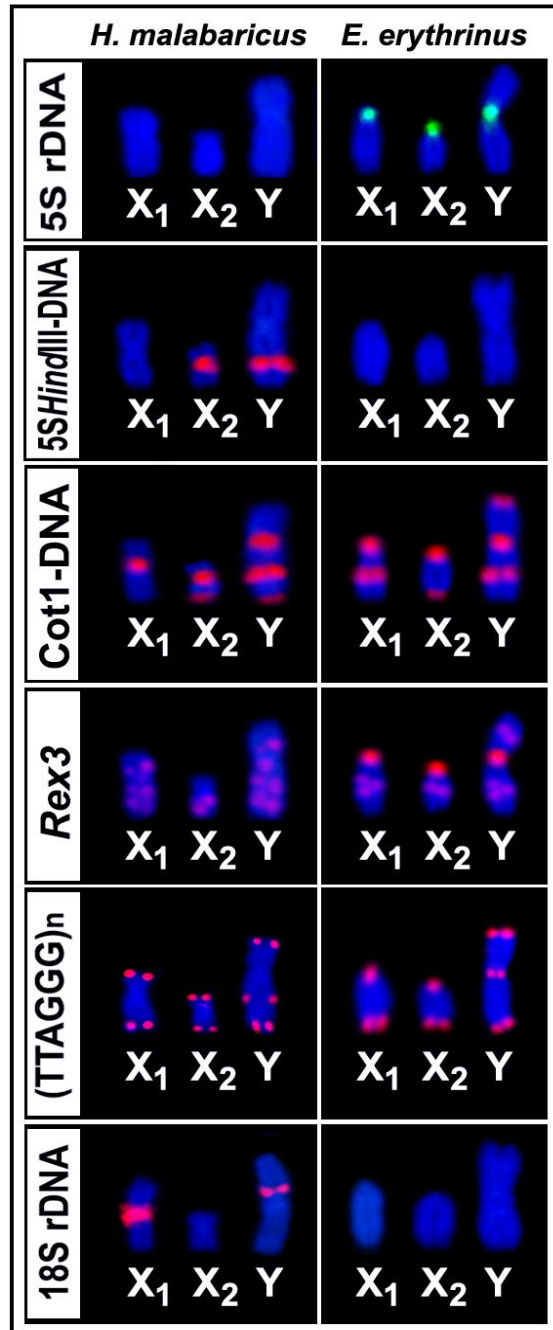
21 **Referencias Bibliográficas**

22 As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

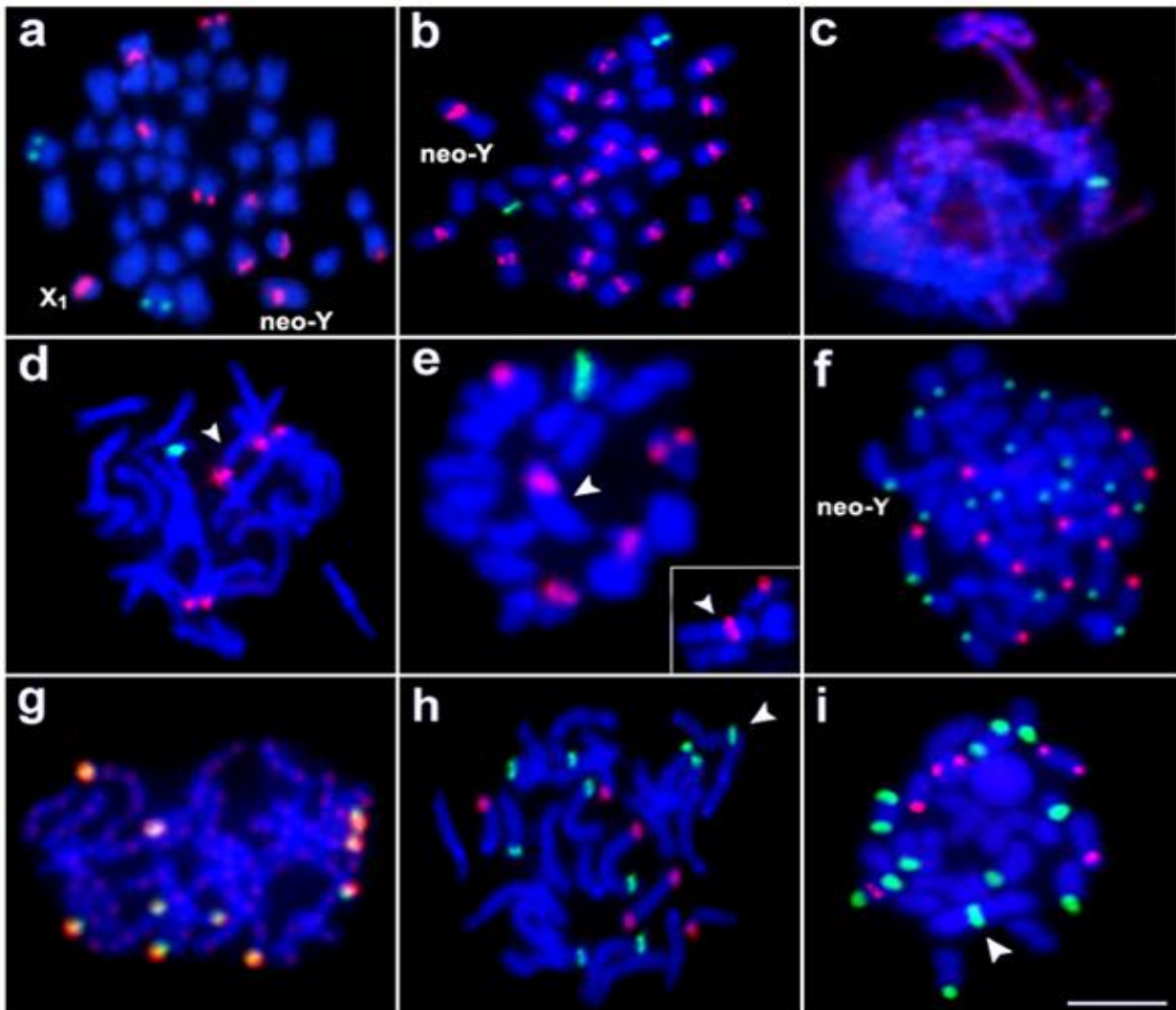
Figuras



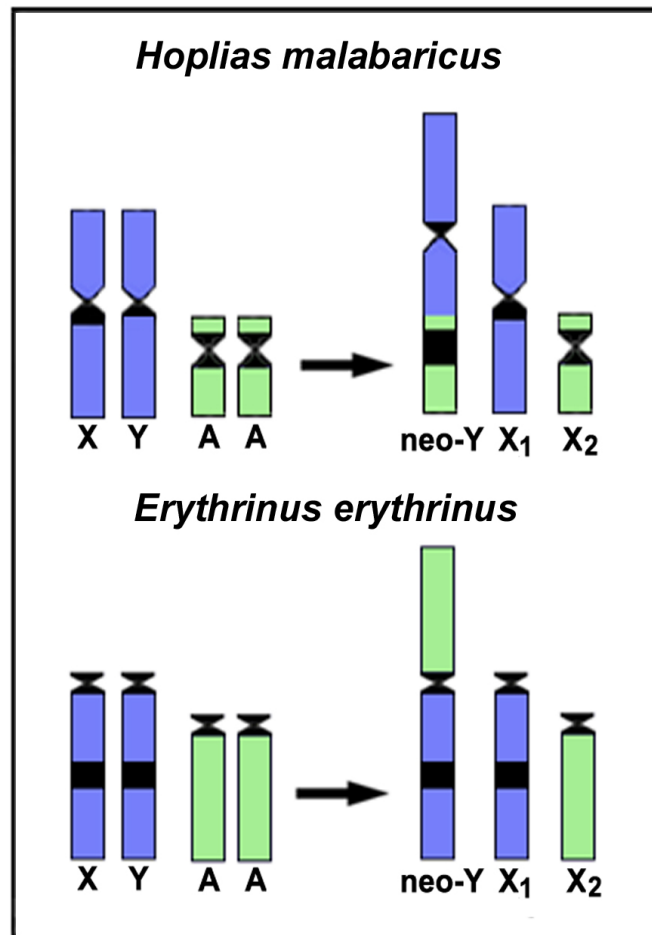
1 **Figura 1.** Cariótipos de machos dos cariomorfos D de *Hoplias malabaricus* (2n=39) e
2 *Erythrinus erythrinus* (2n=51), ambos com um sistema de cromossomos sexuais
3 X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y com coloração Giemsa convencional. Barra = 5 µm.



1 **Figura 2.** Cromossomos sexuais X₁X₂Y de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* após a
2 hibridização fluorescente *in situ* com vários tipos de DNAs repetitivos.



1 **Figura 3.** Cromossomos meióticos de *Hoplias malabaricus* (a - e) e *Erythrinus erythrinus* (f -
2 **i).** a, b Células espermatogoniais com $2n=39$ cromossomos apresentando 10 sítios de DNAr
3 18S (vermelho) e 2 sítios de DNAr 5S (verde) (a) e 22 sítios de 5SHindIII-DNA (vermelho) e 2
4 sítios de DNAr 5S (verde) (b). c Estágios de zigóteno/paquítenu apresentando sítios dispersos
5 para o retroelemento *Rex3* (vermelho) e 1 sítio de DNAr 5S (verde) presentes nos cromossomos
6 pareados. d Estágio de zigóteno/paquítenu/e diacinese/metáfase I apresentando sítios de DNAr
7 18S (vermelho) e 5S (verde) em 5 e 1 cromossomos pareados, respectivamente; no destaque o
8 trivalente sexual com 1 sítio de 5SHindIII-DNA f Células espermatogoniais com $2n=51$
9 cromossomos apresentando 12 sítios de DNAr 18S (vermelho) e 21 sítios de DNAr 5S (verde).
10 g Estágios de zigóteno/paquítenu apresentando o padrão disperso de distribuição do
11 retroelemento *Rex3* (vermelho) e sua co-localização com sítios de DNAr 5S (verde) na região
12 centromérica dos cromossomos. h Estágios de zigóteno/paquítenu e i diacinese/metáfase I
13 apresentando sítios de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) em 5 e 10 cromossomos pareados,
14 respectivamente. As cabeças de seta indicam os trivalentes sexuais. Barra = 5 μ m.



1 **Figura 4.** Diagrama esquemático ilustrando os rearranjos cromossômicos associados com a
2 diferenciação dos cromossomos sexuais X_1X_2Y de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus*
3 *erythrinus*. No cariomorfo D de *H. malabaricus*, o cromossomo neo-Y foi derivado de uma
4 fusão *em tandem* entre o cromossomo Y submetacêntrico e um autossomo submetacêntrico (A).
5 O par XY ancestral foi caracterizado em um estágio inicial de diferenciação, considerando o
6 heteromorfismo de tamanho das bandas heterocromáticas proximais. No cariomorfo D de *E.*
7 *erythrinus* o cromossomo neo-Y foi originado de uma fusão cêntrica entre um cromossomo Y
8 acrocêntrico e um autossomo acrocêntrico (A). O par sexual ancestral não apresentou
9 diferenciação entre os cromossomos X e Y. As regiões escuras dos cromossomos representam
10 bandas heterocromáticas. Dados de Cioffi & Bertollo (2010) e Cioffi et al. (2010b).

Capítulo 5

Pintura cromossômica evidencia a origem independente de cromossomos sexuais múltiplos presente em duas espécies de peixes da família Erythrinidae

Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC
BMC Evolutionary Biology 11: 186 (2011)

Resumo

1 Erythrinidae é uma família de peixes caracterizada por apresentar uma grande variação com
2 relação aos números diplóides e sistemas de determinação sexual entre as espécies,
3 incluindo dois sistemas sexuais múltiplos X_1X_2Y presentes em *Hoplias malabaricus* e
4 *Erythrinus erythrinus*. A princípio, a ocorrência de um mesmo tipo de sistema de
5 cromossomos sexuais em espécies de uma mesma família sugere que esses cromossomos
6 poderiam estar correlacionados, apresentando uma mesma origem ancestral a partir de
7 cromossomos XY homomórficos ou em um estágio inicial de diferenciação. Para identificar
8 a origem e a evolução dos cromossomos sexuais X_1X_2Y de *H. malabaricus* e *E. erythrinus*
9 realizamos experimentos de hibridizações recíprocas, utilizando duas sondas cromossomo-
10 específicas originadas da microdissecção dos cromossomos sexuais X_1 e Y de *H.*
11 *malabaricus* e *E. erythrinus*, respectivamente. Os resultados obtidos forneceram
12 informações elucidativas sobre a origem desse sistema de cromossomos sexuais, indicando
13 uma evolução independente nessas duas espécies de Erythrinidae. Ao que tudo indica
14 diferentes autossomos foram primeiramente convertidos em um par sexual XY pouco
15 diferenciado em cada espécie, seguindo-se rearranjos cromossômicos adicionais que
16 diferenciaram o sistema X_1X_2Y atualmente presente em *H. malabaricus* e *E. erythrinus*.
17 Assim sendo, foram obtidas novas informações sobre a origem e evolução dos cromossomos
18 sexuais entre os Erythrinidae, aumentando o nosso conhecimento sobre a evolução dos
19 cromossomos sexuais entre os peixes e entre os vertebrados como um todo.

1 **Introdução**

2 A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando sondas específicas para o
3 cromossomo como um todo (wcp) é uma ferramenta citogenética importante no estudo da
4 origem e evolução dos cromossomos sexuais em diversos organismos (Shibata et al. 1999;
5 Phillips et al. 2001; Marchal et al. 2004; Rens et al. 2007; Diniz et al. 2008; Henning et al.
6 2008; Swier et al. 2009; Acosta et al. 2011). A diversidade de mecanismos de determinação
7 sexual, bem como a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos em muitas espécies de
8 peixes, faz desse grupo um modelo útil para o estudo da evolução dos cromossomos sexuais
9 nos vertebrados (Almeida-Toledo & Foresti, 2001; Cioffi et al. 2011a). No entanto, estudos
10 envolvendo pintura cromossômica em peixes são ainda raros, devido principalmente à
11 dificuldade de obtenção das sondas necessárias. Os poucos estudos disponíveis estão focados
12 na evolução cariotípica geral (Ráb et al. 2008; Nagamachi et al., 2010) ou dos cromossomos
13 sexuais (Reed et al. 1995; Phillips et al. 2001; Phillips et al. 2007; Diniz et al. 2008; Henning et
14 al. 2008; Wang et al. 2009). Os dados disponíveis até o momento sugerem que uma variedade
15 de mecanismos de determinação do sexo e de cromossomos sexuais podem ter evoluído de
16 forma independente quando se comparam diferentes espécies de peixes.

17 Erythrinidae é uma família de peixes neotropicais que se caracteriza por apresentar
18 espécies com uma grande variedade de formas cromossômicas, bem como uma gama de
19 cromossomos sexuais distintos. O peixe *Erythrinus erythrinus* (EER) apresenta diversificação
20 cariotípica entre diferentes populações, com quatro cariomorfos até então já identificados (A a
21 D) (Bertollo et al. 2004). O cariomorfo A apresenta $2n = 54$ cromossomos e a ausência de
22 cromossomos sexuais de heteromórficos. Os cariomorfos B, C e D, por sua vez, compartilham
23 um sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, mas diferem em relação ao número

1 diplóide e a morfologia cromossômica. O cariomorfo D apresenta $2n = 52$ cromossomos nas
2 fêmeas e $2n = 51$ nos machos e dados previamente obtidos sugerem que este cariomorfo seja
3 derivado de um cariomorfo como o do tipo A (Cioffi et al. 2011b). Embora exista diferença no
4 número diplóide entre os cariomorfos A e D, bem como um sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$
5 diferenciado apenas no cariomorfo D, eles compartilham uma estrutura cariotípica geral
6 relativamente similar, caracterizada pela presença de vários cromossomos acrocêntricos e
7 alguns poucos cromossomos de dois braços. Além disso, o mapeamento de distintas classes de
8 DNAs repetitivos (DNAr 5S, Cot-1 DNA, *Rex3* e repetições teloméricas) na região
9 centromérica do cromossomo Y indica que uma fusão cêntrica entre os par acrocêntricos
10 número 5 e 12, presentes no cariomorfo A, levou à formação desse cromossomo Y, assim como
11 a origem dos cromossomos X_1 e X_2 ímpares no cariótipo dos machos do cariomorfo D (Cioffi
12 et al. 2011b).

13 Da mesma forma, o peixe *Hoplias malabaricus* (HMA) também demonstra uma
14 significativa diversidade cariotípica, com diferenças populacionais bem definidas quanto ao
15 número diplóide, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais. Atualmente,
16 sete cariomorfos facilmente distinguíveis (A-G) já foram identificados (Bertollo et al. 2000).
17 Três sistemas bem diferenciados de cromossomo sexuais ocorrem neste grupo, ou seja, XX/XY
18 no cariomorfo B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ no cariomorfo D e XX/XY_1Y_2 no cariomorfo G, além de
19 um sistema XX/XY presente em um estágio inicial de diferenciação no cariomorfo C (Bertollo
20 et al. 2000; Cioffi & Bertollo, 2010). O cariomorfo D apresenta $2n = 40$ cromossomos nas
21 fêmeas e $2n = 39$ cromossomos nos machos. O mapeamento cromossômico de DNAs
22 repetitivos sugere que o cariomorfo D teria se derivado de um cariomorfo similar ao C, o qual é
23 caracterizado por $2n = 40$ cromossomos em ambos os sexos (Bertollo et al. 1997; Cioffi &

1 Bertollo, 2010). Um conspícuo sítio heterocromático proximal de DNAr 18S/GC-rico, presente
2 nos braços longos dos cromossomos X e Y do cariomorfo C, também se encontra localizado na
3 mesma região do cromossomo X_1 e no braço curto do cromossomo Y do cariomorfo D,
4 sugerindo que esses cromossomos sejam derivados dos cromossomos XY do cariomorfo C.
5 Além disso, o cromossomo Y do cariomorfo D compartilha seqüências de DNAs repetitivos
6 com os cromossomos Y e 20 do cariomorfo C. O par cromossômico número 20 do cariomorfo
7 C e seu homólogo no cariomorfo D (X_2) apresentam um sítio centromérico do DNA satélite 5S
8 *HindIII*. Adicionalmente, um sítio intersticial deste DNA satélite está presente no braço longo
9 do cromossomo Y do cariomorfo D, representando o único sítio não-centromérico dessa
10 seqüência de DNA no cariótipo. Estes dados indicam que este sítio intersticial corresponde ao
11 centrômero do cromossomo 20, fusionado em tandem com o cromossomo Y ancestral do
12 cariomorfo C, resultando no cromossomo Y dicêntrico atualmente presente no cariomorfo D
13 (Cioffi & Bertollo, 2010). Além disso, estudos adicionais têm mostrado que este cromossomo
14 Y dicêntrico se comporta como um componente estável do cariótipo e tem uma segregação
15 correta durante a meiose (Bertollo et al. 1997).

16 No presente estudo, nós analisamos a origem dos cromossomos sexuais X_1X_2Y de EER e
17 de HMA, empregando experimentos de pintura cromossômica com sondas totais específicas de
18 cromossomos sexuais, obtidas a partir de microdissecção cromossômica. O cromossomo X_1 de
19 HMA (cariomorfo D) e o cromossomo Y de EER (cariomorfo D) foram microdissectados e a
20 hibridização fluorescente *in situ* foi realizada nos cromossomos de EER (cariomorfos A e D) e
21 de HMA (cariomorfos C e D). Os resultados caracterizaram os cromossomos que deram origem
22 aos sistemas sexuais múltiplos dessas duas espécies, evidenciando que ambos os sistemas se
23 originaram a partir de diferentes pares autossômicos. Nossos dados fornecem novas pistas

1 sobre a origem e evolução dos cromossomos sexuais em peixes, o que aumenta nossa
2 compreensão sobre a evolução dos cromossomos sexuais nos vertebrados.

3 **Resultados**

4 Sonda Hm-X1 hibridizada nos cromossomos de HMA

5 No cariomorfo C, a sonda específica do cromossomo X₁ (Hm-X₁) pintou ambos os
6 cromossomos X nas fêmeas e os cromossomos X e Y nos machos (**Figura 1**). Quando a sonda
7 Hm-X₁ foi utilizado no cariomorfo D, dois cromossomos foram completamente pintados nas
8 fêmeas, correspondendo a ambos os cromossomos X₁. Por sua vez, enquanto que nos machos o
9 cromossomo X₁ foi também totalmente pintado, apenas a metade de outro cromossomo foi
10 destacada pela hibridização, correspondendo ao cromossomo Y (denominado de neo-Y).
11 Nenhum sinal foi observado no cromossomo X₂ (**Figura 1**). Em geral, houve uma
12 uniformidade para os sinais de hibridização para todos os cromossomos sexuais, exceto quanto
13 ao cromossomo X₂, o que indica que há uma alta homologia entre as suas regiões eucromáticas
14 e heterocromáticas. Além disso, sinais fracos de hibridização foram observados nos segmentos
15 heterocromáticos subteloméricos de alguns autossomos, o que poderia ser explicado pelo
16 compartilhamento de seqüências repetitivas. Estes resultados sugerem que o par cromossômico
17 hibridizado no cariomorfo C é o par ancestral que deu origem ao sistema de cromossomos
18 sexuais presente no cariomorfo D.

19 Sonda Ee-Y hibridizada nos cromossomos de EER

20 A sonda cromossomo Y-específica (Ee-Y) hibridizou totalmente em dois pares de
21 cromossomos nos machos e nas fêmeas do cariomorfo A (**Figura 2**), bem como nos
22 cromossomos X₁ e X₂ das fêmeas e nos cromossomos X₁, X₂ e Y dos machos do cariomorfo D
23 (**Figura 2**). Sinais fracos foram observados nos segmentos heterocromáticos subteloméricos de

1 alguns autossomos, indicando que esses cromossomos podem compartilhar seqüências
2 repetitivas. Estes resultados sugerem que os pares cromossômicos evidenciados pela pintura
3 cromossômica no cariomorfo A são os pares ancestrais para o sistema de cromossomos sexuais
4 presente no cariomorfo D.

5 Hibridização recíproca entre HMA e EER

6 Nenhum dos cromossomos sexuais em ambas as espécies exibiram sinais de hibridação
7 consistentes com os experimentos de hibridização recíproca. Em HMA, a sonda Ee-Y
8 hibridizou completamente com dois pares autossômicos submetacêntricos em machos e fêmeas
9 dos cariomorfos C e D (**Figura 1**). Em EER, a sonda Hm-X1 hibridizou com par autossômico
10 acrocêntrico em machos e fêmeas dos cariomorfos A e D (**Figura 2**). Os experimentos de
11 hibridização recíproca entre as espécies (sonda Hm-X1 com EER e a sonda Ee-Y com HMA,
12 respectivamente) mostram claramente que a hibridização ocorreu somente com autossomos em
13 todos os cariomorfos que foram analisadas.

14 **Discussão**

15 Origem dos sistemas de cromossomos sexuais nos cariomorfos de HMA

16 A hibridização completa de ambos os cromossomos X e Y do cariomorfo C com a sonda
17 derivada do cromossomo X₁ de HMA (Hm-X₁), evidencia a composição semelhante desses
18 cromossomos. Adicionalmente, tais resultados confirmam a hipótese de que os cromossomos
19 XY do cariomorfo C de HMA estão em um estágio inicial de diferenciação. Dados previamente
20 obtidos mostraram que esses cromossomos diferem apenas por uma pequena amplificação de
21 seqüências repetitivas no cromossomo X (Cioffi & Bertollo, 2010).

1 Quando hibridizada no cariomorfo D de HMA, a sonda Hm- X_1 pintou completamente
2 ambos os cromossomos X_1 nas fêmeas, assim como o cromossomo X_1 e metade do
3 cromossomo neo-Y nos machos. No entanto, não detectamos sinais de hibridização com o
4 cromossomo X_2 , o que indica que os cromossomos X_1 e X_2 não apresentam homologia de
5 sequências, sendo cromossomos não relacionados. Assim sendo, a região do cromossomo neo-
6 Y que não apresenta hibridização com a sonda Hm- X_1 corresponde ao homólogo do
7 cromossomo X_2 relacionado com a origem do neo-Y. Assim, confirma-se a origem do sistema
8 múltiplo X_1X_2Y de HMA através de uma fusão em tandem entre o proto-cromossomo Y ainda
9 indiferenciado do cariomorfo C com um autossomo, dando origem ao grande cromossomo neo-
10 Ye um cromossomo ímpar renomeado como X_2 , observados nos machos do cariomorfo D (**ver**
11 **Figura 3**).

12 Origem dos sistemas de cromossomos sexuais nos cariomorfos de EER

13 No cariomorfo D de EER, a sonda Ee-Y hibridizou com o grande cromossomo Y
14 metacêntrico, assim como completamente com os cromossomos acrocêntricos X_1 e X_2 em
15 ambos os cariótipos de machos e fêmeas. Estes resultados indicam que o cromossomo Y
16 metacêntrico surgiu de uma fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos não-
17 homólogos, que foram renomeados como X_1 e X_2 . Além disso, a sonda Ee-Y pintou quatro
18 cromossomos acrocêntricos em machos e fêmeas do cariomorfo A de EER. Isto indica que o
19 sistema sexual múltiplo, presente no cariomorfo D de EER, foi derivado de um ancestral
20 semelhante ao cariomorfo A por rearranjos cromossômicos envolvendo um proto-par XY,
21 morfológicamente indiferenciado, e um par de autossomos (**ver Figura 3**). Embora o par
22 sexual permaneça citogeneticamente não identificado no cariomorfo A, ele provavelmente
23 corresponde a um dos pares acrocêntricos que foram totalmente hibridizados pela sonda Ee-Y.

1 Assim, tanto em *H. malabaricus* como em *E. erythrinus*, reorganizações entre
2 cromossomos sexuais indiferenciados ou pouco diferenciados com autossomos deram origem
3 aos atuais sistemas de cromossomos sexuais múltiplos. Rearranjos entre os cromossomos
4 sexuais e autossomos tem sido relatados em diversos organismos (Graves, 2005; Wilcox et al.
5 1996; Ashley, 2002; Marchal et al. 2004; Bertollo et al. 2004; Cioffi et al. 2010a; Henning et
6 al. 2011).

7 Rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução dos sistemas de cromossomos
8 sexuais múltiplos podem reduzir a necessidade de mecanismos alternativos para suprimir a
9 recombinação (Vieira et al. 2003). De fato, nos sistemas descritos aqui, fusões em tandem e
10 fusões cêntricas foram passos fundamentais para a origem dos sistemas sexuais X_1X_2Y em
11 HMA e EER, respectivamente e nenhuma diferenciação adicional parece ter ocorrido entre os
12 cromossomos sexuais dentro de cada espécie. Assim, os rearranjos cromossômicos primários
13 que ocorreram durante a origem desses sistemas de cromossomos sexuais múltiplos parecem ter
14 sido suficientes para fixar os cromossomos resultantes nas populações.

15 Origem independente dos sistemas sexuais X_1X_2Y na família Erythrinidae

16 Uma característica interessante da biologia dos cromossomos sexuais dos peixes é que
17 apenas algumas espécies apresentam cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados.
18 No entanto, os sistemas sexuais XY não são comuns em peixes. Uma vez que ambas as
19 espécies de peixes aqui analisadas são intimamente relacionadas e apresentam um sistema
20 similar de cromossomos sexuais múltiplos, derivado de sistemas XY incipientes, nosso
21 interesse foi investigar a origem desses sistemas. Especificamente, procuramos analisar se os
22 sistemas X_1X_2Y de HMA e EER evoluíram independentemente ou poderiam ter sido originados
23 antes da divergência dos gêneros *Hoplias* e *Erythrinus*. Para tal, realizamos experimentos de

1 hibridizações recíprocas entre as espécies, com sondas obtidas dos cromossomos sexuais X e
2 Y. A ausência de sinais de hibridização nos cromossomos sexuais depois dos experimentos de
3 pintura interespecíficos indica claramente que os cromossomos X_1X_2Y evoluíram de forma
4 independente em cada espécie não sendo, portanto, relacionados entre si. Portanto, distintos
5 pares autossômicos e de cromossomos XY ancestrais estiveram envolvidos na formação dos
6 cromossomos sexuais múltiplos em cada espécie (**Figura 3**).

7 Numerosos casos relatam que os cromossomos sexuais heteromórficos evoluíram de
8 forma independente em várias linhagens de plantas e animais (Schartl, 2004; Vyskot & Hobza,
9 2004). Além disso, uma análise sintênica comparativa suporta a hipótese de que os
10 cromossomos sexuais evoluíram independentemente em diferentes linhagens de vertebrados
11 (Schultheis et al. 2009). Nos peixes, estudos utilizando análise de ligação com oito marcadores
12 ligados ao sexo indicaram que os cromossomos sexuais de *Oryzias javanicus* não são
13 homólogos aos de qualquer outra espécie de *Oryzias* (Nagai et al. 2008; Takehana et al. 2007a;
14 Takehana et al. 2007b). Experimentos de FISH recíprocos utilizando sondas de cromossomo
15 sexuais em espécies do gênero *Eigenmannia* também indicaram claramente que não há
16 homologia entre os sistemas X_1X_2Y e XY, sugerindo a sua evolução de forma independente
17 (Henning et al. 2008). Resultados similares também foram relatados para peixes salmonídeos,
18 onde sondas específicas para o braço curto e longo do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush*
19 hibridizaram em dois pares diferentes de autossomos de *Oncorhynchus mykiss* e *O.*
20 *tshawytscha*, novamente indicando que não há homologia entre os cromossomos sexuais desses
21 dois gêneros intimamente relacionados (Phillips et al. 2001). Estes dados sugerem que uma
22 variedade de cromossomos sexuais e de mecanismos de determinação de sexo evoluíram de
23 forma independente em diferentes gêneros de peixes. A explicação mais plausível para a

1 origem independente de cromossomos sexuais em peixes é que diferentes genes de
2 determinação sexual primários podem ter evoluído em cromossomos sexuais diferentes, onde
3 um gene autossômico ou uma cópia gênica duplicada adquiriu uma nova mutação e deu origem
4 ao desenvolvimento de machos ou fêmeas, o que resultaria em um novo gene de determinação
5 sexual e novos cromossomos sexuais a partir de autossomos diferentes (Schartl, 2004).

6 **Conclusões**

7 Em resumo, nós analisamos a evolução dos cromossomos sexuais X_1X_2Y em duas
8 espécies de peixes, HMA e EER. Nossos dados indicaram que há uma elevada plasticidade dos
9 mecanismos de determinação do sexo em peixes. É notável que o mesmo tipo de sistema de
10 cromossomos sexuais múltiplos, emergindo de cromossomos sexuais XY pouco diferenciados,
11 tenha evoluído de forma independente em duas espécies cofamiliares e passado por processos
12 distintos de diferenciação. Estes dados destacam o papel potencial de estudos realizados em
13 modelos de peixes para melhor compreender o processo de evolução dos cromossomos sexuais
14 nos vertebrados.

15 **Métodos**

16 *Espécimes e preparação cromossômica*

17 Neste estudo, foram analisadas amostras dos cariomorfos C e D de HMA e amostras dos
18 cariomorfos A e D de EER. Foi estudado um total de 85 espécimes (38 fêmeas e 47 machos).
19 No tocante a HMA, 8 fêmeas e 10 machos do cariomorfo C foram provenientes do rio Bento
20 Gomes (Poconé, Mato Grosso, Brasil) e 11 fêmeas e 12 machos do cariomorfo D foram
21 provenientes do Ribeirão Monjolinho (São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil) . No tocante a
22 EER, 9 fêmeas e 12 machos do cariomorfo A foram provenientes da bacia do rio Tietê
23 (Penápolis, São Paulo, Brasil), e 10 fêmeas e 13 machos do cariomorfo D foram provenientes

1 do rio Pirangi (Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil). Os cromossomos mitóticos foram
2 obtidos a partir de suspensões de células do rim anterior utilizando o método convencional de
3 secagem ao ar (Bertollo et al. 1978). Aproximadamente 30 células foram analisadas por
4 cariomorfo para estabelecer o número diplóide. Os experimentos seguiram os protocolos éticos,
5 e anestesia foi administrada antes do sacrifício dos animais.

6 Microdissecção cromossômica

7 Dezoito cópias do cromossomo X₁ e quinze cópias do cromossomo Y foram
8 microdissectados das placas metafásicas de machos dos cariomorfos D de HMA e EER,
9 respectivamente (**Figura 4**), utilizando a metodologia previamente descrita por Yang et al.
10 (2009), com pequenas adaptações. Diferentemente do grande cromossomo Y metacêntrico de
11 EER, que é facilmente identificável após coloração convencional com Giemsa, os
12 cromossomos de HMA foram corados com Cromomicina A₃ para permitir a identificação
13 precisa dos cromossomos X₁ pela identificação de um bloco heterocromático diferencial GC-
14 rico adjacente à região centromérica do braço longo.

15 Resumidamente, as suspensões cromossômicas foram aplicadas sobre lamínulas pré-
16 limpas e submetido à coloração Giemsa convencional ou Cromomicina A₃. A microdissecção
17 foi realizada utilizando um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 135), com uma agulha estéril
18 de vidro acoplada a um micromanipulador mecânico (Zeiss). As agulhas de vidro foram
19 preparadas com um *puller* modelo PB-7 (Narishige, Japão), e os cromossomos foram
20 transferidos para uma micropipeta contendo uma solução de coleta (10 mM Tris-HCl pH 7.5,
21 10 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA pH 7.5-8.0, 0.1% Triton X-100, 1.44 mg/ml proteinase
22 K e 30% glicerol). A solução foi posteriormente transferida para um tubo Eppendorf 0,5 ml

1 contendo 0,63 µl de tampão Sequenase (USB), 0.4 µl de 0.2 mM dNTPs, 0.6 µl de 40 mM do
2 primer DOP (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') e 3,37 µl de água PCR por amostra.

3 Os primeiros 8 ciclos de DOP-PCR foram realizados utilizando a sequenase T7 DNA
4 polimerase (USB, Cleveland, EUA), sob o seguinte programa: 90°C por 1 min, 25°C por 2 min
5 e 34°C por 2 min. Uma etapa inicial de desnaturação a 92°C por 5 minutos foi incluído para
6 inativar a proteinase K. Um mix de sequenase (0.2 µl) contendo 12 U µl⁻¹ T7 DNA polimerase
7 e 1,75 µl de tampão Sequenase foi adicionado a cada ciclo durante o tratamento térmico. O
8 volume de reação foi aumentado para 50 µl pela adição de 0,1 U de Taq polimerase, 0.2 mM
9 dNTPs, 20 mM de primer DOP, 25 mM MgCl₂ e 34,23 µl de água para PCR. Posteriormente,
10 33 ciclos adicionais foram realizados com o seguinte programa: 92 °C por 1 min, 56 °C por 2
11 min, 72 °C por 2 min e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Nós nos referimos a
12 essas duas sondas como Hm-X1 (para a sonda do cromossomo X₁ de HMA) e Ee-Y (para a
13 sonda do cromossomo Y de EER).

14 Hibridização fluorescente in situ

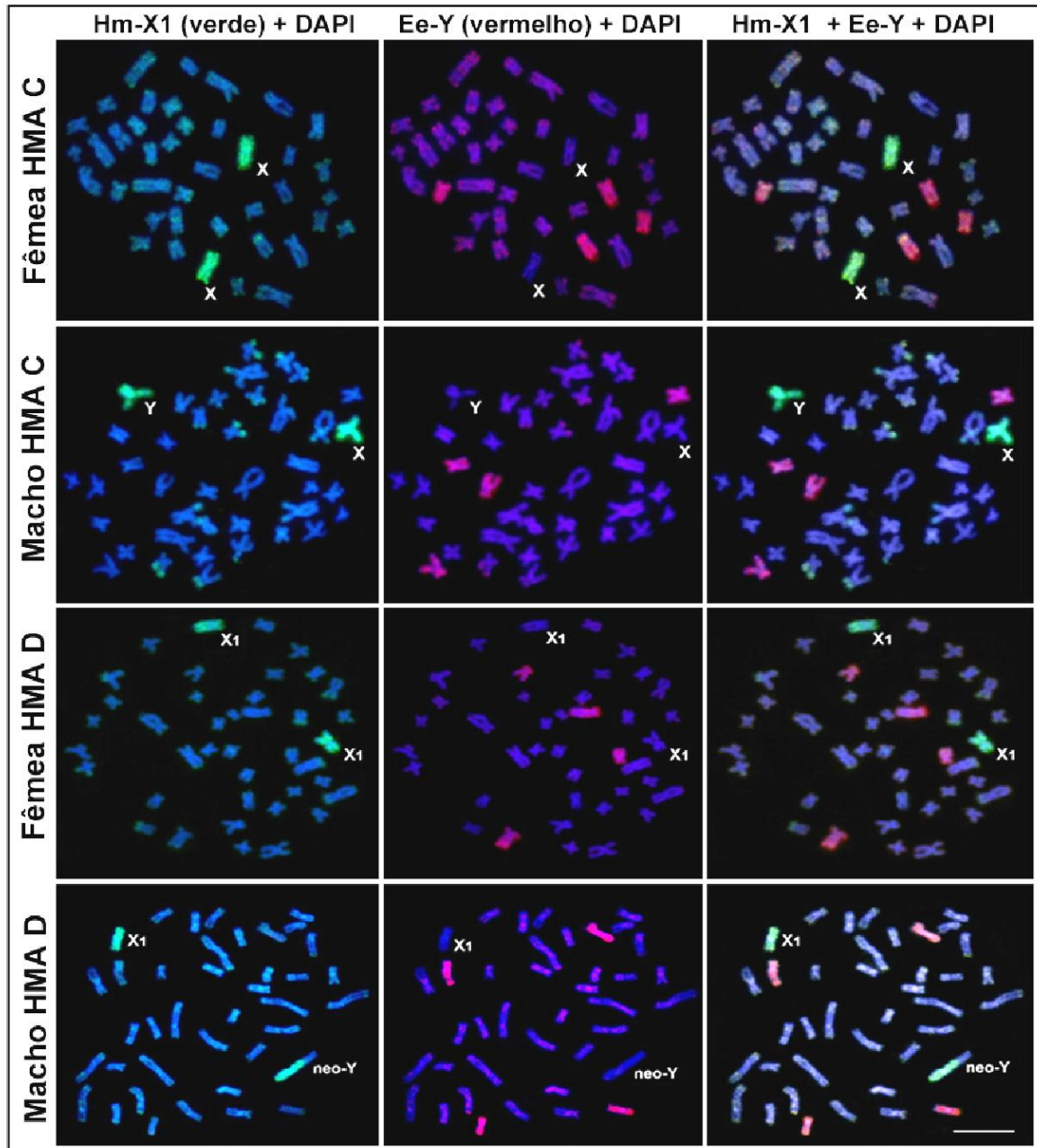
15 A sonda Hm-X1 foi marcada por PCR com biotina-dUTP (Roche) e a sonda Ee-Y foi
16 marcada com Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove, EUA) utilizando o primer DOP
17 e 1 µl dos produtos da DOP-PCR primária como DNA molde. As análises de FISH foram
18 realizadas nos cromossomos metafásicos de HMA (cariomorfos C e D) e EER (cariomorfos A e
19 D). As lâminas foram preparadas e pré-tratadas conforme descrito anteriormente (Yang et al.
20 2009) e desnaturados com formamida 70% em 2xSSC por 3 min a 72 °C. Para cada lâmina, 12
21 µl da solução de hibridação (contendo 0,2 µg de cada sonda marcada, formamida 50%, 2xSSC,
22 sulfato de dextrano 10% e 5 mg de DNA de esperma de salmão) foi desnaturada por 10
23 minutos a 75 °C e uma pré-hibridização realizada por 1 hora a 37°C. As amostras foram

1 hibridizadas durante 16 horas a 37 °C em câmara úmida. Na pós-hibridização, as amostras
2 foram lavadas com detergente 0.4 x SSC/0.3% Igepal (SIGMA) por 5 min a 73 °C e 2x
3 SSC/0.1% Igepal por 30seg à temperatura ambiente. A sonda biotinizada Hm-X1 foi detectada
4 com avidina-FITC (Vector Labs, EUA). As lâminas foram contracorados com DAPI e
5 montadas em uma solução de *antifading* (Vectashield da Vector laboratórios). Vinte
6 metáfaseses por cariomorfo foram fotografados com uma câmera digital CCD (Olympus DP70)
7 acoplada a um microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

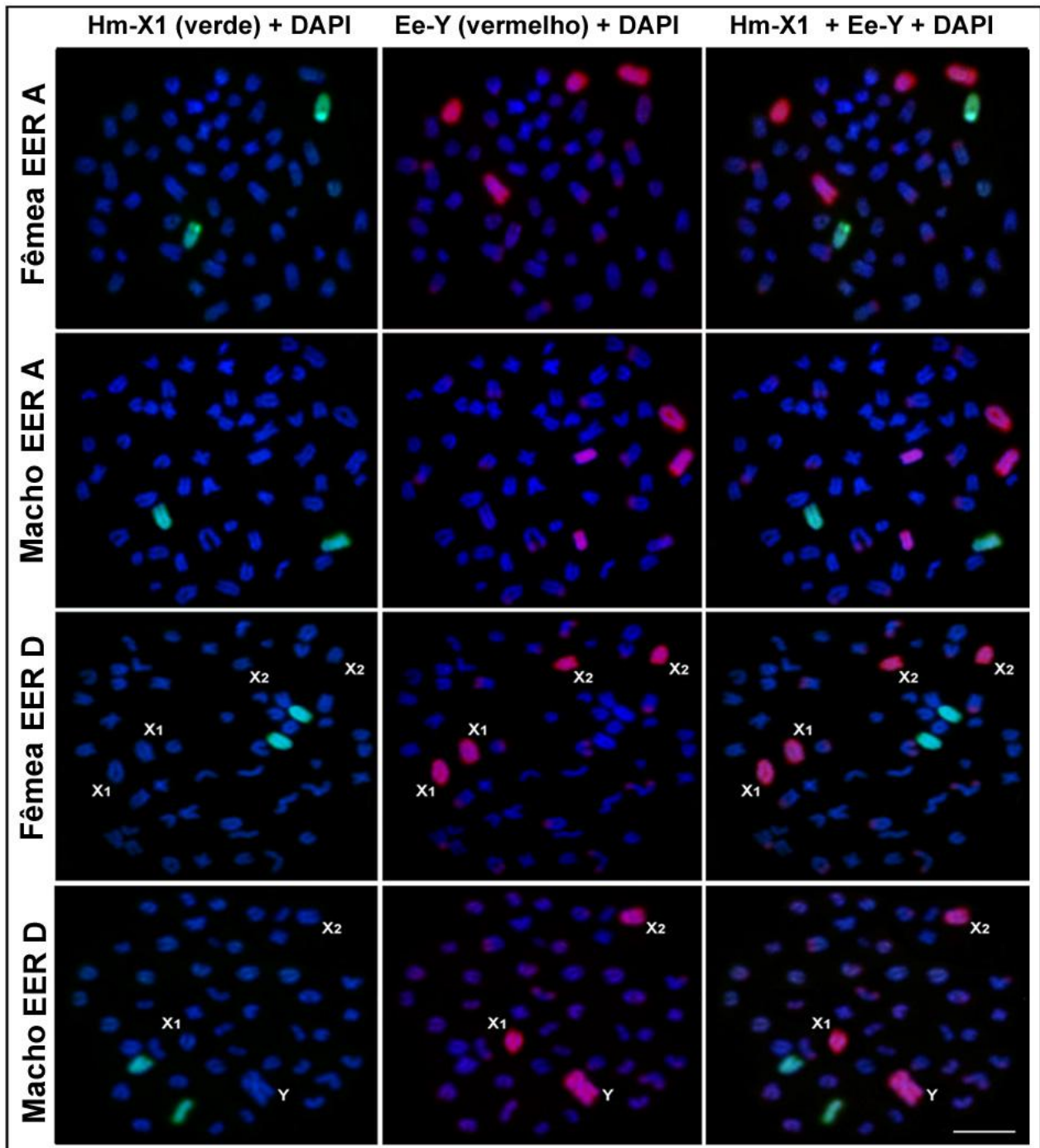
8 **Referências Bibliográficas**

9 As referencias bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

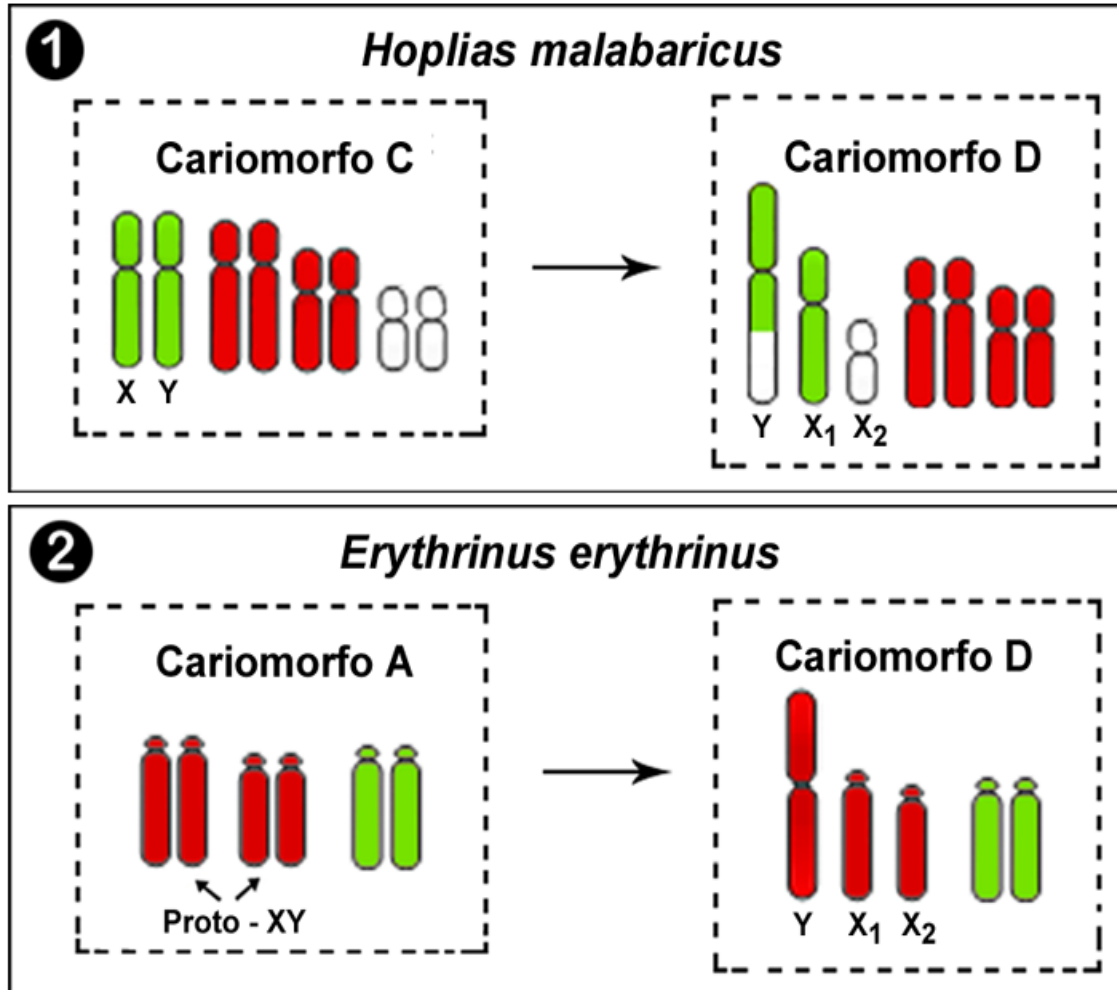
Figuras



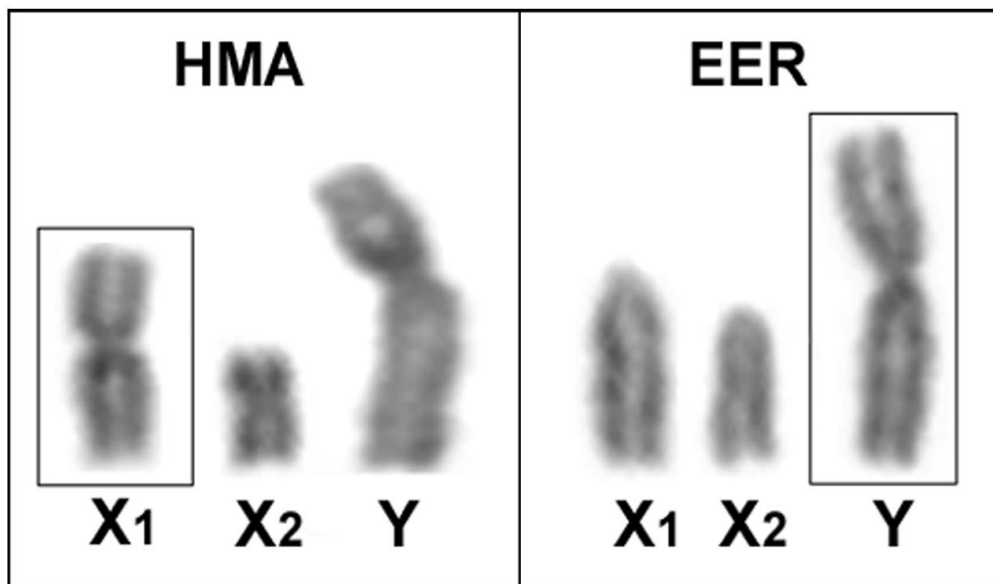
1 **Figura 1.** Pintura cromossômica com as sondas Hm-X1 (verde) e Ee-Y (vermelho), derivadas
2 de HMA e de EER respectivamente. As sondas foram hibridizadas com os cromossomos
3 metafásicos de fêmeas e machos de HMA dos cariomorfos C ($2n = 40, XX/XY$) e D ($2n =$
4 $40/39, X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$). Note que a sonda Hm-X1 pintou completamente os cromossomos X
5 e Y pouco diferenciados do cariomorfo C, bem como o cromossomo X_1 e uma grande extensão
6 do cromossomo neo-Y do cariomorfo D. A sonda Ee-Y pintou inteiramente dois pares
7 submetacêntricos distintos de cromossomos autossômicos em HMA. Barra = 5 μ m.



1 **Figura 2.** Pintura cromossômica com as sondas Hm-X1 (verde) e Ee-Y (vermelho). As sondas
2 foram hibridizadas com os cromossomos metafásicos de fêmeas e machos de EER dos
3 cariomorfos A ($2n = 54$, ambos os sexos) e D ($2n = 52/51$, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$). Note que a
4 sonda Ee-Y pintou quatro cromossomos acrocêntricos no cariomorfo A de EER, bem como os
5 cromossomos X_1 , X_2 e Y no cariomorfo D de EER. A sonda Hm-X1, derivada de HMA, pintou
6 inteiramente um par autossômico distintos em EER. Barra = 5 μ m.



1 **Figura 3.** Panorama da evolução independente proposta para os cromossomos sexuais X_1X_2Y
 2 em HMA e EER, com base em características cariotípicas e resultados de pinturas
 3 cromossômicas recíprocas com sondas derivadas de cromossomos sexuais. (1) O sistema
 4 X_1X_2Y de HMA foi originado por fusão *em tandem* entre o cromossomo Y pouco diferenciado,
 5 presente no cariomorfo C, e um autossomo resultando o cromossomo neo-Y do cariomorfo D.
 6 A região não-pintada do cromossomo neo-Y corresponde ao ancestral homólogo do
 7 cromossomo X_2 , que não tem homologia com o cromossomo X_1 . (2) O mesmo sistema X_1X_2Y
 8 em EER foi derivado de uma fusão cêntrica entre um cromossomo Y morfologicamente
 9 indiferenciado, presente no cariomorfo A, e um autossomo dando origem ao grande
 10 cromossomo neo-Y presente no cariomorfo D. Embora os cromossomos XY não sejam
 11 identificáveis no cariomorfo A de EER, eles devem corresponder a um dos dois pares
 12 acrocêntricos que foram totalmente hibridizados com a sonda Ee-Y. Os cromossomos pintados
 13 com as sondas Hm-X1 e Ee-Y estão indicados em verde e vermelho, respectivamente. Observe
 14 que embora os cromossomos de HMA e EER compartilhem seqüências, os dois sistemas de
 15 cromossomos sexuais evoluíram de forma independente.



1 **Figure 4.** Sistemas de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y de *Hoplias malabaricus* (HMA)
2 e *Erythrinus erythrinus* (EER). O cromossomo X_1 de HMA e o cromossomo Y de EER, que
3 foram microdissectados e usados para a construção de sondas, encontram-se destacados.

Capítulo 6

Pintura cromossômica revela a origem independente dos cromossomos sexuais entre formas intimamente relacionadas de uma espécie de peixe

Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC
Genetica 139:1065–1072 (2011)

Resumo

1 O peixe *Hoplias malabaricus* possui sistemas sexuais bem diferenciados (XY e X_1X_2Y
2 nos cariomorfos B e D, respectivamente), um sistema XY nascente (cariomorfo C) além
3 de cromossomos sexuais homomórficos (cariomorfo A). Neste trabalho realizamos a
4 análise evolutiva destes sistemas sexuais, utilizando duas sondas obtidas por
5 microdissecção dos cromossomos X e X_1 presentes nos sistemas XY e X_1X_2Y . Um
6 provável par sexual foi identificado no cariomorfo A, a partir do qual o sistema XY bem
7 diferenciado do cariomorfo B evoluiu, assim como foi esclarecido o relacionamento
8 evolutivo entre o sistema XY nascente e a origem dos cromossomos sexuais múltiplos
9 X_1X_2Y dos cariomorfos C e D, respectivamente. A falta de sinais reconhecíveis nos
10 cromossomos sexuais, após os experimentos recíprocos de FISH destacaram que eles
11 evoluíram de forma independente a partir de pares autossômicos não-homólogos. Vale

1 ressaltar que essas vias distintas ocorreram em uma mesma espécie nominal, expondo
2 assim a alta plasticidade da evolução dos cromossomos sexuais em vertebrados inferiores.
3 Possíveis mecanismos associados a esta labilidade dos mecanismos de determinação
4 sexual são discutidos.

5 **Introdução**

6 Em contraste com os vertebrados superiores, a maioria das espécies de peixes não
7 apresenta cromossomos sexuais diferenciados, embora uma variedade de sistemas já tenha sido
8 descrita neste grupo (Devlin & Nagahama, 2002; Cioffi et al 2011a). No entanto, apesar deste
9 fato, genes primários sexo determinantes ainda não foram identificados (Schartl, 2004) e
10 relações de sintenia entre cromossomos sexuais não têm sido investigadas, com poucas
11 exceções (Matsuda et al. 2002; Nanda et al. 2002). No geral, os peixes proporcionam uma
12 oportunidade interessante e única para estudar a evolução dos cromossomos sexuais e dos
13 mecanismos de determinação do sexo nos vertebrados inferiores.

14 O peixe *Hoplias malabaricus* apresenta uma ampla diversidade cariotípica com
15 diferenças populacionais significativas, sendo possível a indentificação de pelo menos 7
16 cariomorfos (Bertollo et al. 2000), onde distintos sistemas de cromossomos sexuais podem ser
17 encontrados. No cariomorfo B ($2n = 42$ em ambos os sexos) a diferenciação de um sistema XY
18 ocorreu devido à acumulação de DNAs repetitivos no braço longo do cromossomo X, em
19 contraste com o cariomorfo A ($2n = 42$ em ambos os sexos) intimamente relacionado, o qual
20 não apresenta cromossomos sexuais diferenciados (Cioffi et al. 2010a). No cariomorfo C ($2n =$
21 40 em ambos os sexos) um sistema sexual XY encontra-se em um estágio inicial de
22 diferenciação, em decorrência do acúmulo discreto de DNAs repetitivos em um dos homólogos
23 de um par morfologicamente indiferenciado (Cioffi & Bertollo, 2010). Finalmente, o

1 cariomorfo D (fêmeas $2n = 40$ e machos $2n = 39$) é caracterizado por um sistema de
2 cromossomos sexuais múltiplos do tipo X_1X_2Y , onde o cromossomo neo-Y se diferenciou por
3 meio de uma fusão em tandem (Cioffi & Bertollo, 2010).

4 Vários estudos envolvendo o mapeamento de DNAs repetitivos trouxeram avanços sobre
5 a composição molecular e os mecanismos que levaram à diferenciação dos cromossomos
6 sexuais em *H. malabaricus*. Diferentes famílias de DNA repetitivos (genes ribossomais, DNAs
7 satélite, retroelementos e microssatélites) foram caracterizados como componentes destes
8 cromossomos (Cioffi et al. 2009b, Rosa et al. 2009; Cioffi & Bertollo, 2010; Cioffi et al.
9 2010a; Cioffi et al. 2011b) destacando, portanto, o papel potencial dessas seqüências de DNA
10 na diferenciação dos cromossomos sexuais entre os peixes (Nanda et al. 1990; Martins, 2007;
11 Cioffi et al. 2011a).

12 Análises de pintura cromossômica, utilizando sondas cromossomo-específicas, têm
13 contribuído para aprofundar o conhecimento dos cromossomos supranumerários e sexuais,
14 assim como dos processos evolutivos entre as espécies com a identificação de vários rearranjos
15 cromossômicos (Jauch et al. 1992; Shetty et al. 1999; Griffin et al. 2007, Ferguson-Smith &
16 Trifonov, 2007; Stanyon et al. 2008; Teruel et al. 2009; Yang & Graphodatsky, 2009, Cioffi et
17 al. 2011b, entre outros). No entanto, a utilização da pintura cromossômica ainda é limitada
18 devido às dificuldades para obtenção de sondas, como ocorre nos peixes. De fato, poucos
19 estudos de pintura cromossômica utilizando sondas de cromossomo totais foram realizados
20 neste grupo de animais (Reed et al. 1995; Phillips et al. 2001, 2007; Diniz et al. 2008; Henning
21 et al. 2008; Ráb et al. 2008; Wang et al. 2009; Nagamachi et al. 2010, Cioffi et al. 2011b).

22 Neste sentido, realizamos experimentos de pintura cromossômica em *H. malabaricus*,
23 utilizando sondas específicas de cromossomos sexuais, na tentativa de realizar um estudo mais

1 pormenorizado sobre a origem e evolução desses cromossomos. Os cromossomos X e X₁ dos
2 cariomorfos B e D, respectivamente, foram microdissectados e usados em análises de FISH nos
3 cariomorfos A, B, C e D. Os resultados possibilitaram avançar no conhecimento dos processos
4 atuantes sobre a evolução dos cromossomos sexuais, além de revelar origens independentes
5 dentro de uma mesma espécie nominal. Possíveis mecanismos atuantes nestes procesos também
6 são discutidos.

7 **Materiais e Métodos**

8 Espécimes e preparação cromossômica

9 Machos e fêmeas de *H. malabaricus* pertencentes aos cariomorfos A e B foram
10 provenientes do rio do Pântano (Descalvado, São Paulo, Brasil) e da bacia do rio Doce (Parque
11 Florestal do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. Machos e fêmeas de *H.*
12 *malabaricus* pertencentes aos cariomorfos C e D foram provenientes do rio Bento Gomes
13 (Poconé, Mato Grosso, Brasil) e do córrego Monjolinho (São Carlos, Estado de São Paulo,
14 Brasil), respectivamente. Os espécimes foram depositados na coleção de peixes do Laboratório
15 de Citogenética, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos.
16 Os experimentos seguiram os protocolos éticos e anestesia foi utilizada antes do sacrifício dos
17 animais. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensões celulares do rim
18 anterior, utilizando o método de secagem ao ar convencional (Bertollo et al. 1978)

19 Microdissecção cromossômica

20 Quinze cópias do cromossomo X do cariomorfo B e 18 cópias do cromossomo X₁ do
21 cariomorfo D foram microdissectados (**Figura 1**), utilizando a metodologia previamente
22 descrita por Yang et al. (2009), com pequenas adaptações. Diferentemente do cromossomo X,

1 facilmente identificável após coloração convencional com Giemsa, o cromossomo X₁
2 necessitou da coloração com Cromomicina A₃ para permitir sua identificação precisa pela
3 visualização de um bloco heterocromático GC-rico, exclusivo, adjacente à região centromérica
4 do braço longo.

5 Resumidamente, as suspensões cromossômicas foram aplicadas sobre lamínulas pré-
6 limpas, e submetidas à coloração Giemsa convencional ou com Cromomicina A₃. A
7 microdissecção foi realizada utilizando um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 135), com
8 uma agulha estéril de vidro acoplada a um micromanipulador mecânico (Zeiss). As agulhas de
9 vidro foram preparadas com um *puller* modelo PB-7 (Narishige, Japão) e os cromossomos
10 foram transferidos para uma micropipeta contendo uma solução de coleta (10 mM Tris-HCl pH
11 7.5, 10 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA pH 7.5-8.0, 0.1% Triton X-100, 1.44 mg/ml
12 proteinase K e 30% glicerol). Esta solução foi posteriormente transferida para um tubo
13 Eppendorf 0,5 ml, contendo 0,63 µl de tampão Sequenase (USB), 0,4 µl de 0,2 mM dNTPs, 0,6
14 µl de 40 mM do primer DOP (5 '-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') e 3,37 µl de água
15 por amostra. Os primeiros 8 ciclos de DOP-PCR foram realizados utilizando a sequenase T7
16 DNA polimerase (USB, Cleveland, EUA), sob o seguinte programa: 90°C por 1 min, 25°C por
17 2 min e 34°C por 2 min. Uma etapa inicial de desnaturação a 92°C por 5 minutos foi incluído
18 para inativar a proteinase K. Um mix de sequenase (0,2 µl) contendo 12 U µl⁻¹ T7 DNA
19 polimerase e 1,75 µl de tampão Sequenase foi adicionado a cada ciclo durante o tratamento
20 térmico. O volume de reação foi aumentado para 50 µl pela adição de 0,1 U de Taq polimerase,
21 0,2 mM dNTPs, 20 mM de primer DOP, 25 mM MgCl₂ e 34,23 µl de água para PCR.
22 Posteriormente, 33 ciclos adicionais foram realizados com o seguinte programa: 92 °C por 1
23 min, 56 °C por 2 min, 72 °C por 2 min e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. As duas

1 sondas obtidas estão sendo identificadas como Hm-X (sonda do cromossomo X do cariomorfo
2 B) e Hm-X1 (sonda do cromossomo X₁ do cariomorfo D).

3 Hibridização fluorescente in situ

4 A sonda Hm-X foi marcada por PCR com biotina-dUTP (Roche) e a sonda Hm-X₁ foi
5 marcada com Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove, EUA) utilizando o primer DOP
6 e 1 µl dos produtos da DOP-PCR primária como DNA molde. As análises de FISH foram
7 realizadas nos cromossomos metafásicos de *H. malabaricus* (cariomorfos A- D). As lâminas
8 foram preparadas e pré-tratadas conforme descrito anteriormente (Yang et al. 2009) e
9 desnaturados com formamida 70% em 2xSSC por 3 min a 72 °C. Para cada lâmina, 12 µl da
10 solução de hibridização (contendo 0,2 µg de cada sonda marcada, formamida 50%, 2xSSC,
11 sulfato de dextrano 10% e 5 mg de DNA de esperma de salmão) foi desnaturada por 10
12 minutos a 75 °C e uma pré-hibridização realizada por 1 hora a 37°C. As amostras foram então
13 hibridizadas durante 16 horas a 37 °C em câmara úmida. Na pós-hibridização, as amostras
14 foram lavadas com detergente 0.4 x SSC/0.3% Igepal (SIGMA) por 5 min a 73 °C e 2x
15 SSC/0.1% Igepal por 30seg à temperatura ambiente. A sonda biotilada Hm-X foi detectada
16 com avidina-FITC (Vector Labs, EUA). As lâminas foram contracorados com DAPI e
17 montadas em uma solução de *antifading* (Vectashield da Vector laboratórios). Vinte
18 metáfaseses por cariomorfo foram fotografados com uma câmera digital CCD (Olympus DP70)
19 acoplada a um microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

20 **Resultados**

21 A sonda específica do cromossomo X do cariomorfo B (Hm-X) pintou completamente os
22 cromossomos sexuais, tanto nas fêmeas como nos machos do cariomorfo B (**Figura 2a, b**). As
23 regiões heterocromáticas situadas nos braços longos de ambos os cromossomos X e Y

1 apresentaram sinais mais intensos de hibridização devido ao elevado número de seqüências de
2 DNA repetidas, acumuladas nessa região. As regiões eucromáticas apresentaram um sinal
3 uniforme de hibridização, demonstrando a existência de um elevado nível de similaridade
4 destas regiões entre os dois cromossomos sexuais (**Figura 2a, b**). Quando aplicada no
5 cariomorfo A, a sonda Hm-X pintou dois pequenos cromossomos submetacêntricos em ambos
6 os sexos (**Figura 2c, d**). Este par também mostrou sinais mais intensos presentes nas regiões
7 heterocromáticas terminais dos braços longos, como verificado nos cromossomos sexuais do
8 cariomorfo B (Figura 2c, d).

9 A sonda específica do cromossomo X_1 do cariomorfo D (Hm- X_1) pintou completamente
10 os cromossomos X_1 tanto em fêmeas como em machos, como também o braço curto e cerca da
11 metade do braço longo do cromossomo neo-Y do mesmo cariomorfo (**Figura 3a, b**). No
12 entanto, nenhum sinal de hibridização foi evidenciado no cromossomo submetacêntrico X_2 . Da
13 mesma forma, ambos os cromossomos X e Y também foram inteiramente pintados nos
14 cariótipos dos machos e das fêmeas do cariomorfo C (**Figura 3c, d**).

15 Experimentos de pintura recíproca evidenciaram que a sonda Hm- X_1 hibridizou
16 totalmente um par submetacêntrico de tamanho mediano nos cariomorfos A e B (**Figura 2a-d**),
17 enquanto que a sonda Hm-X hibridizou em um par submetacêntrico relativamente pequeno nos
18 cariomorfos C e D (**Figura 3a-d**). Além disso, esta última sonda mostrou um sinal mais
19 intenso nas regiões terminais dos menores cromossomos submetacêntricos em ambos os
20 cariomorfos. Destacadamente, nenhum dos cromossomos sexuais presentes nos cariomorfos B,
21 C e D exibiram sinais de hibridização após os experimentos de “*cross-FISH*”.

1 Em todos os casos, sinais de hibridização fracos foram também detectados em vários
2 pares autossômicos, demonstrando que os genomas de todos os cariomorfos compartilham
3 algumas seqüências repetitivas.

4 **Discussão**

5 Este estudo teve como objetivo determinar a origem e as relações evolutivas entre os
6 diferentes sistemas de cromossomos sexuais presentes na espécie nominal, *H. malabaricus*.
7 Nesta espécie, o cariomorfo B é caracterizado pela presença de um sistema de cromossomos
8 sexuais XY bem diferenciado. O cromossomo X, subtelocêntrico, é facilmente reconhecido por
9 um bloco heterocromático conspícuo presente no braço longo, que acumulou seqüências
10 repetitivas de DNA (Born & Bertollo 2000; Cioffi et al. 2010a). A sonda Hm-X pintou
11 totalmente este cromossomo, apresentando sinais de hibridação intensos sobre a maior parte de
12 seu braço longo heterocromático. De fato, como o cromossomo X acumulou um elevado
13 número de elementos repetitivos, isso pode explicar os sinais de hibridação mais fracos
14 localizados em vários outros cromossomos do cariótipo, evidenciando assim seqüências
15 compartilhadas por esses cromossomos.

16 Os cariomorfos A e B são formas cariotípicas estreitamente relacionadas, com indicações
17 de que o último foi derivado do primeiro pela diferenciação de um sistema de cromossomos
18 sexuais XY (Bertollo et al. 2000; Cioffi et al. 2010a). A sonda Hm-X pintou totalmente um
19 pequeno par submetacêntrico no cariomorfo A, comprovando a proposta de que o menor par
20 autossômico do cariomorfo A (cromossomo 21) e os cromossomos XY de cariomorfo B
21 poderiam ser relacionados, considerando seqüências de DNA compartilhadas por esses
22 cromossomos (Cioffi et al. 2010a). Assim sendo, este pequeno par submetacêntrico

1 (cromossomo 21) é de fato o mais forte candidato a ser o par sexual homomórfico do
2 cariomorfo A, a partir do qual se originou o presente sistema XY bem diferenciado do
3 cariomorfo B por um enriquecimento exclusivo de DNAs repetitivos no cromossomo X,
4 aumentando o braço longo desse cromossomo neste processo de diferenciação (Cioffi et al.
5 2010a) (**Figura 4**).

6 Cromossomos sexuais XY nascentes estão presentes no cariomorfo C, onde os
7 cromossomos X e Y diferem por uma amplificação pequena, mas significativa, de DNAs
8 repetitivos no cromossomo X (Cioffi & Bertollo, 2010). Assim, a sonda Hm-X1 pintou
9 completamente ambos os cromossomos X e Y, demonstrando o alto nível de semelhança ainda
10 existente entre os cromossomos.

11 Quando aplicada no cariomorfo D, a sonda Hm-X1 hibridizou em ambos os cromossomos
12 X₁ das fêmeas. Nos machos, a hibridização ocorreu apenas no cromossomo X₁ ímpar e na
13 metade do cromossomo neo-Y, mas nenhum sinal de hibridização foi verificado no
14 cromossomo X₂. Estes resultados confirmam fortemente as relações evolutivas entre os
15 cromossomos sexuais dos cariomorfos C e D. De fato, dados anteriores com base nas
16 características cariotípicas e distribuição de elementos repetitivos sugeriram uma maior
17 proximidade evolutiva entre estes cariomorfos e a provável correlação entre os seus
18 cromossomos sexuais (Cioffi et al. 2009a; Cioffi & Bertollo, 2010). Os resultados atuais
19 evidenciam claramente a origem do sistema sexual múltiplo X₁X₂Y por uma fusão em tandem
20 entre o cromossomo Y ancestral, presente no cariomorfo C, e um autossomo, originando o
21 grande cromossomo neo-Y característico do cariomorfo D. A região do neo-Y não hibridizada
22 pela sonda Hm-X₁ corresponde ao elemento homólogo ao cromossomo X₂ (também não
23 hibridizado), que não apresenta homologia com o cromossomo X₁ (**Figura 4**).

1 A supressão da recombinação em torno de um provável loco sexo determinante, presente
2 nos proto-cromossomos sexuais, pode ter permitido a subsequente heterocromatização nos
3 cromossomos X dos cariomorfos B e C por um enriquecimento de seqüências de DNAs
4 repetitivos. Este processo, no entanto, deve ter sido desencadeado mais tardiamente no
5 cariomorfo C, uma vez que seus cromossomos XY encontram-se ainda morfologicamente
6 indiferenciados, em um estágio precoce de diferenciação.

7 A falta de sinais de hibridização nos cromossomos sexuais, após os experimentos de
8 pintura recíproca entre os cariomorfos, destacou que os cromossomos XY dos cariomorfos B e
9 C evoluíram independentemente em *H. malabaricus*, onde distintos pares autossômicos foram
10 diferenciados em cromossomos sexuais. Além disso, rearranjos cromossômicos adicionais
11 envolvendo os cromossomos sexuais e outros autossomos originaram o sistema de
12 cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y presente no cariomorfo D (**Figura 4**).

13 Assim, como acontece com *H. malabaricus*, alguns outros grupos de peixes também
14 apresentam diferentes cromossomos sexuais entre espécies estreitamente relacionadas (Phillips
15 et al. 2001; Woram et al. 2003; Peichel et al. 2004;. Henning et al. 2008). No peixe elétrico
16 *Eigenmannia* a pintura cromossômica também foi resolutive para evidenciar a origem
17 independente dos sistemas de cromossomos sexuais presentes em duas espécies relacionadas
18 (Henning et al. 2008, Henning et al. 2010). Resultados similares foram também encontrados
19 entre os peixes salmonídeos, em que uma sonda específica para o cromossomo Y de *Salvelinus*
20 *namaycush* hibridizou com dois diferentes pares autossômicos de *Oncorhynchus mykiss* e *O.*
21 *tshawytscha*, evidenciando a falta de homologia entre os cromossomos sexuais desses dois
22 gêneros intimamente relacionados (Phillips et al. 2001). A determinação do sexo também se
23 apresenta complexa entre os peixes “sticklebacks”, da família Gasterosteidae, onde algumas

1 espécies apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, juntamente com os outras com
2 cariótipos homomórficos entre os sexos (Bell & Foster, 1994; Filatov, 2005).

3 Cromossomos sexuais se originam após a aquisição de um alelo sexo-determinante em
4 um par autossômico (Muller, 1914) e se diferenciam pelo acúmulo de alelos sexualmente
5 antagonistas (que são vantajosos para apenas um sexo) em locos estreitamente ligados à região
6 sexo determinante (Fisher, 1931; Bull, 1983, Rice, 1987). A seleção favorece a restrição desses
7 loci em um dos sexos pela supressão da recombinação, o que pode em seguida se espalhar ao
8 longo do cromossomo inteiro (Charlesworth & Charlesworth, 1980, Bull, 1983). Na ausência
9 de recombinação, retrotransposons invadem os cromossomos sexuais, e seqüências repetitivas
10 são amplificadas na região não-recombinante (Charlesworth et al. 1994). A heterocromatina
11 também se acumula, talvez como uma defesa celular contra essa amplificação de elementos
12 transponíveis (Steinemann & Steinemann, 2005). Nossos resultados indicam que diferentes
13 pares autossômicos poderiam conter regiões ou genes determinantes do sexo em *H.*
14 *malabaricus*, sugerindo que locos múltiplos podem assumir o controle da determinação do sexo
15 em peixes. Estes genes poderiam estar localizados em diferentes pares de cromossomos,
16 envolvidos em uma via gênica ancestral primária, flexível, associada à diferenciação sexual.
17 Uma vez que um desses pares inicia o processo de diferenciação como cromossomo sexual, o
18 gene ou genes ligados nesta via poderiam adquirir o papel principal na determinação do sexo. A
19 análise de mapas de ligação identificou uma única região cromossômica principal em
20 *Gasterosteus aculeatus* que controla a determinação do sexo, mas espécies estreitamente
21 relacionadas utilizam diferentes genes principais na determinação do sexo, sugerindo que estas
22 vias de desenvolvimento podem evoluir muito rapidamente entre as espécies de “sticklebacks”
23 (Peichel et al. 2004). Esses resultados destacam que uma variedade de mecanismos de

1 determinação sexual e de cromossomos sexuais evoluíram independentemente em diferentes
2 grupos de peixes.

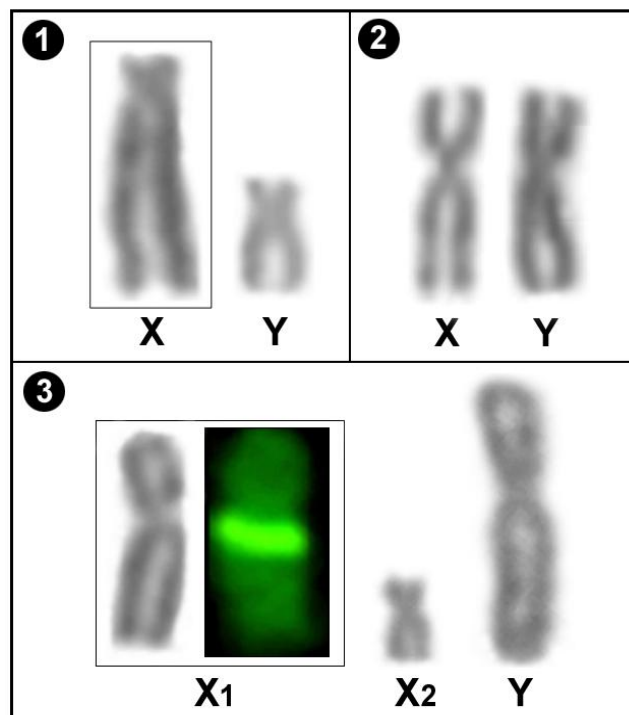
3 Outra explicação plausível para as origens independentes dos cromossomos sexuais em
4 peixes é que diferentes genes primários de determinação sexual podem ter evoluído em
5 cromossomos diferentes, onde um gene autossômico ou uma cópia duplicada do gene adquiriu
6 uma nova mutação e deu origem a vias de desenvolvimento que originam machos ou fêmeas,
7 resultando em um novo gene de determinação sexual e de cromossomos sexuais originados a
8 partir de diferentes autossomos (Kondo et al. 2004). Por exemplo, o medaka *Oryzias latipes*
9 tem um sistema de cromossomos sexuais XY no qual um gene com alta similaridade ao *Dmrt1*
10 foi encontrado e apontou ser um excelente candidato para o gene principal de determinação
11 sexual masculinizante (Nanda et al. 2002). Foi demonstrado que uma região que contém o gene
12 *Dmrt1*, localizado no grupo de ligação autossômico 9, foi duplicada e todo o fragmento foi
13 inserido em outro cromossomo, que agora se comporta como o cromossomo Y nesta espécie.
14 No entanto, a evolução de novos cromossomos sexuais também pode estar relacionada com a
15 aquisição de novos genes. A ativação de genes não-relacionados de determinação sexual em
16 autossomos também poderia ser um possível mecanismo para a origem independente de
17 cromossomos sexuais em linhagens diferentes de peixes, como proposto para a evolução dos
18 cromossomos sexuais não-homólogos presentes em peixes salmonídeos (Woram et al. 2003).
19 Assim, em *H. malabaricus* pode ter evoluído rapidamente uma variedade de genes de
20 determinação sexual, de tal forma que, mesmo em formas cariotípicas muito próximas
21 pertencentes à mesma espécie nominal, cromossomos sexuais independentes tenham se
22 originado a partir de diferentes pares autossômicos.

1 Os resultados auxiliaram na compreensão dos processos evolutivos que atuam sobre os
2 distintos sistemas de cromossomo sexuais presentes em *H. malabaricus*, deixando claro suas
3 origens a partir de pares autossômicos não-homólogos. Além disso, este grupo de eritrínídeos
4 provou ser um sistema muito informativo, proporcionando uma boa oportunidade para estudar
5 a evolução dos cromossomos sexuais e a determinação do sexo. Novas investigações focando
6 nas regiões de determinação do sexo serão importantes para desvendar os mecanismos
7 moleculares associados com os diferentes sistemas de cromossomos sexuais, bem como os
8 diferentes genes de determinação sexual provavelmente presentes nos peixes. Como esperado,
9 os peixes parecem ser excelentes modelos para analisar a evolução dos cromossomos sexuais e
10 a genética da determinação do sexo, fornecendo informações importantes sobre estes processos
11 para os vertebrados como um todo.

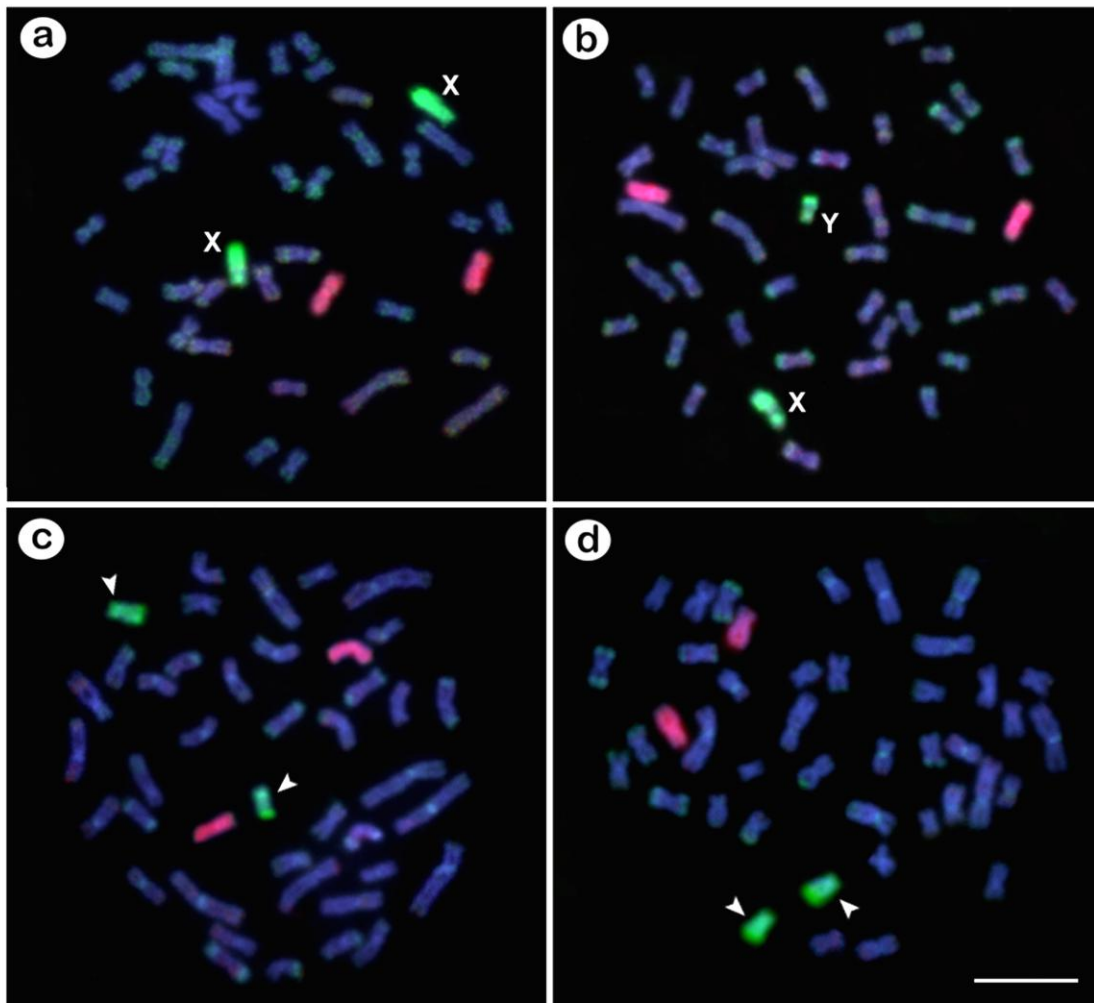
12 **Referências Bibliográficas**

13 As referencias bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

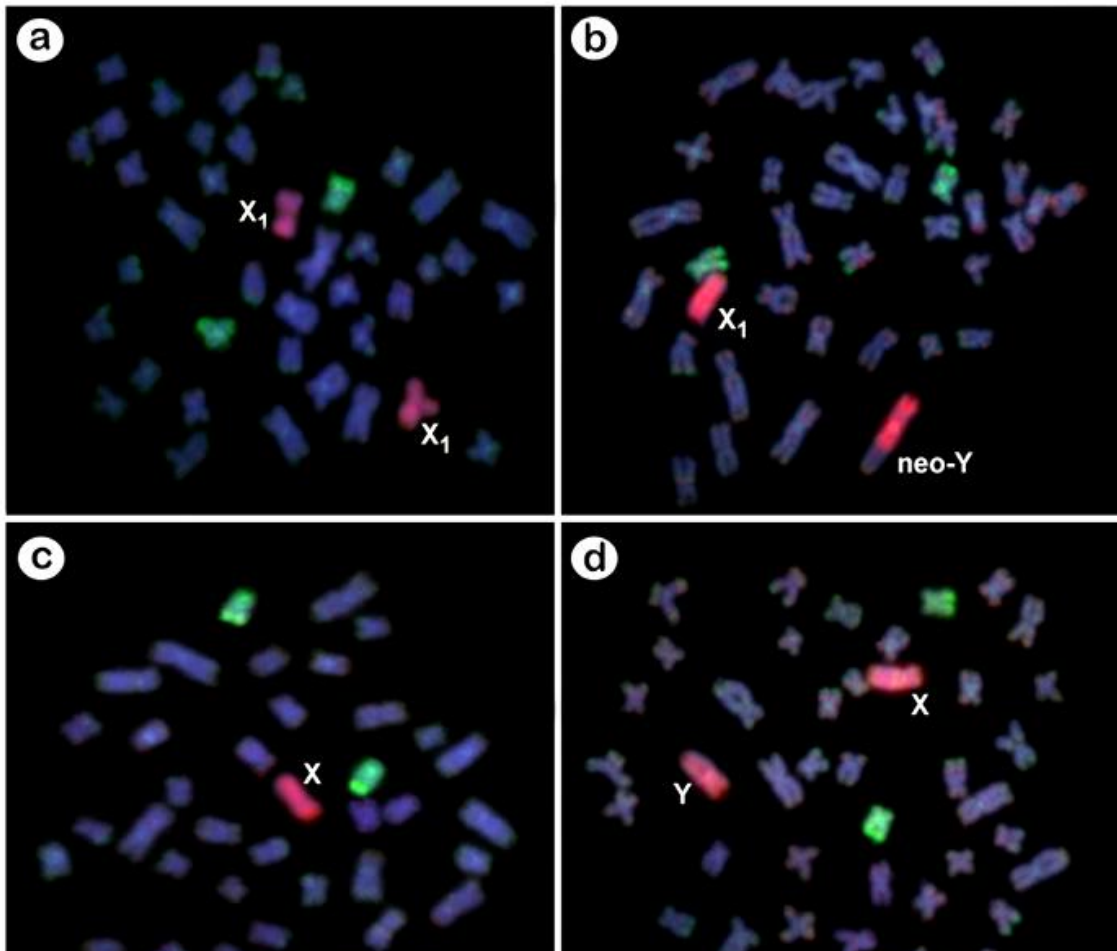
Figuras



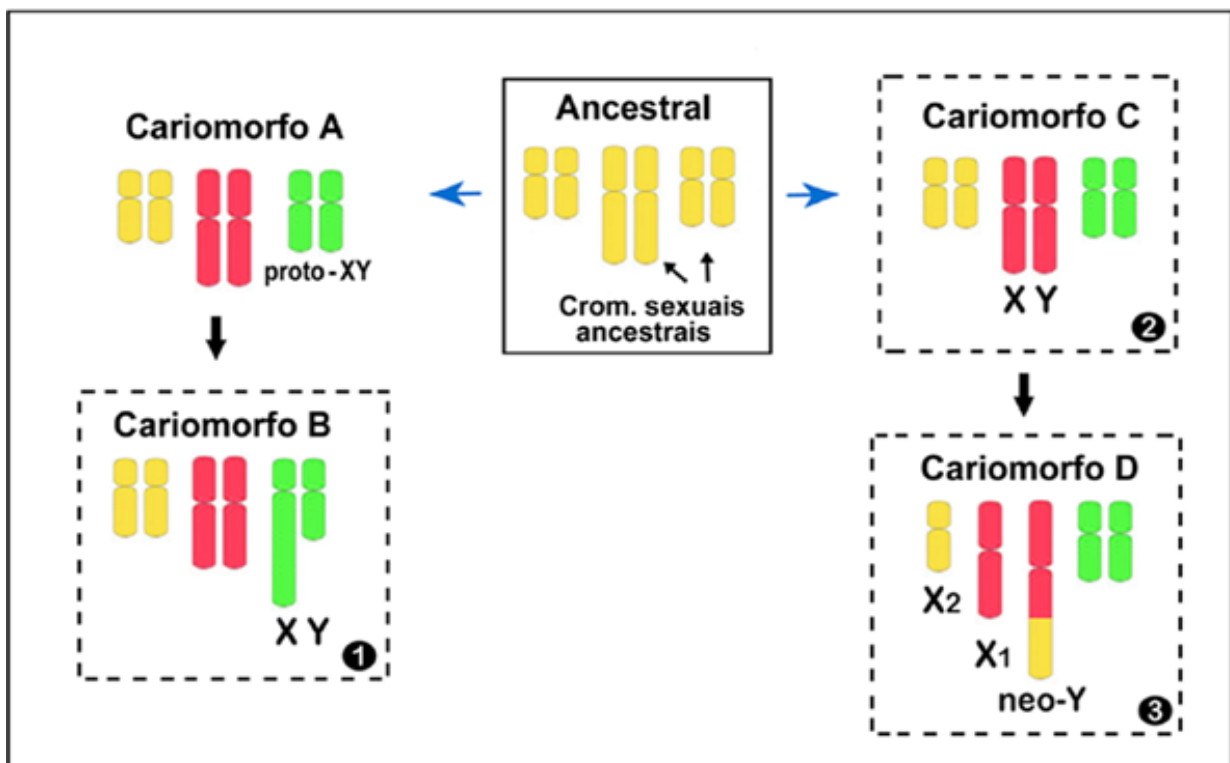
1 **Figura 1.** Cromossomos sexuais presentes em *Hoplias malabaricus*. (1) cromossomos XY
2 altamente diferenciados do cariomorfo B; (2) cromossomos sexuais XY nascentes do
3 cariomorfo C; (3) cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y do cariomorfo D. Detalhe do
4 cromossomo X_1 corado com Cromomicina A_3 , evidenciando o segmento heterocromático GC-
5 positivo que permite sua precisa identificação. Os cromossomos sexuais que foram
6 microdissectados e utilizados para a construção de sondas para experimentos de FISH
7 encontram-se destacados.



- 1 **Figura 2.** Pintura cromossômica cruzada com as sondas Hm-X (verde) e Hm-X1 (vermelho).
- 2 Cromossomos de fêmeas (a) e machos (b) do cariomorfo B ($2n=42$, XX/XY) e de fêmeas (c) e
- 3 machos (d) do cariomorfo A ($2n=42$) de *Hoplias malabaricus*. As cabeças de seta indicam os
- 4 prováveis cromossomos sexuais do cariomorfo A. Barra = 5 μ m.



1 **Figura 3.** Pintura cromossômica cruzada com as sondas Hm-X (verde) e Hm-X1 (vermelho).
2 Cromossomos de fêmeas (a) e machos (b) do cariomorfo D ($2n = 40/39, X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$) e
3 de fêmeas (c) e machos (d) do cariomorfo C ($2n=40, XX/XY$) de *Hoplias malabaricus*. A
4 extensão não pintada do cromossomo neo-Y corresponde ao homólogo ancestral do
5 cromossomo X_2 , que carece de homologia com as seqüências presentes no cromossomo X_1 .
6 Barra = 5 μ m.



1 **Figura 4.** Diagrama esquemático mostrando a derivação dos sistemas de cromossomos sexuais
2 dos cariomorfos B, C e D de *Hoplias malabaricus*, evidenciado pelos experimentos de pintura
3 de cromossômica com as sondas Hm-X e Hm-X₁. Distintos proto-cromossomos sexuais
4 estiveram provavelmente presente na forma cariotípica ancestral, a partir do qual os
5 cromossomos sexuais XY evoluíram em, pelo menos, duas condições independentes. (1) Os
6 cromossomos sexuais XY, altamente diferenciados do cariomorfo B, foram derivados do par de
7 cromossomos primitivos do cariomorfo A pelo acúmulo de seqüências repetitivas de DNA no
8 cromossomo X, distendendo o seu braço longo durante o processo de diferenciação. Embora os
9 cromossomos XY não sejam citologicamente diferenciáveis no cariomorfo A, presume-se que
10 seja o pequeno par submetacêntrico pintado com a sonda Hm-X. (2) Os cromossomos sexuais
11 XY nascentes do cariomorfo C, ainda pouco diferenciados morfologicamente, diferindo
12 ligeiramente pela ampliação de algumas seqüências repetitivas no cromossomo X. (3) O
13 sistema de cromossomos sexuais múltiplos X₁X₂Y do cariomorfo D foi originado através de
14 uma fusão em tandem entre o cromossomo Y e um autossomo, dando origem ao grande
15 cromossomo neo-Y. O segmento não pintado do cromossomo neo-Y corresponde ao homólogo
16 ancestral do cromossomo X₂, que não apresenta homologia com o cromossomo X₁. Os
17 cromossomos pintados com as sondas Hm-X e Hm-X₁ estão indicados em verde e vermelho,
18 respectivamente.

Capítulo 7

O papel contrastante de heterocromatina na diferenciação dos cromossomos sexuais. Uma visão em peixes Neotropicais

Cioffi MB, Almeida-Toledo LF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC
Journal of Fish Biology (in press)

Resumo

19 Durante o processo de evolução dos cromossomos sexuais a supressão ou restrição parcial da
20 recombinação entre o par sexual corresponde à uma regra fundamental. Dados obtidos a partir
21 de organismos filogeneticamente distintos revelam que esse fenômeno é frequentemente
22 associado com o acúmulo de heterocromatina nos cromossomos sexuais. Para melhor explorar
23 esta associação, espécies de peixes emergem como excelentes modelos, uma vez que

1 apresentam cromossomos sexuais muito mais “jovens” em comparação com os vertebrados
2 superiores e muitos outros organismos, sendo possível seguir os seus passos de diferenciação.
3 Em várias espécies de peixes Neotropicais a heterocromatinização, acompanhada por
4 amplificação de repetições *em tandem*, representa um passo importante na diferenciação
5 morfológica de sistemas simples de cromossomo sexuais, especialmente no sistema ZZ/ZW.
6 No entanto, o papel da heterocromatina na diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais
7 múltiplos contrasta com o que ocorre na diferenciação dos sistemas simples, onde nenhum
8 acúmulo de heterocromatina se destaca nos cromossomos. Assim, o estágio inicial da
9 diferenciação dos cromossomos sexuais parece estar associado com os rearranjos
10 cromossômicos nos sistemas múltiplos ou com o acúmulo de heterocromatina nos sistemas
11 simples. Nesta revisão, está sendo destacado este papel contrastante da heterocromatina na
12 diferenciação de cromossomos sexuais simples e múltiplos, utilizando alguns modelos de
13 peixes Neotropicais, destacando o seu surpreendente dinamismo evolutivo.

14 **I. Os peixes como modelos para estudar a diferenciação de cromossomos sexuais**

15 A heterocromatina, um componente parcial do genoma, pode ser diferenciada em
16 constitutiva e facultativa (Brown, 1966). Na realidade, a heterocromatina facultativa
17 corresponde à fração da eucromatina que assume, temporariamente, algumas das propriedades
18 específicas das regiões heterocromáticas, ou seja, a heteropicnose positiva durante a intérfase e
19 a replicação tardia na fase S do ciclo celular (Kasahara, 2009). Diferentemente, a
20 heterocromatina constitutiva corresponde a uma classe altamente repetitiva da cromatina que se
21 apresenta permanentemente condensada durante toda a intérfase. Neste artigo, o termo
22 heterocromatina será empregado exclusivamente no tocante à heterocromatina constitutiva.

23 Os cromossomos sexuais e sua diferenciação representam um dos pontos mais
24 interessantes da genética evolutiva. Durante a evolução dos cromossomos sexuais, uma regra
25 geral deve ser seguida: a supressão ou restrição parcial da recombinação entre o par sexual.
26 Dados obtidos a partir de organismos filogeneticamente muito distintantes mostram que este

1 fenômeno é freqüentemente associado com o acúmulo de heterocromatina nos cromossomos
2 sexuais (Nanda et al. 2000; Kondo et al. 2004; Peichel et al. 2004; Marchal et al. 2004;
3 Charlesworth et al. 2005; Ezaz et al. 2009; Kejnovsky et al. 2009b; Cioffi & Bertollo, 2010).

4 Muitas espécies apresentam cromossomos sexuais heteromórfios, o que implica na
5 presença de diferenças entre os cariótipos de machos e fêmeas. Nos mamíferos, por exemplo, o
6 sistema XX/XY (com fêmeas XX e machos XY) se apresenta como característico, enquanto
7 que nas aves e serpentes o sistema ZZ/ZW (com fêmeas ZW e machos ZZ) é o que se destaca.
8 Em ambos estes sistemas, os cromossomo sexuais específicos (Y ou W) são geralmente
9 menores do que os cromossomos X e Z, apresentando-se degenerados e/ou inteiramente
10 heterocromáticos. Entretanto, cromossomos sexuais ainda homomórficos são encontrados em
11 várias outras espécies, como em muitos répteis, plantas, anfíbios e na maioria das espécies de
12 peixes.

13 Especificamente em relação aos peixes, os sistemas de cromossomos sexuais mostram-se
14 diversificados. Sistemas ZZ/ZW e XX/XY são os mais comuns, mas vários outros casos, tais
15 como XX/XO, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e XX/XY_1Y_2 têm sido descritos, incluindo a presença de
16 distintos cromossomos sexuais dentro de uma mesma espécie nominal (Devlin & Nakayama,
17 2002). Uma das espécies melhores estudadas é o platyfish, *Xiphophorus maculatus*, na qual
18 uma variedade de cromossomos sexuais coexiste em uma população (Nanda et al. 2000; Volff
19 & Schartl, 2001). Além disso, juntamente com cromossomos sexuais heteromórficos bem
20 diferenciados, outros em estado ainda nascente podem ser encontrados, bem como sistemas de
21 cromossomos sexuais distintos entre espécies cogenéricas ou mesmo populações de uma
22 mesma espécie (Almeida-Toledo & Foresti, 2001; Bertollo et al. 2000; Cioffi & Bertollo,
23 2010).

1 Assim, para compreender melhor a associação da heterocromatina com a diferenciação
2 dos cromossomos sexuais, espécies de peixes emergem como modelos excelentes, uma vez que
3 apresentam cromossomos sexuais muito mais jovens em comparação com os vertebrados
4 superiores e muitos outros organismos, sendo possível seguir os seus passos de diferenciação.
5 Isso faz dos peixes, o grupo mais antigo de vertebrados, um bom modelo para seguir a
6 diferenciação dos cromossomos sexuais em vertebrados, partindo da ausência de cromossomos
7 sexuais diferenciados para diversos estágios de diferenciação. Neste sentido, esta revisão tem
8 como objetivo aprimorar o conhecimento sobre o papel da heterocromatina na diferenciação
9 dos distintos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos, com base em estudos
10 realizados em alguns modelos de peixes Neotropicais.

11 **II. Sistemas simples de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais**

12 *Sistemas em estágios iniciais de diferenciação*

13 Alguns sistemas simples de cromossomos sexuais podem ser evidenciados por um
14 acúmulo diferencial de heterocromatina em cromossomos ainda morfologicamente
15 indiferenciados. Este cenário é bem ilustrado em algumas espécies de Poeciliidae, que podem
16 apresentar tanto um sistema de cromossomos sexuais XX/XY ou ZZ/ZW. Nestas espécies, os
17 cromossomos sexuais não podem ser caracterizados pela coloração convencional, mas podem
18 ser identificados por um bloco heterocromático diferencial, rico em seqüências de DNAs
19 repetitivos, localizado na região telomérica dos cromossomos Y e W. Embora esta região
20 heterocromática esteja também presente nos cromossomos X e Z, ela ocorre em quantidade
21 mais discreta, sugerindo que o acúmulo de DNAs repetitivos está relacionado com a
22 diferenciação inicial dos cromossomos sexuais (Haaf & Schmid, 1984; Nanda et al. 1990).
23 Uma situação semelhante é também encontrada no peixe *Hoplias malabaricus*, apresentando

1 um sistema de cromossomos sexuais XY em estágio inicial de diferenciação, onde os
2 cromossomos X e Y diferem por uma amplificação pequena, mas significativa, de DNAs
3 repetitivos no cromossomo X. No entanto, esta sutil diferenciação não modifica a morfologia
4 geral deste par sexual, reforçando assim a condição nascente deste sistema sexual (Cioffi &
5 Bertollo, 2010). No sistema XY nascente no “platyfish” *X. maculatus*, a expansão de uma
6 repetição específica (XIR) foi um dos primeiros eventos moleculares associados com a
7 divergência do cromossomo Y e a supressão da recombinação na região que contém o locus
8 sexo-determinante (Nanda et al. 2000).

9 Além desses exemplos entre espécies Neotropicais, a diferenciação inicial dos
10 cromossomos sexuais já foi igualmente reconhecida em outros grupos de peixes. Este é o caso
11 do “stickleback” *Gasterosteus aculeatus*, bastante estudado, cujo cromossomo Y nascente
12 carrega uma pequena região específica do sexo masculino, tendo já perdido genes ativos e
13 acumulado mutações, deleções e muitas inserções (Peichel et al. 2004). Da mesma forma, em
14 uma outra espécie amplamente investigada, o “medaka” *Oryzias latipes*, os cromossomos X e
15 Y são homomórficos, sendo apenas distinguidos com o uso de marcadores moleculares
16 específicos (Matsuda et al. 1998).

17 ***Sistemas bem diferenciados, sem a degeneração do cromossomo sexo-específico***

18 Sem dúvida, os cromossomos sexuais morfologicamente mais diferenciados em peixes
19 Neotropicais são os ZW (**Tabela I**). No entanto, ao invés de redução de tamanho, como
20 freqüentemente visto em vertebrados superiores, o cromossomo W sexo-específico é
21 usualmente maior do que o cromossomo Z, como resultado de uma extensa amplificação da
22 heterocromatina. A situação encontrada no gênero *Leporinus* e na família Parodontidae,
23 exemplifica bem esse cenário.

1 *Leporinus* é um gênero da família Anostomidae bastante investigado, que apresenta
2 número conservado de cromossomos ($2n = 54$), com um notável sistema de cromossomos
3 sexuais ZZ/ZW compartilhado por várias espécies (**Tabela I**), contrastando com a maioria das
4 espécies congêneras que apresentam cromossomos sexuais ainda homomórficos. Neste caso,
5 o cromossomo W é o maior no cariótipo, subtelocêntrico, e quase totalmente heterocromático,
6 diferenciando-se amplamente do cromossomo Z que apresenta menor tamanho e apenas a
7 região distal do braço longo heterocromática (**Figura 1**). A semelhança morfológica entre todos
8 os cromossomos Z e W em *Leporinus* (com exceção de *Leporinus* sp.2 - Venere et al. 2004),
9 sugere a origem comum para esses cromossomos (Galetti et al. 1995.), onde a expansão da
10 heterocromatina foi um passo crucial para a diferenciação do sistema (Galetti & Foresti, 1986).
11 No entanto, estudos realizados por Nakayama et al. (1994), utilizando dados moleculares de
12 DNAs repetitivos W-específicos, contestam a origem comum do cromossomo W para todas as
13 espécies *Leporinus* ou, pelo menos, o seu conteúdo heterocromático. Neste sentido, estudos
14 adicionais se fazem necessários para melhor esclarecer esta questão.

15 A família Parodontidae também apresenta um número diplóide conservado ($2n = 54$
16 cromossomos), mas com uma condição mais diversificada no que diz respeito aos sistemas de
17 cromossomos sexuais (**Tabelas I e II**). Enquanto algumas espécies apresentam um sistema
18 sexual ZZ/ZW e ZZ/ZW₁W₂ outras, por sua vez, apresentam cromossomos sexuais ainda
19 indiferenciados. No entanto, assim como no gênero *Leporinus*, todas as espécies ZW
20 compartilham do mesmo processo de diferenciação pelo aumento do conteúdo heterocromático
21 no cromossomo W a partir de um par homomórfico ancestral, levando à ampliação deste
22 cromossomo em relação ao cromossomo Z (**Figura 1**), mas com tamanho distinto entre as
23 espécies. De fato, no gênero *Parodon* o cromossomo W de *P. hilarii* é o maior do cariótipo

1 (Moreira-Filho et al. 1993), enquanto que em *P. moreirai* este cromossomo apresenta um
2 tamanho similar ao primeiro par do cariótipo (Centofante et al. 2002). Por outro lado, no gênero
3 *Apareiodon*, o cromossomo W de *A. vladi*, *A. ibitiensis* e *Apareiodon sp.*, embora mantendo a
4 heterocromatinização de seus braços longos, apresentam tamanho pequeno em comparação
5 com os cromossomos W presentes em outras espécies de Parodontidae (Rosa et al. 2006; Vicari
6 et al. 2006; Bellafronte et al. 2009).

7 ***Sistemas bem diferenciados, com degeneração do cromossomo sexo-específico***

8 O gênero *Triportheus* (Characidae), também destaca o papel relevante da heterocromatina
9 na diferenciação dos cromossomos sexuais. Este gênero compreende espécies de peixes com
10 tamanho relativamente pequeno, onde todos apresentam $2n = 52$ cromossomos e compartilham
11 um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (**Tabela I**). Na verdade, este sistema
12 parece ser uma característica sinapomórfica em *Triportheus* (Artoni et al. 2001), sendo os
13 cromossomos W derivados de um cromossomo ancestral homólogo ao cromossomo Z. No
14 entanto, diferentemente das espécies de *Leporinus* e de Parodontidae, os cromossomos W de
15 *Triportheus* não se diferenciaram pelo aumento do tamanho, mas sim pela sua redução em
16 relação ao cromossomo Z (Falcão, 1988; Artoni et al. 2002). No entanto, enquanto os
17 cromossomos Z de todas as espécies de *Triportheus* são homólogos, os cromossomos W
18 diferem em quantidade de heterocromatina e tamanho entre as distintas espécies (Diniz et al.
19 2008). Além disso, o tamanho do cromossomo W pode variar, desde relativamente semelhante
20 ao cromossomo Z até muito pequeno, bem como quanto a quantidade de heterocromatina que
21 eles apresentam (**Figura 2**). Portanto, a evolução dos cromossomos sexuais em *Triportheus* é
22 mais semelhante ao que ocorre em vertebrados superiores, considerando-se a degeneração do

1 cromossomo sexual específico ao invés de seu aumento de tamanho, como verificado em
2 espécies de *Leporinus* e Parodontidae.

3 Várias espécies de *Characidium* apresentam uma situação semelhante à encontrada em
4 *Triportheus*. Este gênero representa outro grupo Neotropical bem analisado, apresentando um
5 sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde a heterocromatinização parcial ou total do
6 cromossomo W é um traço comum a todas as espécies analisadas (**Tabela I**). Diferenças
7 marcantes também ocorrem entre as espécies, decorrentes de deleções e/ou inversões alterando a
8 morfologia dos cromossomos W (Vicari et al. 2008a; Alves et al. 2010).

9 ***Sistemas bem diferenciados, com diversificação dos cromossomos não sexo-específicos***

10 Acredita-se que o acúmulo de seqüências repetitivas no cromossomo sexual sexo-
11 específico ocorre inicialmente nas proximidades dos genes sexo-determinantes, favorecido pela
12 ausência ou baixa frequência de recombinação nesta região cromossômica. Uma vez iniciada, a
13 supressão da recombinação intensifica o processo de acúmulo de heterocromatina, com o
14 enriquecimento de sequências de DNA repetitivas, gerando diferenças morfológicas e de
15 tamanho entre o par sexual homomórfico ancestral (Bull, 1983). Assim, o aumento do conteúdo
16 heterocromático pode contribuir para a diminuição da recombinação, devido ao seu padrão de
17 replicação tardio em comparação com eucromatina. No entanto, estudos recentes conduzidos
18 nos peixes *H. malabaricus* e *Eigenmannia virescens* trouxeram informações adicionais para
19 esta visão clássica. Ambas as espécies apresentam cariomorfos que possuem um sistema de
20 cromossomos sexuais XY bem diferenciado, em que os cromossomos X são consideravelmente
21 maiores do que os cromossomos Y devido à amplificação da heterocromatina. Assim, em
22 ambos os casos, o aumento da heterocromatina impulsionou a diferenciação dos cromossomos
23 X em vez dos cromossomos Y (**Figura 1**), representando exemplos incomuns de cromossomos

1 X acumulando mais DNAs repetitivos do que os cromossomos Y (Cioffi et al. 2010a; Henning
2 et al. 2011). Pelo menos em *H. malabaricus*, essa ampliação foi acompanhada por um
3 acúmulo diferencial de distintas repetições em tandem que poderiam ter provocado a
4 divergência evolutiva dos cromossomos sexuais e, conseqüentemente, aumentado o tamanho do
5 cromossomo X (Cioffi et al. 2011a). No entanto, o acúmulo de elementos repetitivos no
6 cromossomo X parece não estar correlacionado com a ausência inicial de recombinação.
7 Diferentemente, parece provável que corresponda a uma característica mais tardia do processo
8 de diferenciação morfológica de tais sistemas. Portanto, esses resultados reforçam alguns
9 questionamentos prévios sobre o real papel da heterocromatinização na supressão de
10 recombinação, e se o mesmo seria a causa ou a conseqüência da redução da recombinação.

11

12 **III. Sistemas de cromossomos sexuais múltiplos em peixes Neotropicais**

13 Apesar dos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos ocorrerem em menor frequência
14 comparativamente aos sistemas simples, alguns casos já foram relatados para diferentes
15 espécies de peixes Neotropicais (**Tabela II**). Exemplos bem conhecidos são encontrados entre
16 as espécies da família Erythrinidae, onde um sistema X_1X_2Y é bem caracterizado em
17 *Erythrinus erythrinus* e *H. malabaricus*. Em *E. erythrinus*, o grande cromossomo Y
18 metacêntrico foi originado a partir de uma fusão cêntrica envolvendo dois pares acrocêntricos,
19 dando origem aos cromossomos não pareados X_1 e X_2 presentes no cariótipo dos machos
20 (Bertollo et al. 2004; Cioffi et al. 2010b). Especificamente em *H. malabaricus*, diferentes
21 sistemas de cromossomos sexuais, assim como diferentes estágios de sua diferenciação, podem
22 ser encontrados entre os cariomorfos conhecidos desta espécie. Assim, além dos dois sistemas
23 XX/XY acima mencionados, um terceiro sistema X_1X_2Y também é encontrado (Bertollo et al.

1 2000; Cioffi et al. 2011b). Neste último caso, foi demonstrado que um cromossomo
2 submetacêntrico pequeno, semelhante ao X_2 , encontra-se fusionado em tandem no braço curto
3 de um cromossomo submetacêntrico maior, semelhante ao X_1 , originando o braço longo do
4 grande cromossomo Y característico dos machos (Bertollo et al. 1997). Tanto em *H.*
5 *malabaricus*, bem como em *E. erythrinus*, os cromossomos sexuais múltiplos não exibem uma
6 grande quantidade de heterocromatina (**Figura 1**), indicando a ausência de sua acumulação
7 nesses sistemas.

8 Várias classes de seqüências repetitivas foram mapeadas, por FISH, nos cromossomos
9 sexuais XY bem diferenciados e X_1X_2Y de *H. malabaricus* para uma análise comparativa,
10 sendo evidenciado um padrão de distribuição muito distinto entre estes dois sistemas (Cioffi et
11 al. 2010a, b; 2011a). Assim, enquanto que no sistema XY a região heterocromática distal do
12 cromossomo X acumulou vários tipos de repetições de DNA, estas foram preferencialmente
13 acumuladas apenas nos centrômeros de ambos os cromossomos X_1 e X_2 , bem como nas regiões
14 correspondentes do cromossomo Y no sistema X_1X_2Y (Cioffi et al. 2011b). Além disso, as
15 regiões heterocromáticas dos cromossomos X_1 e X_2 já eram "pré-existent" nos respectivos
16 cromossomos ancestrais, sem um aumento significativo de seu conteúdo após a diferenciação
17 do sistema múltiplo. Este modelo também explica por que quase todas as repetições mapeadas
18 no cromossomo Y têm, aproximadamente, o mesmo padrão de distribuição nas regiões
19 cromossômicas correspondentes dos cromossomos X_1 e X_2 . Assim sendo, após a ocorrência dos
20 rearranjos cromossômicos, aparentemente nenhuma diferenciação adicional ocorreu nos
21 cromossomos sexuais. Portanto, os rearranjos cromossômicos representam, por si só, os passos
22 cruciais na diferenciação dos cromossomos sexuais múltiplos, sem a necessidade de eventos
23 adicionais de heterocromatinização.

1 *Eigenmannia* representa outro modelo interessante, entre os peixes Neotropicais, para
2 estudos de evolução dos cromossomos sexuais. Este gênero também possui uma ampla gama de
3 mecanismos de determinação do sexo, onde sistemas XY, X_1X_2Y e ZW podem ser encontrados
4 entre distintas populações de uma mesma espécie. As espécies de *Eigenmannia* divergiram há
5 cerca de 5 milhões de anos e fusões independentes, envolvendo os mesmos cromossomos,
6 foram identificadas. Fusões cromossômicas deram origem a um sistema de cromossomos
7 sexuais múltiplos X_1X_2Y na espécie *Eigenmannia* sp2 (Henning et al. 2011), enquanto em
8 outra espécie, *E. virescens*, um par de cromossomos sexuais XY divergiu por eventos de
9 heterocromatinização na região distal do cromossomo X. Experimentos de FISH recíprocos
10 entre estas duas espécies, utilizando cromossomos sexuais inteiros como sondas obtidas por
11 microdissecção, sugeriram uma origem independente para os cromossomos sexuais dentro
12 deste gênero (Henning et al. 2008). Assim, de acordo com o observado em *H. malabaricus*, a
13 diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos não envolveu qualquer expansão
14 futura da heterocromatina nos cromossomos, diferentemente do que foi encontrado na
15 diferenciação dos sistemas simples.

16 Vale ressaltar que embora sistemas de cromossomos sexuais ZW sejam mais
17 freqüentemente encontrados entre os peixes Neotropicais, cromossomos sexuais múltiplos
18 derivados deste sistema são extremamente raros, em comparação com aqueles derivados de
19 sistemas XY (**Tabela II**). É muito interessante considerar este fato possivelmente
20 correlacionado com o elevado grau de heterocromatinização presente nos sistemas ZW,
21 comparativamente aos sistemas XY. Assim, enquanto que uma grande heterocromatinização
22 encontra-se usualmente presente nos sistemas ZZ/ZW, tal fato diferentemente não se verifica
23 entre os sistemas XY, apesar de poucos casos bem investigados, onde os cromossomos sexuais

1 são ainda pouco diferenciados ou mesmo em um estado incipiente, sem um acúmulo evidente
2 de heterocromatina (Cioffi & Bertollo, 2010). Uma vez ocorrido o rearranjo entre um
3 cromossomo sexual e um autossomo, originando um novo sistema de cromossomos sexuais
4 múltiplos, um trivalente sexual é também automaticamente originado durante a meiose,
5 necessitando manter-se estável. Assim, se um conteúdo grande de heterocromatina estiver
6 presente em qualquer um dos cromossomos formadores desta complexa estrutura meiótica, ele
7 poderia prejudicar a segregação correta dos cromossomos, sendo provavelmente evitado pela
8 seleção natural. De fato, a estabilidade e a viabilidade de um sistema múltiplo de cromossomos
9 sexuais dependem da correta segregação dos cromossomos a partir do trivalente sexual. Nos
10 machos de *H. malabaricus*, $2n = 39$ cromossomos e portadores de um sistema sexual X_1X_2Y , o
11 emparelhamento correto do trivalente sexual durante a meiose favorece essa estabilidade
12 **(Figura 3)**, levando a um número equilibrado dos gametas esperado, ou seja, $n = 20$ e $n = 19$
13 cromossomos (Bertollo & Mestriner, 1998). Um dos poucos exemplos de cromossomos sexuais
14 múltiplos derivados de um sistema ZW é encontrado no peixe *Apareiodon affinis*, pertencente à
15 família Parodontidae. Esta espécie apresenta um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW_1W_2
16 bem diferenciado, provavelmente originado por uma fissão cêntrica (Moreira-Filho et al. 1980)
17 e, como ocorre com os outros cromossomos sexuais múltiplos, um acúmulo de heterocromatina
18 evidente não é verificado **(Figura 1)**. Assim, este sistema de cromossomos sexuais múltiplos
19 provavelmente se originou de um sistema ZZ/ZW ainda indiferenciado, provavelmente em uma
20 fase incipiente, onde nenhum acúmulo evidente de heterocromatina teria ainda ocorrido, em
21 contraste com a maioria dos demais sistemas ZW (dados não publicados).

22 **IV. Observações finais**

1 Sem dúvida, a heterocromatinização, acompanhada por amplificação de repetições em
2 tandem, parece ser um passo importante na diferenciação morfológica dos sistemas de
3 cromossomos sexuais simples encontrados em peixes Neotropicais. Especialmente nos sistemas
4 ZZ/ZW, além da diferenciação morfológica dos cromossomos W sexo-específicos, este
5 processo possivelmente seja também importante na redução da recombinação entre o par sexual
6 ancestral ainda indiferenciado. Por outro lado, este não parece ser o caso, pelo menos em
7 alguns sistemas, XX/XY, como exemplificado em *H. malabaricus* e *E. virescens*, onde o
8 cromossomo compartilhado por ambos os sexos, ou seja, o cromossomo X, é aquele que é
9 diferenciado pelo acúmulo de heterocromatina.

10 Além disso, o papel da heterocromatina na diferenciação dos sistemas de cromossomos
11 sexuais simples contrasta com o que ocorre na diferenciação dos sistemas múltiplos, nos quais
12 um aumento adicional de heterocromatina não é detectado. Cromossomos sexuais múltiplos
13 geralmente surgem a partir de rearranjos cromossômicos entre cromossomos sexuais
14 ancestrais ainda indiferenciados e autossomos. Ao contrário da supressão gradual de
15 recombinação, como proposto para os sistemas simples, essa redução poderia ser diretamente
16 alcançada a partir dos rearranjos cromossômicos que originaram os respectivos sistemas
17 múltiplos. Rearranjos cromossômicos podem criar novos grupos de ligação entre genes
18 originalmente encontrados em cromossomos diferentes, incluindo genes antagônicos
19 relacionados ao sexo, reduzindo ou suprimindo recombinação em regiões próximas aos pontos
20 de quebra no heterozigoto (Vieira et al. 2003).

21 O objetivo deste estudo de revisão não foi analisar a evolução dos cromossomos sexuais
22 em peixes como um todo, mas apenas focar o papel da heterocromatina na diferenciação de tais
23 cromossomos. Obviamente, os processos ora considerados não necessitam representar uma

1 característica universal entre os peixes mas, como exemplificado no presente estudo, pode ser
 2 bem destacados entre as espécies Neotropicais. Além disso, este cenário pode provavelmente
 3 também ser aplicado a táxons não-relacionadas, tais como plantas (Vyskot & Hobza, 2004),
 4 roedores (Marchal et al. 2004) e insetos (Bressa et al. 2009). No geral, os exemplos focados,
 5 além de deixar claro o papel contrastante da heterocromatina na diferenciação de cromossomos
 6 sexuais simples e múltiplos, também destacam o surpreendente dinamismo evolutivo dos
 7 cromossomos sexuais entre as espécies de peixes.

8 **Referências Bibliográficas**

9 As referencias bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

Tabelas

10 **Tabela I.** Sistemas de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais: Sistemas simples

Espécie	Sistema Sexual	Referências
Anostomidae		
<i>Leporinus elongatus</i>	ZZ:ZW	Galetti Jr. & Foresti, 1986
<i>Leporinus reinhardti</i>	ZZ:ZW	Galetti Jr. & Foresti, 1986
<i>Leporinus macrocephalus</i>	ZZ:ZW	Galetti Jr. & Foresti, 1986
<i>Leporinus trifasciatus</i>	ZZ:ZW	Galetti Jr. <i>et al.</i> , 1995
<i>Leporinus conirostris</i>	ZZ:ZW	Galetti Jr. <i>et al.</i> , 1995
<i>Leporinus obtusidens</i>	ZZ:ZW	Galetti Jr. & Foresti, 1986
<i>Leporinus cf. elongatus</i>	ZZ:ZW	Molina <i>et al.</i> , 1998
<i>Leporinus</i> sp2	ZZ:ZW	Venere <i>et al.</i> , 2004
Characidae		
<i>Triportheus auritus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988
<i>Triportheus</i> cf. <i>auritus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988
<i>Triportheus signatus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988

<i>Triportheus nematurus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988
<i>Triportheus guentheri</i>	ZZ:ZW	Bertollo & Cavallaro, 1992
<i>Triportheus venezuelensis</i>	ZZ:ZW	Nirchio <i>et al.</i> , 2007
<i>Triportheus albus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988
<i>Triportheus paranense</i>	ZZ:ZW	Sánchez & Jorge, 1999
<i>Triportheus angulatus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988
<i>Triportheus trifurcatus</i>	ZZ:ZW	Falcão, 1988
<i>Serrapinnus notomelas</i>	ZZ:ZW	Santi-Rampazzo <i>et al.</i> , 2007
Crenuchidae		
<i>Characidium gomesi</i>	ZZ:ZW	Centofante <i>et al.</i> , 2001
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	ZZ:ZW	Maistro <i>et al.</i> , 1998
<i>Characidium lanei</i>	ZZ:ZW	Noletto <i>et al.</i> , 2009
<i>Characidium pterostictum</i>	ZZ:ZW	Alves <i>et al.</i> , 2010
<i>Characidium</i> sp.	ZZ:ZW	Alves <i>et al.</i> , 2010
<i>Characidium oiticicai</i>	ZZ:ZW	Alves <i>et al.</i> , 2010
<i>Characidium cf. alipioi</i>	ZZ:ZW	Centofante <i>et al.</i> , 2003
Erythrinidae		
<i>Hoplías malabaricus</i>	XX:XY	Born & Bertollo, 2000
Ancistrinae		
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	XX:XY	Mariotto & Miyazawa, 2006
<i>Ancistrus</i> n. sp. 1	XX/XO	Alves <i>et al.</i> , 2006
Gasteropelecidae		
<i>Carnegiella marthae</i>	ZZ:ZW	Terencio <i>et al.</i> , 2008
<i>Thoracocharax</i> cf. <i>stellatus</i>	ZZ:ZW	Carvalho <i>et al.</i> , 2002

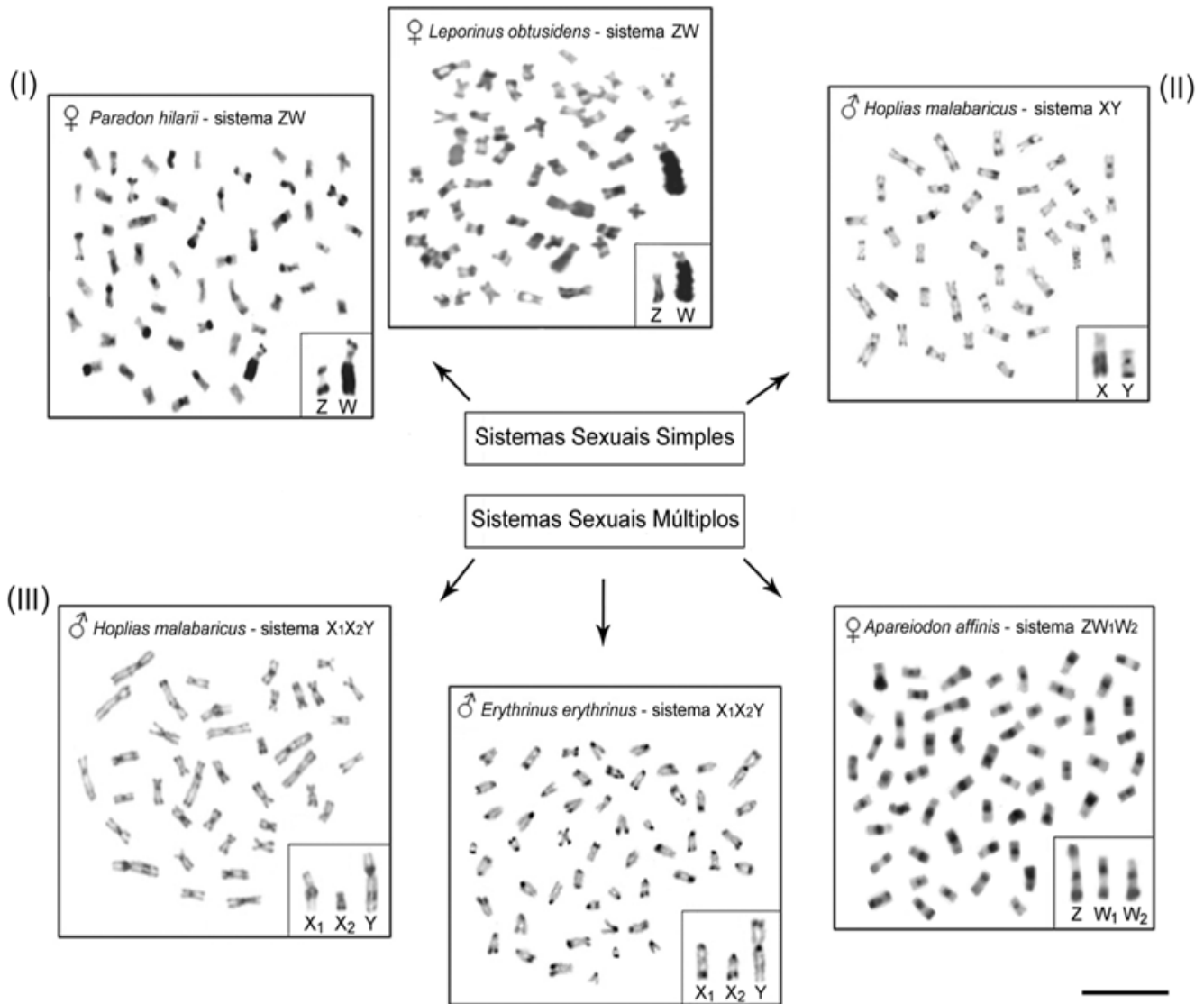
Espécie	Sistema Sexual	Referência
----------------	-----------------------	-------------------

Parodontidae		
<i>Parodon hilarii</i>	ZZ:ZW	Moreira-Filho <i>et al.</i> , 1993
<i>Parodon moreirai</i>	ZZ:ZW	Centofante <i>et al.</i> , 2002
<i>Apareiodon vladii</i>	ZZ:ZW	Rosa <i>et al.</i> , 2006
<i>Apareiodon</i> sp.	ZZ:ZW	Vicari <i>et al.</i> , 2006
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	ZZ:ZW	Bellafronte <i>et al.</i> , 2009
Prochilodontidae		
<i>Semaprochilodus taeniurus</i>	ZZ:ZW	Feldberg <i>et al.</i> , 1987
Loricariidae		
<i>Hypostomus ancistroides</i>	XX:XY	Michele <i>et al.</i> , 1977
<i>Hypostomus macrops</i>	XX:XY	Michele <i>et al.</i> , 1977
<i>Hypostomus</i> sp.	ZZ:ZW	Artoni <i>et al.</i> , 1998
<i>Hemiancistrus spiloma</i>	ZZ:ZW	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	ZZ:ZW	Andreatta <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	XX:XY	Andreatta <i>et al.</i> , 1992
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	ZZ:ZW	Scavone & Julio Jr., 1995
Pimelodidae		
<i>Pimelodella</i> sp.	XX:XY	Dias & Foresti, 1993
<i>Steindachneridion</i> sp.	XX:XY	Swarça <i>et al.</i> , 2006
Sternopydidae		
<i>Eigenmannia virescens</i>	XX:XY	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 1988
<i>Eigenmannia virescens</i>	ZZ:ZW	Foresti, 1987
Poeciliidae		
<i>Poecilia sphenops</i>	XX:XY	Haaf & Schimd, 1984
<i>Poecilia reticulata</i>	XX:XY	Nanda <i>et al.</i> , 1990
<i>Gambusia puncticulata</i>	ZZ:ZW	Rab, 1984
Eleotrididae		
<i>Dormitator maculatus</i>	XX:XY	Oliveira & Almeida-Toledo, 2006

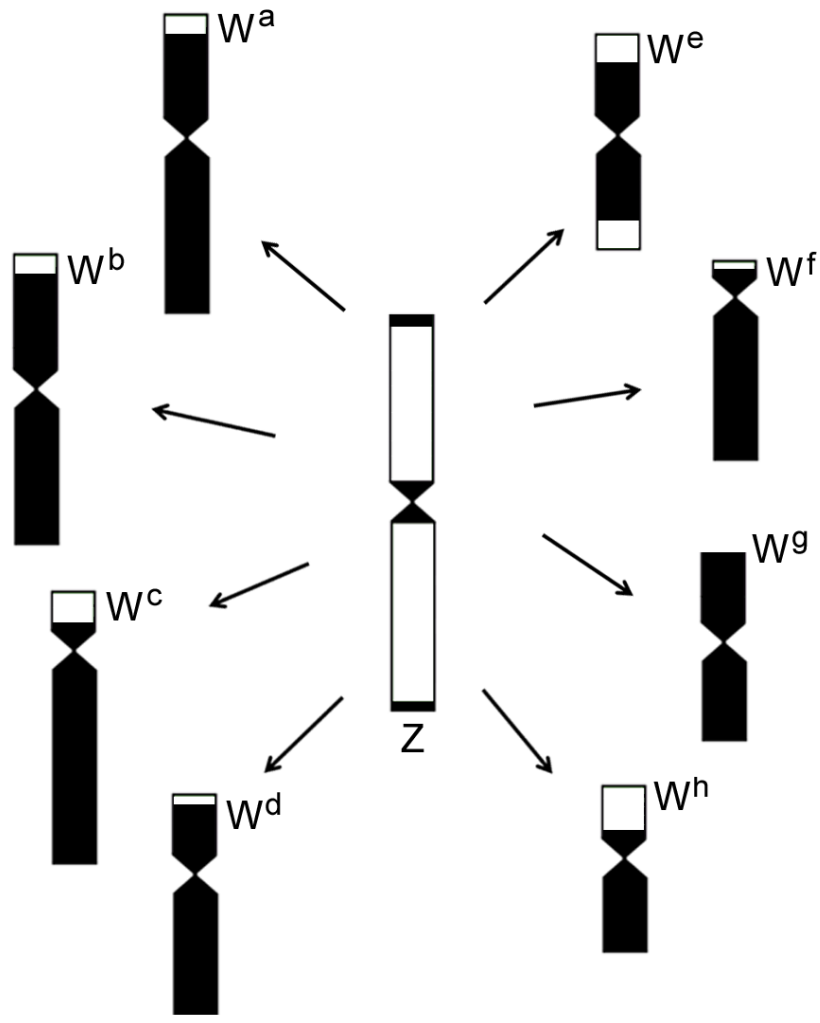
1 **Tabela II.** Sistemas de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais: Sistemas múltiplos

Espécies	Sistema Sexual	Referência
Anostomidae		
<i>Leporinus elongatus</i>	$Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$	Parise-Maltempo <i>et al.</i> , 2007
Erythrinidae		
<i>Hoplias malabaricus</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Bertollo <i>et al.</i> , 1997
<i>Hoplias malabaricus</i>	XX/XY_1Y_2	Bertollo <i>et al.</i> , 2000
<i>Erythrinus erythrinus</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Bertollo <i>et al.</i> , 2004
Parodontidae		
<i>Apareiodon affinis</i>	ZZ/ZW_1W_2	Moreira-Filho <i>et al.</i> , 1980
Loricariidae		
<i>Harttia carvalhoi</i>	XX/XY_1Y_2	Centofante <i>et al.</i> , 2006
Sternopygidae		
<i>Eigenmannia sp. 2</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 1984
<i>Gymnotus sp.</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Bellafronte & Margarido, 2005
<i>Brachyhypopomus pinnicaudatus</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 2000
Loricariidae		
<i>Ancistrus sp. 1</i>	$X_1X_1X_2X_2/XY_1Y_2$	Oliveira <i>et al.</i> , 2008
<i>Ancistrus sp. 2</i>	$Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$	Oliveira <i>et al.</i> , 2008
Clupeidae		
<i>Brevoortia aurea</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Brum <i>et al.</i> , 1992
Potamotrygonidae		
<i>Potamotrygon aff. motoro</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Cruz <i>et al.</i> , 2011
<i>Potamotrygon falkneri</i>	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Cruz <i>et al.</i> , 2011

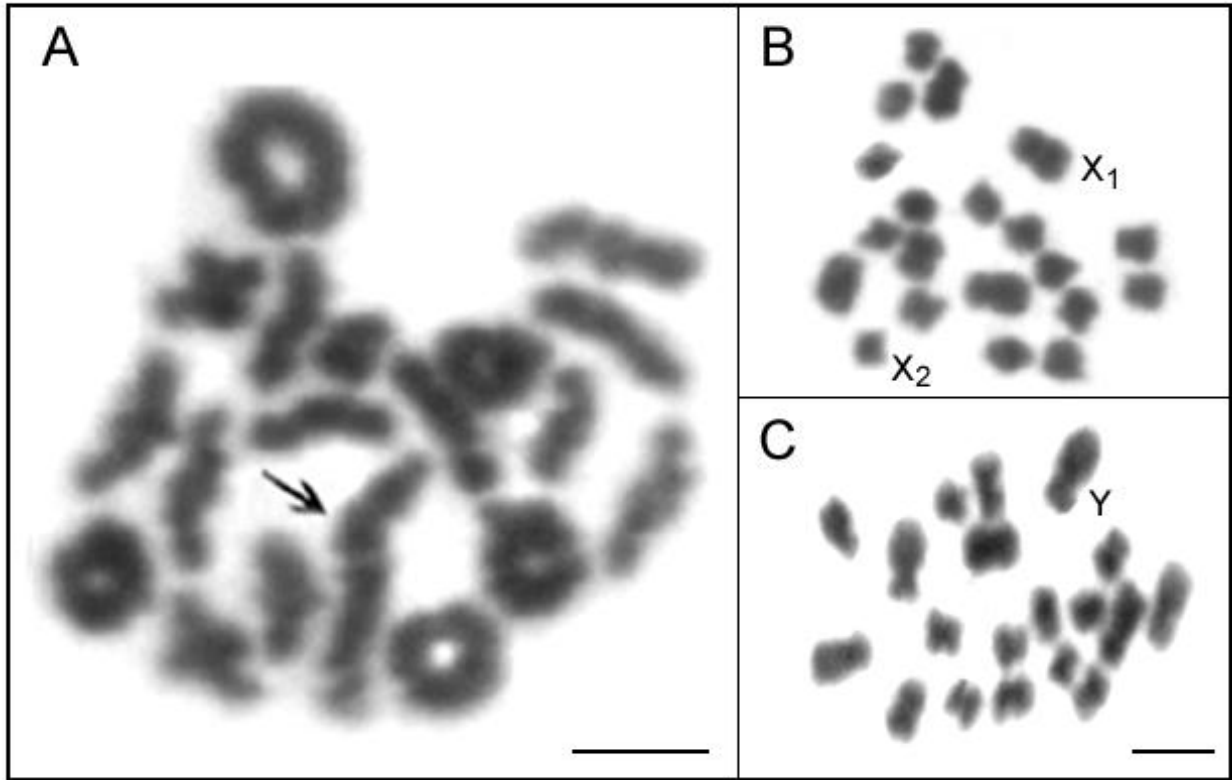
Figuras



1 **Figura 1.** Metáfases de diferentes espécies de peixes Neotropicais submetidas ao procedimento
2 de bandamento C destacando (I) o grande acúmulo de heterocromatina que é geralmente
3 associado com a diferenciação dos cromossomos W, exemplificado pelas espécies portadores
4 de um sistema ZW *Parodon hilarii* e *Leporinus obtusidens*, (II) o acúmulo incomum de
5 heterocromatina nos cromossomos X e não nos cromossomos Y, exemplificada pela espécie
6 *Hoplias malabaricus*, e (III) a ausência de acúmulo de heterocromatina nos cromossomos
7 sexuais múltiplos, exemplificado pelas espécies *H. malabaricus* e *Erythrinus erythrinus*
8 (sistema sexual X₁X₂Y) e *Apareiodon affinis* (sistema sexual ZW₁W₂). Os cromossomos
9 sexuais são mostrados em formas ampliadas nas caixas. Barra = 10 μm



1 **Figura 2.** Idiograma comparativo mostrando a diversidade de formas e distribuição da
2 heterocromatina nos cromossomos W presentes em diferentes espécies do gênero *Triportheus*,.
3 As regiões eucromáticas e heterocromáticas nos cromossomos são representadas pelos
4 segmentos claros e escuros, respectivamente. W^a = *T. cf. auritus*; W^b = *T. auritus*; W^c = *T.*
5 *signatus*; W^d = *T. nematurus*; W^e = *T. guentheri*; W^f = *T. angulatus*; W^g = *T. venezuelensis*; W^h
6 = *T. albus* (modificada de Diniz et al. 2008).



1 **Figura 3.** Cromossomos meióticos de machos de *Hoplias malabaricus*, $2n = 39$ cromossomos
2 e um sistema de cromossomos sexuais do tipo X_1X_2Y . (A) Estágio de diplóteno-diacinese
3 exibindo 18 bivalentes e um característico trivalente sexual. Os bivalentes correspondem a 18
4 pares autossômicos pareados, enquanto o trivalente corresponde ao emparelhamento dos
5 cromossomos X_1 , X_2 e Y . (B e C) células em metáfase II com 20 e 19 cromossomos,
6 respectivamente, indicando a segregação equilibrada dos cromossomos sexuais durante a
7 meiose. A seta indica o trivalente sexual. Barras = $10 \mu\text{M}$.

Considerações Finais

1 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 A proposta desta tese foi analisar a diferenciação genômica entre espécies da família
3 Erythrinidae, especificamente entre cariomorfos de *E. erythrinus* e *H. malabaricus*, com um
4 enfoque especialmente voltado para os cromossomos sexuais. Para tanto, além das análises
5 cromossômicas clássicas, foi realizado o mapeamento citogenético de seqüências de DNAs
6 repetitivos, assim como a obtenção de sondas por microdissecção de cromossomos sexuais e a
7 hibridização fluorescente *in situ* (FISH) nos cromossomos. Procurou-se testar o caminho
8 evolutivo, quanto a origem independente ou em comum, entre os sistemas de cromossomos
9 sexuais dos cariomorfos de *H. malabaricus* e de *E. erythrinus*.

10 Os recentes avanços da citogenética, particularmente da citogenética molecular, têm
11 proporcionado resultados significativos nos estudos de evolução cromossômica, onde o
12 mapeamento de seqüências repetitivas de DNA e a pintura cromossômica se destacam como
13 procedimentos poderosos para alcançar este objetivo. Assim, o emprego dessas metodologias
14 permitiu avançar significativamente no conhecimento dos processos que levaram à
15 diferenciação dos cromossomos sexuais nas espécies de Erythrinidade, tanto em *E. erythrinus*
16 como em *H. malabaricus*. Ao mesmo tempo, os resultados obtidos destacaram as condições
17 presentes entre essas duas espécies de Erythrinidae como excelentes modelos para a melhor
18 compreensão dos processos evolutivos relacionados à evolução cromossômica entre os peixes,
19 assim como entre os vertebrados como um todo. De fato, considerando que os peixes ocupam a
20 posição basal na filogenia dos vertebrados, a diversidade de mecanismos de determinação do
21 sexo encontrada neste grupo, somada a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos na
22 maioria das espécies, propicia condições adequadas para se compreender melhor os processos
23 evolutivos dos cromossomos sexuais nos vertebrados.

1 Foram analisadas duas populações alopátricas de *E. erythrinus*, correspondentes aos
2 cariomorfos A ($2n=54$, sem diferenciação de cromossomos sexuais) e D ($2n= 52/51$ em fêmeas
3 e machos, com um sistema de cromossomos sexuais X_1X_2Y). A dispersão genômica de
4 elementos transponíveis, associados ao DNAr 5S, e a diferenciação do sistema de cromossomos
5 sexuais múltiplos, foram eventos marcantes na evolução do cariomorfo D dessa espécie. O
6 retrotransposon *Rex3* mostrou-se intersticialmente disperso na maioria dos cromossomos.
7 Entretanto, enquanto que no cariomorfo A foi evidenciada uma distribuição
8 compartimentalizada nas regiões centroméricas de apenas dois cromossomos acrocêntricos, no
9 cariomorfo D foram encontrados 22 sítios nos cromossomos acrocêntricos das fêmeas e 21
10 sítios nos machos. Todos os sítios de DNAr 5S foram co-localizados com os de *Rex3*,
11 sugerindo que estes elementos estão associados no genoma. Adicionalmente, a origem por
12 fusão cêntrica do cromossomo Y metacêntrico no cariomorfo D foi evidenciada pela presença
13 de ITS, assim como pela presença de sítios 5S DNAr/*Rex3* neste cromossomo. Além das fusões
14 cêntricas associadas com a diferenciação dos cromossomos sexuais múltiplos do cariomorfo D,
15 foi destacado um aumento surpreendente de sítios associados de DNAr5S/*Rex3* em contraste
16 com o cariomorfo A. Considerando a hipótese provável que o cariomorfo D representa uma
17 forma derivada em relação ao cariomorfo A, os resultados obtidos demonstram claramente uma
18 enorme dispersão dos elementos associados DNAr 5S/*Rex3* nas regiões centroméricas dos
19 cromossomos acrocêntricos. Assim, é provável que seqüências do retroelemento *Rex3* tenham
20 se inserido no DNAr 5S e que o complexo DNAr 5S/*Rex3* tenha se dispersado no cariótipo. A
21 freqüente associação entre as regiões centroméricas dos cromossomos acrocêntricos parece
22 propiciar uma condição favorável para a ocorrência dessa dispersão.

1 Em *H. malabaricus*, a distribuição de doze microssatélites mono-, di- e trinucleotídeos,
2 nas regiões heterocromáticas dos cromossomos XX/XY e $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ presentes nos
3 cariomorfos B e D, respectivamente, evidenciou o envolvimento diferencial dessas seqüências
4 na diferenciação desses dois sistemas, provavelmente como um reflexo direto dos seus modos
5 distintos de origem. Assim, em adição aos sítios repetitivos observados nas regiões
6 subteloméricas e heterocromáticas de diversos autossomos, um acúmulo significativo dessas
7 seqüências foi destacado nos cromossomos sexuais. No cariomorfo B, um grande acúmulo de
8 microssatélites foi encontrado na ampla região heterocromática presente no braço longo do
9 cromossomo X, enquanto que no cariomorfo D esses elementos foram mapeados
10 preferencialmente na região centromérica de ambos os cromossomos X (X_1 e X_2), bem como
11 nas regiões correspondentes do cromossomo neo-Y. Tais resultados corroboram os modelos
12 que prevêem o acúmulo de seqüências repetitivas de DNA em regiões de recombinação
13 reduzida. Portanto, o acúmulo de seqüências repetitivas parece ser importante no processo de
14 diferenciação dos sistemas XY, podendo reduzir a taxa de recombinação a partir de um par
15 sexual ancestral indiferenciado. No cariomorfo D de *H. malabaricus*, onde o sistema X_1X_2Y
16 originou-se a partir da fusão em tandem de dois cromossomos parentais, a redução da
17 recombinação pode ter sido facilitada pelos próprios rearranjos cromossômicos diretamente
18 associados com a origem deste sistema, sem a necessidade de outras diferenciações adicionais,
19 como o acúmulo de elementos repetitivos do genoma.

20 Os processos que atuam na diferenciação dos cromossomos sexuais ainda não estão
21 completamente esclarecidos. No entanto, tem sido considerado que o acúmulo de seqüências
22 repetitivas de DNA pode representar um dos primeiros passos nos estágios iniciais de
23 diferenciação dos cromossomos sexuais. Além disso, as regiões com recombinação ausente ou

1 suprimida têm tendência para acumular essas seqüências de DNA e, por essa razão, a ausência
2 de recombinação entre os cromossomos sexuais favorece, por si só, o acúmulo de seqüências
3 repetitivas nesses cromossomos. O acúmulo preferencial e o enriquecimento com seqüências de
4 DNAs repetitivos ocorrem em cromossomos sexuais de muitas espécies de peixes Neotropicais,
5 em comparação com os autossomos. Esse fenômeno foi observado tanto em cromossomos
6 sexuais morfologicamente diferenciados, assim como naqueles em fase inicial de diferenciação,
7 destacando o provável papel dessas seqüências na diferenciação desses cromossomos, gerando
8 alterações na morfologia e no tamanho entre os homólogos ancestrais do par sexual.

9 Apesar da diversidade de sistemas de cromossomos sexuais existentes nos Erythrinidae,
10 há também espécies que compartilham um mesmo tipo de sistema, como é o caso dos
11 cariomorfos D de *H. malabaricus* ($2n = 39/40$) e *E. erythrinus* ($2n=52/51$), ambas com um
12 sistema de cromossomos sexuais múltiplos $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$. A princípio, tal condição
13 poderia sugerir uma estreita relação entre estes sistemas, com a provável origem comum desses
14 cromossomos antes da divergência dos gêneros *Hoplias* e *Erythrinus*. No entanto, o
15 mapeamento comparativo de seqüências repetitivas de DNA, realizado em cromossomos
16 mitóticos e meióticos, apontou para um processo de diferenciação independente dos
17 cromossomos sexuais entre essas espécies.

18 Os estudos adicionais com pintura cromossômica, utilizando sondas de cromossomos
19 sexuais inteiros isolados por microdissecção, possibilitaram elucidar esta questão. Sondas dos
20 cromossomos X_1 (cariomorfo D de *H. malabaricus*) e Y (cariomorfo D de *E. erythrinus*) foram
21 utilizadas em experimentos de “wcp” (whole chromosome painting), para investigar a evolução
22 dos cromossomos X_1X_2Y presentes nessas duas espécies. Os resultados mostraram que esses
23 cromossomos evoluíram de forma independente, onde diferentes autossomos foram

1 primeiramente convertidos em um par sexual XY, pouco diferenciado, em cada espécie.
2 Posteriormente, rearranjos adicionais distintos originaram os dois sistemas de cromossomos
3 sexuais múltiplos X_1X_2Y . Em *H. malabaricus*, o sistema X_1X_2Y foi originado a partir de
4 cromossomos XY ancestrais em um estágio inicial de diferenciação, enquanto que em *E.*
5 *erythrinus* ele foi derivado de um par de cromossomos XY ainda morfologicamente
6 indiferenciado, para o qual ainda não foi identificado nenhum marcador específico. Assim, os
7 resultados de pintura cromossômica, somados aos padrões de distribuição dos DNAs
8 repetitivos, realçaram a plasticidade de diferenciação dos cromossomos sexuais na família
9 Erythrinidae, onde eventos distintos mostram-se implicados nos processos evolutivos de um
10 mesmo tipo de sistema sexual ($X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$) entre espécies proximamente relacionadas.

11 Finalizando as análises propostas no presente estudo, foi investigado o caminho evolutivo
12 dos sistemas sexuais presentes entre os cariomorfos A-D de *H. malabaricus*. Para tanto, foram
13 utilizadas sondas obtidas a partir da microdissecção dos cromossomos X e X_1 , presentes nos
14 sistemas XY do cariomorfo B e X_1X_2Y do cariomorfo D, respectivamente, em experimentos de
15 “wcp-FISH”. Foi identificado um proto-par XY, presente no cariomorfo A, o qual se mostra
16 associado à origem do sistema XX/XY presente no cariomorfo B, este já bem diferenciado pelo
17 enriquecimento de DNAs repetitivos no braço longo do cromossomo X. Ao mesmo tempo, os
18 dados obtidos também evidenciaram o relacionamento direto entre o sistema XY nascente do
19 cariomorfo C, com o sistema de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y do cariomorfo D. A
20 falta de sinais reconhecíveis nos cromossomos sexuais após os experimentos de “cross-FISH”
21 entre os cariomorfos mostraram que os cromossomos XY dos cariomorfos B e C, evoluíram de
22 forma independente, sendo que distintos pares autossômicos foram convertidos em
23 cromossomos sexuais nesses cariomorfos. Além disso, rearranjos cromossômicos adicionais,

1 envolvendo os cromossomos sexuais e autossomos, originaram o sistema X_1X_2Y presente
2 exclusivamente no cariomorfo D. Vale ressaltar que essas vias distintas ocorreram em uma
3 mesma espécie nominal, expondo novamente, e de forma contundente, a alta plasticidade da
4 evolução dos cromossomos sexuais no grupo em estudo.

5 Como já destacado, os peixes parecem oferecer excelentes condições para analisar a
6 evolução dos cromossomos sexuais, fornecendo inclusive informações importantes para a
7 compreensão deste processo entre os vertebrados como um todo. Neste cenário, as
8 espécies/cariomorfos de Erythrinidae destacam-se como modelos propícios para estudos de
9 evolução cariotípica em geral e, de modo particular, dos cromossomos sexuais nos vertebrados
10 inferiores.

Referências Bibliográficas

1 **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 2 Abe H, Sugasaki T, Terada T, Kanehara M, Ohbayashi F, et al. (2002) Nested retrotransposons
3 on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*. **Insect Mol Biol**
4 11:307-314.
- 5 Acosta MJ, Romero-Fernández I, Sánchez A, Marchal JA (2011) Comparative Analysis by
6 Chromosome Painting of the Sex Chromosomes in Arvicolid Rodents. **Cytogenet Genome**
7 **Res** 132:47-54.
- 8 Affonso PRAM, Galetti Jr. PM (2005) Chromosomal diversification of reef fishes from genus
9 *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). **Genetica** 123: 227–233.
- 10 Abuín M, Martínez P, Sánchez L (1996) Localization of the telomeric sequence (TTAGGG)_n in
11 four salmonid species. **Genome** 9: 1035-1038.
- 12 Alonso MA, Fujiwara E, Yamaha S, Kimura S (1999) Ribosomal RNA gene loci and silver-
13 stained nucleolar organizer regions associated with heterochromatin in Alaskan char
14 *Salvelinus malma* and chum salmon *Oncorhynchus keta*. **Hereditas** 131: 221–225.
- 15 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search
16 tool. **J Mol Biol** 215:403-410.
- 17 Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1984) Complex sex chromosome system in
18 *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). **Genetica** 64:165:169.
- 19 Almeida-Toledo LF, Viegas-Péquignot E, Foresti F, Toledo-Filho SA, Dutrilaux B (1988)
20 BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species,
21 genus *Eigenmannia*. **Cytogenetic Cell Genet** 48:117-120.
- 22 Almeida-Todelo LF (1998) Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes, In:
23 Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, Malabarba LR, Reis RE, Vari, RP,
24 Lucena ZMS and Lucena CAS (Eds.), pp. 583-588, Edipucrs, Porto Alegre.
- 25 Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho AS (2000) Sex chromosome
26 evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome
27 in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma** 109:197-200.
- 28 Almeida-Toledo LF, Foresti F (2001) Morphologically differentiated sex chromosomes in
29 neotropical freshwater fish. **Genetica** 111:91-100.
- 30 Almeida-Toledo LF, Foresti F, Pequignot EV, Daniel-Silva MF (2001) XX:XY sex
31 chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome
32 differentiation in the neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. **Cytogenet Cell Genet**
33 95:73-78.
- 34 Alves LA, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F (2006) Karyotypic relationships among
35 the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with a description of XO sex
36 chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica** 128: 1-9.
- 37 Alves JCP, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010) Interspecific chromosomal divergences in
38 the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). **Neotrop Ichthyol** 8:77-
39 86.

- 1 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search
2 tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- 3 Andreato AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1992) Chromosome studies
4 in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome
5 heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. **Cytologia** 57:369-372.
- 6 Andreato AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1993) Chromosome studies
7 in Hypoptomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW sex chromosome
8 system, B chromosomes and constitutive heterochromatin differentiation in
9 *Microlepidogaster leucofrenatus*. **Cytogenetic Cell Genet** 63:215-220.
- 10 Artoni RF, Venere PC, Bertollo LAC (1998) A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system
11 in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia** 63:421-425.
- 12 Artoni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) An uncommon condition for a
13 sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the
14 ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Res** 9:449-456.
- 15 Artoni RF, Bertollo LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system
16 in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. **Heredity**
17 89:15-19.
- 18 Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O,
19 Bertollo LAC (2006) Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus*
20 (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution.
21 **Genetica** 127:277-284.
- 22 Ashley (2002) X-Autosome translocations, meiotic synapsis, chromosome evolution and
23 speciation. **Cytogenet Genome Res** 96:33-39.
- 24 Badaeva ED, Dedkova OS, Gay G, Pukhalskiyi VA, Zelenin, AV, Bernard S, Bernard M (2007)
25 Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. **Genome** 50: 907-
26 926.
- 27 Barske LA, Capel B (2008) Blurring the edges in vertebrate sex determination. **Curr Opin**
28 **Genet Dev** 18:499-505.
- 29 Becklemisheva VR, Romanenko SA, Biltueva LS, Triofonov V, et al. (2011) Reconstruction of
30 karyotype evolution in core Glires. I. The genome homology revealed by comparative
31 chromosome painting. **Chromosome Res** 19:549-565.
- 32 Bellafronte E, Margarido VP (2005) An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ multiple sex chromosome system in
33 a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). **Environ Biol Fish**
34 73:293-297.
- 35 Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) Differentiated
36 ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae):
37 cytotaxonomy and biogeography. **J Fish Biol** 75:2313-2325.
- 38 Bell MA, Foster SA (1994) The evolutionary biology of the three spine stickleback. Oxford
39 University Press, Oxford.
- 40 Belyayev A, Raskina O, Nevo E (2005) Variability of Ty3 gypsy retrotransposons
41 chromosomal distribution in populations of two wild *Triticeae* species. **Cytogenet**
42 **Genome Res** 109:43-50.
- 43 Bergero R, Forrest A, Kamau E, Charlesworth D (2007) Evolutionary strata on the X
44 chromosomes of the dioecious plant *Silene latifolia*: evidence from new sex-linked genes.
45 **Genetics** 175:1945-1954.

- 1 Bergero R, Charlesworth D (2009) The evolution of restricted recombination in sex
2 chromosomes. **Trends Ecol Evol** 24:94-102.
- 3 Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on
4 *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J Genet** 1:103-120.
- 5 Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1979) Karyotypic studies of two allopatric
6 populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J Genet** 2:17-37.
- 7 Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1983) Multiple sex chromosomes in the
8 genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia** 48:1-12.
- 9 Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM (1986) Cytogenetics and taxonomy
10 considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J Fish Biol** 28:153-159.
- 11 Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J (1997a) The X₁X₂Y sex chromosome system
12 in the fish *Hoplias malabaricus* I. G-, C- and chromosome replication banding.
13 **Chromosome Res** 5:493-499.
- 14 Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS (1997b) Karyotypic diversity and distribution
15 in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotypes with 2n = 40 chromosomes.
16 **Brazil J Genet** 20:237-242.
- 17 Bertollo LAC, Mestriner CA (1998) The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias*
18 *malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. **Chromosome Res** 6:141-147.
- 19 Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000) A biodiversity
20 approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey,
21 geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome**
22 **Res** 8:603-613.
- 23 Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MS, Falcão JN,
24 Fenocchio AS (2004) Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus*
25 (Teleostei: Characiformes). **Heredity** 93:228-233.
- 26 Bertollo LAC (2007) Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: an
27 overview, In: Fish cytogenetics, E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, B.G. Kapoor,
28 (Eds.), 195-211, Enfield, NH, USA.
- 29 Bertollo LAC, Mestriner CA (1998) The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias*
30 *malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. **Chromosome Res** 6:141-147.
- 31 Biémont C, Vieira C (2006) Junk DNA as an evolutionary force. **Nature** 443:521-524.
- 32 Biémont C (2008) Within-species variation in genome size. **Heredity** 101:297-298.
- 33 Blackburn EH (1994) Telomeres: No end in sight. **Cell** 77: 621-623.
- 34 Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Diniz D, Moreira-Filho O (2010) Characterization of
35 invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in
36 the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**
37 20:1-8.
- 38 Blanco DR, Lui RL, Vicari MR, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2011) Comparative
39 cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intetmedius* (Characiformes,
40 Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and
41 cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically
42 identical karyotypes. **Cytogenet Genome Res** 132:71-78.
- 43 Born GG, Bertollo LAC (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias*
44 *malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res**
45 8:111-118.

- 1 Bouneau L, Fisher C, Ozouf-Costaz C, Froschauer A, Jaillon O, Coutanceau JP, Korting C,
2 Weissenbach J, Bernot A, Volff JN (2003) An active Non-LTR retrotransposon with
3 tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*.
4 **Genome Res** 13:1686–1695.
- 5 Bressa MJ, Papeschi AG, Vítková M, Kubičková S, Fuková I, Pigozzi MI, Marec F (2009) Sex
6 chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Heteroptera:
7 Pyrrhocoridae). **Cytogenet Genome Res** 125:292-305.
- 8 Brown SW (1966) Heterochromatin. **Science** 151:417-42.
- 9 Brum MJI, Galetti Jr. PM, Corrêa MMO, Aguilar CT (1992) Multiple sex chromosomes in
10 South Atlantic fish, *Brevoortia aurea* (Clupeidae). **Braz J Gen** 15:547-553.
- 11 Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms, Benjamin/Cummings, Menlo Park,
12 CA, pp.248-269
- 13 Capistano TG, Castro ALBP, Julio-Junior HF (2008) Chromosome divergence and NOR
14 polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the
15 hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genet Mol**
16 **Biol** 31:203-207.
- 17 Capriglione T, Morescalchi A, Olmo E, Rocco L, Stingo L, Manzo S (1994) Satellite DNAs
18 heterochromatin and sex chromosomes in *Chianodraco hamatus* (Channichthyidae,
19 Perciformes). **Polar Biol** 14: 285-290.
- 20 Caputo V, Machella N, Nisi-Cerioni P, Olmo E (2001) Cytogenetics of nine species of
21 Mediterranean blennies and additional evidence for an unusual multiple sex-chromosome
22 system in *Parablennius tentacularis* (Perciformes, Blenniidae). **Chromosome Res** 9:3–
23 12.
- 24 Carrasco LAP, Penman DJ, Bromage N (1999) Evidence for the presence of sex chromosomes
25 in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX,
26 XY and YY genotypes. **Aquaculture** 173:207–218.
- 27 Carvalho ML, Oliveira C, Foresti F (2002) Description of a ZZ/ZW sex chromosome system in
28 *Thoracocharax* cf. *stellatus* (Teleostei, Characiformes, Gasteropelecidae). **Genet Mol**
29 **Biol** 3:299-303.
- 30 Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2001) Comparative cytogenetics among
31 sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the
32 description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia** 55:253-
33 260.
- 34 Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2002) A ZZ/ZW sex chromosome system in a
35 new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 55:139-150.
- 36 Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal divergence
37 and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae).
38 **Hereditas** 138:213-218.
- 39 Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2006) Cytogenetic characterization and
40 description of XX/XY₁Y₂ sex chromosome system in catfish *Harttia*
41 *carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet Genome Res** 112:320–324.
- 42 Cermak T, Kubat Z, Hobza R, Koblizkova A, Widmer A, et al. (2008) Survey of repetitive
43 sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes.
44 **Chromosome Res** 16:961-976.
- 45 Charlesworth D, Charlesworth B (1980) Sex differences in fitness and selection for centric
46 fusions between sex-chromosomes and autosomes. **Gent Res** 35: 205–214.

- 1 Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive
2 DNA in eukaryotes. **Nature** 371: 215-220.
- 3 Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex
4 chromosomes. **Heredity** 95: 118–128.
- 5 Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ (2002) Molecular and cytogenetic analysis of
6 the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*
7 (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma** 111:45-52.
- 8 Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2009a) Comparative chromosome mapping of repetitive
9 sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC**
10 **Genetics** 10:34.
- 11 Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC (2009b) Chromosomal
12 variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*:
13 Mapping of three classes of repetitive DNAs. **Cytogenet Genome Res** 125:132-141.
- 14 Cioffi MB, Bertollo LAC (2010) Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias*
15 *malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y sex chromosome system in this fish
16 group. **Heredity** 105: 554–561.
- 17 Cioffi MB, Martins C, Rebordinos L, Vicari MR, Bertollo LAC (2010a) Differentiation of the
18 XX/XY sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*: Unusual accumulation
19 of repetitive sequences on the X chromosome. **Sex dev** 4:176-185.
- 20 Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2010b) Chromosomal spreading of associated
21 transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications
22 for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evol Biol** 10:217.
- 23 Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC (2011a) Repetitive DNAs and the differentiation of
24 sex chromosomes in Neotropical fishes. **Cytogenet Genome Res** 132:188-194.
- 25 Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC (2011b)
26 Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex
27 chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. **BMC Evol Biol** 11:186.
- 28 Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC (2011c) The chromosomal distribution of
29 microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex
30 chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 132:289-296.
- 31 Cioffi MB, Molina W, Artoni RF, Bertollo LAC (*in press*) Chromosomes as tools for
32 discovering biodiversity. The case of Erythrinidae fish family. In: Cytogenetics, Tirunilai
33 P (Ed.), InTech, Rijeka.
- 34 Clabby C, Goswami U, Flavin F, Wilkins NP, Houghton JA, Powell R (1996) Cloning,
35 characterization and chromosomal location of a satellite DNA from the Pacific oyster,
36 *Crassostrea gigas*. **Gene** 168:205-209.
- 37 Cremisi F, Vignali R, Batistoni R, Barsacchi G (1988) Heterochromatic DNA in *Triturus*
38 (Amphibia, Urodela). II. A centromeric satellite DNA. **Chromosoma** 97: 204-211.
- 39 Crollius HR, Jaillon O, DaSilva C, Ozouf-Costaz C, Fischer C, Bouneau L, Billault A, Quetier
40 F, Saurin W, Bernot A, Weissenbach J (2000) Characterization and repeat analysis of the
41 compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Res** 10:
42 939-949.
- 43 Cruz VP, Shimambuku-Dias CK, Oliveira C, Foresti F (2011) Karyotype description and
44 evidence of multiple sex chromosome system X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y in *Potamotrygon* aff.
45 *motoro* and *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River
46 basin, Brazil. **Neotrop Ichthyol** 9:201-208.

- 1 Dasilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Crollius HR (2002)
2 Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the
3 heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proc Natl Acad Sci USA**
4 99:1636–1641.
- 5 Datta U, Dutta P, Mandal K (1998) Cloning and characterization of a highly repetitive fish
6 nucleotide sequence. **Gene** 62: 331-336.
- 7 Dergam JA, Bertollo LAC (1990) Karyotypic diversification in *Hoplias*
8 *malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, **Brazil**
9 **J Genet** 13:755–766.
- 10 Dergam JÁ, Suzuki HI, Shibatta AO, Silva LFD, Júlio HF, Giuliano-Caetano L, Black WC
11 (1998) Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*
12 (Erythrinidae, Characiformes) in the Iguassu, Tibagi, and Paraná rivers. **Genet Mol Biol**
13 (online). doi: 10.1590/S1415-47571998000400015.
- 14 Dettai A, Bouneau L, Fischer C (2007) FISH analysis of fish transposable elements: tracking
15 down mobile DNA in teleost genomes. In: Fish Cytogenetics, Pisano E, Ozouf-Costaz C,
16 Foresti F, Kapoor BG (Eds.), pp. 361-383, Enfield, NH.
- 17 Devlin RH, McNeil BK, Donaldson EM (1991) Isolation of a Y-chromosomal DNA probe
18 capable of determining sex in chinook salmon. **Can J Fish Aquat Sci** 48:1606-1612.
- 19 Devlin RH, Nagahama T (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview
20 of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture** 208:191-364.
- 21 Dias AL, Foresti F (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei).
22 **Braz J Gen** 16:585-600.
- 23 Diniz D, Bertollo LAC (2003) Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces,
24 Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia** 56:303–313.
- 25 Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC (2008) Microdissection and whole
26 chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei,
27 Characiformes). **Cytogenet Genome Res** 122: 163-168.
- 28 Eickbush TH (2002) R2 and related site-specific non-long terminal repeat retrotransposons. In:
29 Mobile DNA II, Craig NL, Craigie R, Gellart M, Lambowitz AM (Eds.), pp. 831-835,
30 American Society of Microbiology, Washington DC.
- 31 Eppelen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S (1982) Base sequence of a cloned snake W-
32 chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the
33 mouse. **Proc Natl Acad Sci USA** 79:3798-3802.
- 34 Erlandsson R, Wilson JF, Pääbo S (2000) Sex chromosomal transposable element accumulation
35 and male-driven substitutional evolution in humans. **Mol Biol Evol** 17:804-812.
- 36 Ezaz MT, Myers JM, Powell SF, McAndrew BJ, Penman DJ (2004) Sex ratios in the progeny of
37 androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**
38 232:205-214.
- 39 Ezaz T, Sarre SD, O’Meally D, Marshall Graves JA, Georges A (2009) Sex chromosome
40 evolution in lizards: Independent origins and rapid transitions. **Cytogenet Genome Res**
41 127:249-260.
- 42 Falcão JN (1988) Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei,
43 Characiformes, Characidae). PhD Thesis. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP,
44 Brazil.

- 1 Feldberg L, Bertollo LAC, Almeida-Toledo LF, Foresti F (1987) Biological aspects of
2 Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus*
3 (Pisces, Prochilodontidae). **Genome** 29:1-4.
- 4 Ferguson-Smith MA, Trifonov V (2007) Mammalian karyotype evolution. **Nature** 8:950–962.
- 5 Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C (2007) Comparative chromosome mapping of 5S rDNA
6 and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis
7 on the *Hoplias malabaricus*' species complex. **Cytogenet Genome Res** 118:78–83.
- 8 Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F (2011) Chromosome mapping of retrotransposable elements
9 *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei,
10 Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet Genome Res** 132:64-70.
- 11 Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes.
12 **Annu Rev Genet** 41:331–368.
- 13 Filatov D (2005) Evolutionary genetics: stickleback's view of sex chromosome evolution.
14 **Heredity** 94:275–276.
- 15 Fink SV, Fink WL (1981) Interrelationships of the ostariophysan fishes(Teleostei). **Zool J**
16 **Linnean Soc** 72:297-353.
- 17 Fisher RA (1931) The evolution of dominance. **Biol Rev** 6: 345–368.
- 18 Fischer C, Bouneau L, Coutanceau JP, Weissenbach J, Volff J N, Ozouf-Costaz C (2004)
19 Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the
20 compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene** 336:175-183.
- 21 Flavel RB (1986) Repetitive DNA and chromosomes. *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci*
22 312:227-242.
- 23 Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo Filho AS (1981) Polymorphic nature of nucleolar
24 organizer regions in fishes. **Cytogenet Cell Genet** 31:137-144.
- 25 Galetti Jr. PM, Foresti F (1986) Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces,
26 Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. **Cytogenet Cell Genet** 43: 43-46.
- 27 Galetti PM Jr, Lima NRW, Venere PC (1995) A monophyletic ZW sex chromosome system in
28 *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia** 60:375-382.
- 29 Galetti Jr. PM, Foresti F (1996) Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces,
30 Anostomidae). **Cytogenet Cell Genet** 43:43-46.
- 31 Galetti Jr PM: (1998) Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital J Zool**
32 65:53-56.
- 33 Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Rejón CR, Rejón MR (1994) Cloning and
34 characterization of a fish centromeric satellite DNA. **Cytogenet Cell Genet** 65:233-237.
- 35 Giuliano-Caetano L (1986) Estudo citogenético em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces,
36 Erythrinidae) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Master Thesis. Universidade
37 Federal de São Carlos, São Carlos.
- 38 Giuliano-Caetano L, Jorge LC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Comparative
39 cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae).
40 **Cytologia** 66:39–43.

- 1 Graves JAM (2008) Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex
2 chromosomes. **Annu Rev Genet** 42: 565-586.
- 3 Gregory TR (2005) Genome size evolution in animals. In: *The Evolution of the Genome*,
4 Gregory TR (Ed.), pp. 3-87, Elsevier, San Diego.
- 5 Grewal SIS, Jia S (2007) Complexities of heterochromatin in fungi, ciliates, plants and
6 mammals. **Nature Rev Genet** 8:35-46.
- 7 Griffin DK, Robertson LBW, Tempest HG, Skinner BM (2007) The evolution of the avian
8 genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. **Cytogenet Genome Res**
9 117:64-77.
- 10 Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E (2009) Comparative
11 cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal
12 characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. **Cytogenet Genome Res**
13 127: 43-53.
- 14 Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Mogharbel N, O'Brien PC, Jones RC, Ferguson-Smith
15 MA, Graves JAM (2004) In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares
16 genes with the bird Z and mammal X chromosomes. **Nature** 432:913-917.
- 17 Haaf T, Schmid M (1984) An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in
18 *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). **Chromosoma**
19 89:37-41.
- 20 Haaf T, Schmid M, Steinlein C, Galetti Jr. PM, Willard HF (1993) Organization and molecular
21 cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae).
22 **Chromosome Res** 1:77-86.
- 23 Handley LJ, Ceplitis H, Ellegren H (2004) Evolutionary strata on the chicken Z chromosome:
24 implications for sex chromosome evolution. **Genetics** 167:367-376.
- 25 Hartley SE, Davidson WS (1994) Characterization and distribution of genomic repeat
26 sequences from Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). In: *Genetics and evolution of aquatic*
27 *organisms*, Chapman and Hall (Eds.), pp. 271-280, Nova Science Publishers, Hauppauge.
- 28 Harvey SC, Masabanda J, Carrasco LAP, Bromage NR, Penman DJ, Griffin DK (2002)
29 Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex
30 chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome
31 differentiation. **Cytogenet Genome Res** 97:76-80.
- 32 Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008) Non-homologous sex
33 chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes).
34 **Cytogenet Genome Res** 121:55-58.
- 35 Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, Almeida-Toledo LF (2011) Independent
36 fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of
37 glass knife fishes (*Eigenmannia*). **Heredity** 106:391-400.
- 38 Hobza R, Lengerova M, Svoboda J, Kubekova H, Kejnovsky E, Vyskot B (2006) An
39 accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during
40 early stages of sex chromosome evolution. **Chromosoma** 115:376-382.
- 41 Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P (2005) Abundance, distribution and
42 dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences.
43 **Cytogenet Genome Res** 110: 426-440.
- 44 Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Graves TA, Daalen SKM et al. (2010) Chimpanzee and
45 human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. **Nature**
46 463:536-539.

- 1 Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a
2 telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res** 19:4780.
- 3 Itoh Y, Mizuno S (2002) Molecular and cytological characterization of SspI-family repetitive
4 sequence on the chicken W chromosome. **Chromosome Res** 10:499–511.
- 5 Jesus CM; Galetti Jr. PM, Vallentini SR, Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization
6 and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus*
7 (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica** 118:25-32.
- 8 Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR (2004) Pack-MULE transposable elements
9 mediate gene evolution in plants. **Nature** 431: 569–573.
- 10 Jones KW, Singh L (1985) Snakes and the evolution of sex chromosomes. **Trends Genet** 1:55-
11 61.
- 12 Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J (2005) Repbase
13 update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet Genome Res** 110:462–
14 467.
- 15 Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg O, Schulman A (2008)
16 Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. **Proc Natl Acad**
17 **Sci USA** 105: 5833-5838.
- 18 Kasahara S (2009) Introdução á pesquisa em citogenética de vertebrados (1st Edition), Ribeirão
19 Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética.
- 20 Kedes LH (1979) Histone genes and histone messengers. **Ann Rev Biochem** 48:837-870.
- 21 Kejnovská I, Kypr J, Vorlíčková M (2003) Circular dichroism spectroscopy of conformers of
22 (guanine plus adenine) repeat strands of DNA. **Chirality** 15: 584-592
- 23 Kejnovsky E, Hobza R, Kubat Z, Widmer A, Marais GAB, Vyskot B (2007) High
24 intrachromosomal similarity of retrotransposon long terminal repeats: Evidence for
25 homogenization by gene conversion on plant sex chromosomes? **Gene** 390: 92-97.
- 26 Kejnovsky E, Leitch I, Leitch A (2009a) Contrasting evolutionary dynamics between
27 angiosperm and mammalian genomes. **Trends Ecol Evol** 24: 572-582.
- 28 Kejnovsky E, Hobza R, Kubat Z, Cermak T, Vyskot B (2009b) The role of repetitive DNA in
29 structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity** 102:533-541.
- 30 Kidwell M G (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes.
31 **Genetica** 115:49-63.
- 32 Kligerman, AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes.
33 **J Fish Res Board Can** 34:266–269.
- 34 Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, Galetti Jr PM (1997)
35 Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis,
36 heterochromatin distribution, and sex chromosomes. **Chromosome Res** 5:12-22.
- 37 Kondo M, Nanda I, Hornung U, Schmid M, Scharl M (2004) Evolutionary origin of the
38 medaka Y chromosome. **Curr Biol** 14:1664–1669.
- 39 Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation in the Y
40 chromosome of *Silene Latifolia*. **Genome** 51:350-356.

- 1 Lahn TB, Page DC (1999) Four evolutionary strata on the human X Chromosome. **Science**
2 286:964-967.
- 3 Lai Z, Nakazato T, Salmaso M, Burke JM, Tang S, Knapp SJ, Rieseberg LH (2005) Extensive
4 chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower
5 species. **Genetics** 171:291–303.
- 6 Lanfredi M, Congiu L, Garrido-Ramos MA, Herrán R HERÁN R; Leis M, Hicca M, Rossi R,
7 Tagliavini J, Rejón RM, Fontana F (2001) Chromosomal location and evolution of a
8 satellite DNA family in seven sturgeon species. **Chromosome Res** 9: 47-52.
- 9 Larin Z, Fricker MD, Tyler-Smith C (1994) De novo formation of several features of a
10 centromere following introduction of an Y alphoid YAC into mammalian cells. **Hum Mol**
11 **Genet** 3:689-695.
- 12 Lengerova M, Kejnovsky E, Hobza R, Macas J, Grant SR, Vyskot B (2004) Multicolor FISH
13 mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia*. **Theor Appl Genet** 108:1193-
14 1199.
- 15 Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on
16 chromosomes. **Hereditas** 52:201-220.
- 17 Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiasny MLJ, Tedesco PA (2007) Global diversity of fish
18 (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia** 595: 554-567.
- 19 Liu ZY, Moore PH, Ma H, Ackerman CM, Ragiba M, Yu Q, Pearl HM, Kim MS, Charlton JW,
20 Stiles JJ, Zee FT, Peterson AH, Ming R (2004) A primitive Y chromosome in papaya
21 marks incipient sex chromosome evolution. **Nature** 427:348–352.
- 22 Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. **Ann Rev Biochem** 49: 727-764.
- 23 Longo MS, Carone DM, Marzelli M, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED,
24 O'Neill MJ, O'Neill RJ (2009) Distinct retroelement classes define evolutionary
25 breakpoints demarcating sites of evolutionary novelty. **BMC Genomics** 10:334.
- 26 Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico F (1993) Molecular cytogenetics of
27 the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele
28 amphibians. **Genome** 36: 762-773.
- 29 Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F (1998) Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex
30 chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf fasciatum*
31 (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica** 104:1-7.
- 32 Malik HS, Eickbush TH (1998) The RTE class of non-LTR retrotransposons is widely
33 distributed in animals and is the origin of many SINEs. **Mol Biol Evol** 15:1123–1134.
- 34 Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia, Sánchez A
35 (2004) X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex
36 chromosomes. **Chromosome Res** 12:767-776.
- 37 Marchal JA, Acosta MJ, Bullejos M, Puerma E, Díaz de la Guardia R, Sánchez A (2006)
38 Distribution of L1-retrotransposons on the giant sex chromosomes of *Microtus cabrae*
39 (Arvicolidae, Rodentia): functional and evolutionary implications. **Chromosome Res**
40 14:177-186.

- 1 Mariotto S, Miyazawa CS (2006) *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of
2 species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual
3 chromosomes of type XX/XY, in the Pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**
4 4:299-304.
- 5 Martins C, Galetti Jr PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus*
6 fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 7:363–367.
- 7 Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish
8 genome. In: Focus on Genome Research, Williams CR (Ed.), pp. 289-318, Nova Science
9 Publishers, Hauppauge.
- 10 Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM (2006) A tandemly repetitive
11 centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes:
12 Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica** 127:133–141.
- 13 Martins C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish
14 genome, In: Fish Cytogenetics , Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (Eds.),
15 pp. 421–453, Enfield, NH.
- 16 Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, Matsuda Y (2006)
17 Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and
18 step-wise differentiation of snake sex chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA**
19 103:18190-18195.
- 20 Matsuda M, Matsuda C, Hamaguchi S, Sakaizumi M (1998) Identification of the sex
21 chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization.
22 **Cytogenet Cell Genet** 82:257–262.
- 23 Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C et al (2002) DMY is a Y-specific
24 DM-domain gene required for male development in the medaka fish. **Nature** 417:559–
25 563.
- 26 Mazzuchelli J, Martins C (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish
27 *Astronotus ocellatus*. **Genetica** 136: 461-469.
- 28 Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho
29 JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae
30 fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** 85:1–9.
- 31 Mayden RL, Tang KL, Conway KW, Freyhof J, et al. (2007) Phylogenetic relationships of
32 *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary
33 studies of a model species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Mol Dev Evol*
34 308:642-654.
- 35 Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho
36 JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae
37 fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** 85:1–9.
- 38 Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence
39 (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proc Natl Acad Sci USA** 86: 7049–7053.
- 40 Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH,
41 Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of nontelomeric sites of the (TTAGGG)_n
42 telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma** 99: 3-10.
- 43 Michelle JL, Takahashi CS, Ferrari I (1977) Karyotypic studies of some species of the family
44 Loricariidae (Pisces). **Cytologia** 42:539-546.

- 1 Molina WF, Schmid M, Galetti Jr PM (1998) Heterochromatin and sex chromosomes in the
2 Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios** 94:141-149.
- 3 Molina WF, Galetti Jr. PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis*
4 (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. **Genet**
5 **Mol Biol** 25:373–377.
- 6 Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM (1980) Evidences for a multiple sex
7 chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces,
8 Parodontidae). **Caryologia** 33:83:91.
- 9 Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM (1993) Distribution of sex chromosome
10 mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon*
11 *hilarii* (Parodontidae). **Caryologia** 46:115–125.
- 12 Morelli S, Vicari MR, Bertollo LAC (2007) Evolutionary cytogenetics in species of the
13 *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the
14 other Erythrinidae fish. **Braz J Biol** 67:897-903.
- 15 Morescalchi A, Hureau JC, Olmo E, Ozouf-Costaz C, Pisano E, Stanyon R (1992) A multiple
16 sex-chromosome system in Antarctic ice-fishes. **Polar Biol** 11:655–661.
- 17 Moyer SP, Ma DP, Thomas TL, Gold JR (1988) Characterization of a highly repeated satellite
18 DNA from the cyprinidae fish *Notropis lutrensis*. **Comp Biochem Physiol** 91: 639-646.
- 19 Mrackova M, Nicolas M, Hobza R, Negrutiu I, Monéger F, Widmer A, Vyskot B, Janousek B:
20 (2008) Independent origin of sex chromosomes in two species of the genus *Silene*.
21 **Genetics** 179:1129–1133.
- 22 Muller HJ (1914) A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. **J Exp Zool** 17:325–336.
- 23 Murofushi M, Nishikawa S, Yoshida TH (1983) Cytogenetical studies on fishes. Multiple sex
24 chromosome mechanism (XX-Y) found in two Dragonet fishes. **Proc Japan Acad**
25 59:58–61.
- 26 Nagai T, Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2008) Identification of the sex-determining
27 locus in the Thai medaka, *Oryzias minutillus*. **Cytogenet Genome Res** 121:137-142.
- 28 Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, de Souza ACP, Ferguson-Smith
29 MA (2010) Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus*
30 *carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. **BMC Genetics**
31 11:28.
- 32 Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y, Matsuo Y (2005) Molecular characterization and
33 evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of
34 quartet and quintet units in a genome. **Insect Mol Biol** 14:713-717.
- 35 Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Scharl M, Chourrout D (1994) Sex chromosome
36 polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the
37 ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma** 103:31-39.
- 38 Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JC (1990) Simple
39 repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the
40 guppy fish. **J Mol Evol** 30: 456–462.
- 41 Nanda I, Volff JN, Weis S, Körting C, Froschauer A, Schimid M, Scharl M (2000)
42 Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the
43 platyfish, *Xiphophorus maculatus*. **Chromosoma**, 109:173-180.

- 1 Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu
2 N, Shima A, Schimid M, Scharrl M (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex
3 determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. **Proc Natl Acad
4 Sci USA** 99:11778–11783.
- 5 Nelson, JS (2006) Fishes of the world (4th edition), Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
- 6 Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Granado A, Ron E (2007) Extensive polymorphism and
7 chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus*
8 *venezuelensis* (Characiformes, Characidae). **Genet Mol Biol** 30:25–30.
- 9 Nishioka Y, Dolan BM, Zahed L (1993) Molecular characterization of a mouse Y
10 chromosomal repetitive sequence amplified in distantly related species in the genus Mus.
11 **Genome** 36:588-593.
- 12 Noletto RB, Amorin AP, Vicari MR, Artoni RF, Cestari MM (2009) An unusual ZZ/ZW sex
13 chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the
14 presence of rDNA sites. **J Fish Biol** 75:448-453.
- 15 Ocalewicz K, Sliwinska A, Jankun M (2004) Autosomal localization of interstitial telomeric
16 sites (ITS) in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Pisces, Salmonidae). **Cytogenet Genome
17 Res** 105:79–82.
- 18 Ohno S (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Berlin Heidelberg New York
- 19 Oliveira C, Wright (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the
20 chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Res**
21 6: 205-211.
- 22 Oliveira C, Almeida-Toledo LF (2006) Evidence of an XX/XY sex chromosome system in the
23 fish *Domitator maculatus* (Teleostei, Eleotrididae). **Genet Mol Biol** 29:653-655.
- 24 Oliveira RR, Souza IL, Venere PC (2006) Karyotype characterization and ZZ/ZW sex
25 chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854
26 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotrop Ichthyol** 4:93-97.
- 27 Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F (2007) Karyotypic evolution in Neotropical fishes.
28 In Fish cytogenetics, Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kappor BG (Eds.), pp. 111-
29 164, Enfield, NH.
- 30 Oliveira RR, Feldberg E, dos Anjos MB, Zuanon J (2008) Occurrence of multiple sexual
31 chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus*
32 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica** 134:243-249.
- 33 Oyakawa OT (1990) Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerdae*) da
34 Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei, Erythrinidae). Unpublished, M.Sc.
35 Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo p.114.
- 36 Oyakawa OT (2003) Family Erythrinidae. In: Eds. Roberto Reis; Sven Kullander; Carl Ferraris.
37 (Org.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre:
38 **EDIPUCRS** 238-240.
- 39 Oyakawa OT, Mattox GMT (2009) Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias*
40 *lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of
41 two new species. **Neotrop ichthyol** 7:117-140.
- 42 Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisavo E, Bonillo C, Contanceau JP, Volff JN (2004)
43 Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1*
44 and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarct Sci** 16:51–57.

- 1 Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F (2007) Identification of a new repetitive
2 element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes:
3 Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenet Genome**
4 **Res** 116:218–223.
- 5 Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC (2008) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus*
6 (Teleostei, Characidae). 2 Chromosomal location of a satellite DNA. **Cytogenet Genome**
7 **Res** 122:61-66.
- 8 Pendás AM, Mórán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E (1994) Chromosomal location and
9 nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet**
10 **Cell Genet** 67:31-36.
- 11 Petrov DA (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. **Opinion**
12 **Trends Genet** 17: 23-28.
- 13 Pezold F (1984) Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus*
14 *shuffldti* (Pisces: Gobiidae). **Copeia** 1984:235–238.
- 15 Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein D (2001) Chromosome painting supports lack of
16 homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus*
17 (Salmonidae). **Genetica** 111:119-123.
- 18 Phillips RB, DeKoning J, Morasch MR, Park LK, Devlin RH (2007) Identification of the sex
19 chromosome pair in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and pink salmon (*Oncorhynchus*
20 *gorbuscha*). **Cytogenet Genome Res** 116: 298-304.
- 21 Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity,
22 fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83:2934–2938.
- 23 Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness
24 and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric
25 (hetero)chromatin. **Gene** 409: 72–82.
- 26 Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith MA, Rens W, Kratochvíl L (2010)
27 Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos
28 (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination.
29 **Chromosome Res** 18:809-820.
- 30 Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PC, Caputo V, Olmo
31 E, Ferguson-Smith MA, Rens W (2011) Strong conservation of the bird Z chromosome in
32 reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years
33 divergence. **Chromosoma** 120:455-468.
- 34 Poletto AB, Ferreira IA, Martins C (2010) The B chromosome of the cichlid fish *Haplochromis*
35 *obliquidens* harbors 18S rRNA genes. **BMC Genetics** 11: 1-8.
- 36 Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number
37 and genome size in eukaryotes. **Genome** 46: 48-50.
- 38 Rab P (1984) Chromosome study of four poeciliid fishes from Cuba. **Folia Zool** 33: 229-234.
- 39 Ráb P, Rábová M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikánová S (2008) Chromosome studies
40 of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker—
41 the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species
42 painting. **Chromosome Res** 16:863–873.

- 1 Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic
2 evidence from rDNA clusters variability in natural populations. **Proc Natl Acad Sci USA**
3 101:14818–14823.
- 4 Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A (2008) Repetitive DNA and chromosomal
5 rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenet Genome Res**
6 120:351–357.
- 7 Ravi V, Venkatesh B (2008) Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. **Curr Opin**
8 **Genet Dev** 18:544–550.
- 9 Reed KM, Phillips RB (1995) Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly
10 repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma** 104:242-251.
- 11 Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of south and
12 central America, EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- 13 Rens W, Grützner F, O'Brien PC, Fairclough H, Graves JAM, Ferguson-Smith MA (2004)
14 Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an
15 $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4X_5Y_5$ male sex chromosome constitution. **Proc Natl Acad Sci USA**
16 101:16257-16261.
- 17 Rice WR (1987) The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent
18 promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes.
19 **Evolution** 41:911–914.
- 20 Rohr CJ, Ranson H, Wang X, Besansky NJ (2002) Structure and evolution of mtanga, a
21 retrotransposon actively expressed on the Y chromosome of the African malaria vector
22 *Anopheles gambiae*. **Mol Biol Evol** 19:149-162.
- 23 Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP (2006) Constitutive heterochromatin,
24 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon sp.* (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW
25 sex chromosome system. **Genetica** 128:159-166.
- 26 Rosa R, Vanzela AL, Rubert M, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L (2009) Differentiation
27 of Y chromosome in the $X1X1X2X2/X1X2Y$ sex chromosome system of *Hoplias*
28 *malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Cytogenet Genome Res** 127:54-60.
- 29 Rossi AR, Gornung E (2005) Cytogenetic analysis of three Italian populations of *Coregonus*
30 *lavaretus* (Pisces, Salmoniformes) with chromosomal localization of major and minor
31 ribosomal genes, and telomeric repeats. **Hereditas** 142: 1-7.
- 32 Rozen S et al. (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and
33 ape Y chromosomes. **Nature** 423:873-876.
- 34 Sánchez S, Jorge LC (1999) A new report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus
35 *Triportheus* (Pisces, Triportheine). **Cytologia** 64:395-400.
- 36 Santi-Rampazzo AP, Nishiyama PEB, Ferreira PEB, Martins-Santos IC (2007) Cytogenetic
37 analysis and description of the sexual chromosome determination system ZZ/ZW of
38 species of the fish genus *Serrapinnus* (Characidae, Cheirodontinae). **Genet Mol Res**
39 6:504-509.
- 40 Sakamoto N, Chastain PD, Parniewski P, Ohshima K, Pandolfo M, Griffith JD, Wells RD
41 (1999) Sticky DNA: Self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y
42 triplex structures from Friedreich's ataxia. **Mol Cell** 3:465-475.
- 43 Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. (3th edition). Cold
44 Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- 1 Scavone MD, Julio Jr. HF (1995) Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in
2 ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon*
3 (*Loricariidae*, *Siluriformes*). **Braz J Genet** 18:31-35.
- 4 Schartl M (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. **Curr Opin**
5 **Genet Dev** 14:634.
- 6 Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Rupprecht A, Haaf T, Kaiser H (2002) Chromosome
7 banding in amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in
8 *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, *Leptodactylidae*).
9 **Cytogenet Genome Res** 97:81-94.
- 10 Schubert I, Schriever-Schwemmer G, Werner T, Adler ID (1992) Telomeric signals in
11 Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of
12 pseudoaneuploidy. **Cytogenet Cell Genet** 59:6-9.
- 13 Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard H (2001) Genomic and genetic
14 definition of a functional human centromere. **Science** 294:109-115.
- 15 Schultheis C, Böhne A, Schartl M, Volff J, Galiana-Arnoux D (2009) Sex determination
16 diversity and sex chromosome evolution in poeciliid fish. **Sex Dev** 3:68-77.
- 17 Schweizer D, Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C
18 band patterns. **Chromosomes Tod** 9:61-74.
- 19 Ser JR, Roberts RB, Kocher TD (2010) Multiple interacting loci control sex determination in
20 lake Malawi cichlid fish. **Evolution** 64:486-501.
- 21 Shetty S, Griffin DK, Graves JAM (1999) Comparative painting reveals strong chromosome
22 homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome Res** 7:289-295.
- 23 Shetty S, Kirby P, Zarkower D, Graves JAM (2002) DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role
24 in sex determination and discovery of a putative regulatory element. **Cytogenet Genome**
25 **Res** 99:245-251.
- 26 Shibata F, Hizume M, Kuroki Y (1999) Chromosome painting of Y chromosomes and isolation
27 of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*.
28 **Chromosoma** 108:266-270.
- 29 Shimoda N, Knapik EW, Ziniti J, Sim C, Yamada E, Kaplan S, Jackson D, de Sauvage F, Jacob
30 H, Fishman MC (1999) Zebrafish genetic map with 200 microsatellite markers.
31 **Genomics** 58:219-232.
- 32 Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et al. (2003) The male-
33 specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes.
34 **Nature** 423:825-837.
- 35 Singh L, Purdom IF, Jones KW (1976) Satellite DNA and evolution of sex chromosome.
36 **Chromosoma** 59: 43-62.
- 37 Singh L, Jones KW (1982) Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent
38 nonreciprocal crossover involving the X and an aberrant Y chromosome. **Cell** 28:205-216
- 39 Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ (1992) Cytogenetics of bisexual/unisexual
40 species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in
41 *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and
42 silver staining. **Cytogenet Cell Genet** 60:229-235.
- 43 Sola L, De Innocentiis S, Gornung E, Papalia S, Rossi AR, Marino G, De Marco P, Cataudella
44 S (2000) Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the
45 chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n
46 telomeric sequence. **Marine Biol** 137:47-51.

- 1 Stanyon R, Rocchi M, Capozzi O, Roberto R, Misceo D, Ventura M, Cardone MF, Bigoni F,
2 Archidiacono N (2008) Primate chromosome evolution: Ancestral karyotypes, marker
3 order and neocentromeres. **Chromosome Res** 16:17–39.
- 4 Stein J, Phillips RB, Devlin RH (2001) Identification of the Y chromosome in Chinook salmon
5 (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Cytogenet Cell Genet** 92:108-110.
- 6 Stein J, Reed KM, Wilson CC, Phillips R (2002) A sex-linked microsatellite locus isolated
7 from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. **Environ Biol Fishes**
8 64:211-216.
- 9 Steinemann M, Steinemann S (1992) Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a
10 trap for retrotransposons. **Proc Natl Acad Sci USA** 89:7591-7595.
- 11 Steinemann S, Steinemann M (2005) Y chromosomes: born to be destroyed. **BioEssays**
12 27:1076-1083.
- 13 Stephan W, Cho S (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-
14 repetitive noncoding DNA. **Genetics** 136: 333–341.
- 15 Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp**
16 **Cell Res** 75:304-306.
- 17 Sumner AT (2003) Chromosomes: organization and function (1st Edition). London:
18 Blackwell Publishing company.
- 19 Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y (1996) Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal
20 assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet**
21 **Cell Genet** 72:1-4.
- 22 Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Bertollo LAC, Dias AL (2006) Heteromorphic sex
23 chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a
24 catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). **Cytogenet Genome Res** 112:325-328.
- 25 Swier VJ, Bradley RD, Rens W, Elder FF, Baker RJ (2009) Patterns of chromosomal evolution
26 in *Sigmodon*, evidence from whole chromosome paints. **Cytogenet Genome Res** 125:54-
27 66.
- 28 Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2007a) Evolution of ZZ/ZW and XX/XY
29 sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O.*
30 *dancena*. **Chromosoma** 116: 463–470.
- 31 Takehana Y, Demiyah D, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2007b) Evolution of
32 different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*.
33 **Genetics** 175:1335-1340.
- 34 Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto
35 AB, Venere PC, Martins C (2009) Organization of repeated DNA elements in the genome
36 of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes.
37 **Cytogenet Genome Res** 125:224-234.
- 38 Tone M, Sakaki Y, Hashiguchi T, Mizuno S (1984) Genus specificity and extensive
39 methylation of the W chromosome-specific repetitive DNA sequences from the domestic
40 fowl, *Gallus gallus domesticus*. **Chromosoma** 89:228–237.

- 1 Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992)
2 Degenerate oligonucleotideprimed PCR: general amplification of target DNA by a single
3 degenerate primer. **Genomics** 13:718–725.
- 4 Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Silva AM, Feldberg E, Porto JIR (2008) Comparative
5 cytogenetics of *Carnegiella marthae* and *Carnegiella strigata* (Characiformes,
6 Gasteropelecidae) and description of a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genet Mol Biol**
7 31:231-234.
- 8 Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sanchez A, Camacho JPM (2009)
9 Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta*
10 *migratoria*. **Chromosome Res** 17:11–18.
- 11 Ueno K, Takai A (2008) Multiple sex chromosome system of $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ type in
12 lutjanid fish, *Lutjanus quinquelineatus* (Perciformes). **Genetica** 132: 35-41.
- 13 Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto A, Fantinatti BEA, Martins C (2011)
14 Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new
15 insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenet Genome**
16 **Res** 133: 34-42.
- 17 Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, Ruas CF, Sbalgueiro IJ, Giuliano-
18 Caetano L (2002) Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of
19 some animal and plant species. **Cytologia** 67:9-13.
- 20 Vari RP, Castro RMC, Raredon SJ (1995) The neotropical fish family Chilodontidae
21 (Teleostei: Characiformes): A phylogenetic study and a revision of *Centropus*
22 *Günther*. **Smiths Contrib Zool** 577:1-32.
- 23 Venere PC, Ferreira IA, Martins C, Galetti Jr. PM (2004) A novel ZZ/ZW sex chromosome
24 system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica** 121:75-
25 80.
- 26 Venkatesh B (2003) Evolution and diversity of fish genomes. **Curr Opin Genet Dev** 13:588–
27 592.
- 28 Venner S, Feschotte C, Biémont C (2009) Dynamics of transposable elements: Towards a
29 community ecology of the genome. **Trends Genet** 25:317-323.
- 30 Ventura K, O'Brien CM, Yonega-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA (2009) Chromosome
31 homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia,
32 Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest
33 diploid number in rodents. **Chromosome Res** 17:1063-1078.
- 34 Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2005) Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus*
35 (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genet Mol**
36 **Biol** 28:103-110.
- 37 Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LAC (2006) ZZ/ZW sex chromosome system
38 in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae).
39 **Cytogenet Genome Res** 114:163-168.
- 40 Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008a) Diversification of a ZZ/ZW sex
41 chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**
42 134:311–317.
- 43 Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008b) Co-localization of repetitive
44 DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax*
45 *janeiroensis*. **Cytogenet Genome Res** 122:67-72.

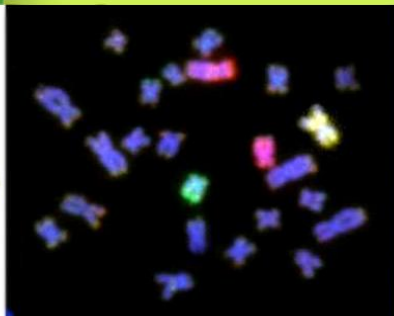
- 1 Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Origin and differentiation of
2 sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and
3 C-banding. **Genetica** 119:115-120.
- 4 Vieira CP, Coelho PA, Vieira J (2003) Inferences on the history of the *Drosophila americana*
5 polymorphic X/4 fusion from patterns of polymorphism at the X-linked *paralytic* and *elav*
6 genes. **Genetics** 164:1459–1469.
- 7 Viñas AM, Abuín BG, Pardo P, Martínez L (2004) Characterization of a new HpaI
8 centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. **Genetica** 121: 81-87.
- 9 Volff JN, Korting C, Sweeney K, Schartl M (1999) The non-LTR retrotransposon *Rex3* from
10 the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Mol Biol Evol** 16:1427–1438.
- 11 Volff JN, Schartl M (2001) Variability of sex determination in poeciliid
12 fishes. **Genetica** 111:101–110.
- 13 Volff JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C (2003) Diversity of retrotransposable
14 elements in compact pufferfish genomes. **Trends Genet** 19: 674–678.
- 15 Volff JN (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. **Heredity** 94: 280–294.
- 16 Vyskot B, Hobza R (2004) Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog.
17 **Trends Genet** 20: 432-438.
- 18 Wang X, Zhang Q, Ren J, Jiang Z, Wang C, Zhuang W, Zhai T (2009) The preparation of sex-
19 chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library
20 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Aquaculture** 297:78-84.
- 21 Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M, Son LS (2005) Advances in mechanisms of
22 genetic instability related to hereditary neurological diseases. **Nucl Acids Res** 33: 3785-
23 3798.
- 24 White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution* (3rd Edition) Cambridge University Press,
25 Cambridge.
- 26 Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton M J, Maltbie M, Baker RJ (1991) Genomic
27 distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal
28 evolution. **J Hered** 82: 369-377.
- 29 Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al. (2007) A unified classification system for eukaryotic
30 transposable elements. **Nat Rev Genet** 8:973-982.
- 31 Wilcox SA, Watson JM, Spencer JA, Graves JAM (1996) Comparative mapping identifies the
32 fusion point of an ancient mammalian X-autosomal rearrangement. **Genomics** 35:66–70.
- 33 Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, et al. (2003) Comparative genome
34 analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. **Genome Res** 13:272–
35 280.
- 36 Wright JM (1989) Nucleotide sequence, genomic organization and the evolution of a major
37 repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). **Nucleic Acids**
38 **Res** 17: 5071-5079.
- 39 Yang F, Graphodatsky AS (2009) Animal probes and ZOO-fish. In: *Fluorescence in situ*
40 *hybridization (FISH)—application guide*, Liehr T (Ed.), pp. 323–346, Springer, Berlin.

- 1 Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP (2009) Generation of paint probes by
2 flow-sorted and microdissected chromosomes. In: Fluorescence in situ hybridization
3 (FISH)—application guide, Liehr T (Ed.), pp. 35–52, Springer, Berlin.
- 4 Ye J, Eickbush TH (2006) Chromatin structure and transcription of the R1- and R2-inserted
5 rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. **Mol Cell Biol** 26: 8781- 8790.
- 6 Zhang J, Zhang YP, Rosenberg HF (2002) Adaptive evolution of a duplicated pancreatic
7 ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. **Nat Genet** 30:411-415.
- 8 Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH (2008) Role of recombination in the long-term retention
9 of transposable elements in rRNA gene loci. **Genetics** 180:1617-1626.
- 10 Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Nurul-Islam-Faridi M, Stelly DM (1997) A rapid
11 procedure for the isolation of C0t-1DNA from plants. **Genome** 40:138–142.

Tese de Doutorado

Material Suplementar

Evolução Cromossômica na família Erythrinidae



Marcelo de Bello Cioffi
São Carlos - 2011

SUMÁRIO

1. **Histórico Profissional** ii
2. **Lista de Publicações** iv
3. **Versão original dos artigos contidos na tese** vi

Anexo 1: Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: 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** 10:271 (2010)

Anexo 2: Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC: The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research** 132:289-296 (2011)

Anexo 3: Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC: Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. **Cytogenetic and Genome Research** 132:188-194 (2011)

Anexo 4: Cioffi MB, Molina WF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Molina W: Chromosomal distribution of repetitive DNA sequences highlights the independent differentiation of multiple sex chromosomes in two closely related fish species. **Cytogenetic and Genome Research** (2011)

Anexo 5: Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC: Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. **BMC Evolutionary Biology** 11:186 (2011)

Anexo 6: Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC: Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. **Genetica** 139:1065–1072 (2011)

1. HISTÓRICO PROFISSIONAL

- **Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura) - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar:** Mar/2004 – Dez/2007
 - **Bolsista de Iniciação Científica (FAPESP/2007/01169-8):** Projeto: Citogenética básica e molecular em *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae), com enfoque no sistema de cromossomos sexuais X1X2Y. Orientador: Prof. Dr. Luiz AC Bertollo
- **Mestrado em Genética e Evolução (Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução – UFSCar):** Mar/2008 a Fev/2010
 - **Bolsista Fapesp (2007/05565-5):** Projeto: Marcadores cromossômicos em *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Citogenética comparativa entre citótipos. Orientador: Prof. Dr. Luiz AC Bertollo
- **Doutorado em Genética e Evolução (Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução – UFSCar):** Mar/2010 a Dez/2011.
 - **Bolsista Fapesp (2009/14881-3):** Projeto: Evolução cromossômica na família Erythrinidae. Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e microdissecção de cromossomos sexuais. Orientador: Prof. Dr. Luiz AC Bertollo

Período Sanduíche realizado no exterior:

- Microdissecção cromossômica, elaboração de sondas e pintura cromossômica: (Set/2010 a Dez/2010)

- a) Universidad de Jaén (Jaén/ Espanha) - Departamento de Biología Experimental– Orientação: Prof. Dr. Antonio Sánchez Baca
- b) Universitätsklinikum Jena (Jena/Alemanha) - Institut für Humangenetik und Anthropologie - Orientação: Prof. Dr. Thomas Liehr

- Atualização e aplicação de técnicas de Citogenética Molecular no estudo dos cromossomos sexuais (Ago/2011 a Out/2011)

- a) Academy of the Sciences of the Czech Republic (Libechov/República Tcheca) – Laboratory of Fish Genetics. Responsável: Prof. Dr. Petr Ráb
- b) Academy of the Sciences of the Czech Republic (Brno/República Tcheca) - Institute of Biophysics. Responsável: Prof. Dr. Eduard Kejnovsky
- c) University of Würzburg (Würzburg/Alemanha) – Institut für Humangenetik. Responsável: Prof. Dr. Michael Schmid

- d) Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (Lyon/França) - Laboratory of Fish evolutionary Genomics. Responsável: Prof. Dr. Jean Nicolas Volff
- e) Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris/França) - Département Systématique et Evolution. Responsável: Prof. Dr. Catherine Ozouf-Costaz

- **Revisor de projetos e trabalhos científicos**

2010 - Periódico: International Journal of Genetics and Molecular Biology

2010 - Periódico: European Journal of Histochemistry

2011 - Periódico: Biological Journal of the Linnean Society

2011 - Periódico: Journal of Heredity

2011 - Periódico: Comparative Cytogenetics (Print)

2011 - Periódico: BMC Genomics

2011 - Periódico: Heredity (Edinburgh. Print)

2011 - Periódico: Molecular Cytogenetics

2011 - Assessor Ad-Hoc CNPq /FAPES.

2. LISTA DE PUBLICAÇÕES

- **Cioffi MB**, Molina W, Artoni RF, Bertollo LAC: Chromosomes as tools for discovering biodiversity. The case of Erythrinidae fish family. In: Cytogenetics, Tirunilai P (Ed.), InTech, Rijeka (*in press*)
- **Cioffi MB**, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC: The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes. An overview from fish scenario. *Journal of Fish Biology* (*in press*).
- **Cioffi MB**, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC: Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. *Genetica* 139:1065–1072 (2011)
- **Cioffi MB**, Kejnovsky E, Bertollo LAC: The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 132:289-296 (2011)
- **Cioffi MB**, Molina WF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Chromosomal distribution of repetitive DNA sequences highlights the independent differentiation of multiple sex chromosomes in two closely related fish species. *Cytogenetic and Genome Research* 134:295–302 (2011)
- **Cioffi MB**, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC: Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes. *BMC Evolutionary Biology* 11:186 (2011).
- Neto CCM, **Cioffi MB**, Bertollo LAC, Molina WF: Molecular cytogenetic analysis of Haemulidae fish (Perciformes): Evidence of evolutionary conservation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401: 75-79 (2011).
- **Cioffi MB**, Camacho JPM, Bertollo LAC: Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. *Cytogenetic and Genome Research* 132:188-194 (2011)
- Jacobina U, **Cioffi MB**, Souza, LGR, Calado LL, Tavares M, Manzella Jr J, Bertollo, LAC, Molina W. Chromosome mapping of repetitive sequences in *Rachycentron canadum* (Perciformes, Rachycentridae). Implications for karyotypic evolution and perspectives for biotechnological uses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1-8 (2011).

- Neto CCM, **Cioffi MB**, Bertollo LAC, Molina WF: Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401:75-79 (2011).
- **Cioffi MB**, Martins C, Bertollo LAC: 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* (Online) 10:271 (2010)
- Mota-Velasco, JC, Ferreira IA, **Cioffi MB**, Ocalewicz K, Campos-Ramos R, Shirak A, Lee BY, Martins C, Penman DJ.: Characterization of the chromosome fusions in *Oreochromis karongae*. *Chromosome Research* 18:575-586 (2010)
- **Cioffi MB**, Martins C, Rebordinos L, Vicari MR, Bertollo LAC: Differentiation of the XX/XY sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*: Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sexual Development* 4:176-185 (2010).
- **Cioffi MB**, Bertollo LAC: Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105: 554–561 (2010).
- Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Almeida MC, **Cioffi MB**, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF: Satellite DNA in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology* 76:1094:1116 (2010).
- **Cioffi MB**, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenetic and Genome Research* 125:132-141 (2009)
- Santos U, Volcker CM, Belei FA, **Cioffi MB**, Bertollo LAC, Paiva R, Dergam JA: Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). *Journal of Fish Biology* 75: 2326–2343 (2009)
- **Cioffi MB**, Martins C, Bertollo LAC: Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics* 10:34 (2009).
- Diniz D, Laudicina A, **Cioffi MB**, Bertollo LAC: Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Tripurtheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 122: 163-168 (2008).

3. VERSÃO ORIGINAL DOS ARTIGOS CONTIDOS NA TESE

Anexo 1

Dispersão de elementos transponíveis associados ao DNA ribossomal no genoma do peixe *Erythrinus erythrinus*. Implicações quanto às modificações genômicas e carioevolução em peixes

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC
BMC Evolutionary Biology 10:271 (2010)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish

Marcelo B Cioffi^{1*}, Cesar Martins², Luiz AC Bertollo¹

Abstract

Background: The fish, *Erythrinus erythrinus*, shows an interpopulation diversity, with four karyomorphs differing by chromosomal number, chromosomal morphology and heteromorphic sex chromosomes. Karyomorph A has a diploid number of $2n = 54$ and does not have differentiated sex chromosomes. Karyomorph D has $2n = 52$ chromosomes in females and $2n = 51$ in males, and it is most likely derived from karyomorph A by the differentiation of a multiple X_1X_2Y sex chromosome system. In this study, we analyzed karyomorphs A and D by means of cytogenetic approaches to evaluate their evolutionary relationship.

Results: Conspicuous differences in the distribution of the 5S rDNA and *Rex3* non-LTR retrotransposon were found between the two karyomorphs, while no changes in the heterochromatin and 18S rDNA patterns were found between them. *Rex3* was interstitially dispersed in most chromosomes. It had a compartmentalized distribution in the centromeric regions of only two acrocentric chromosomes in karyomorph A. In comparison, in karyomorph D, *Rex3* was found in 22 acrocentric chromosomes in females and 21 in males. All 5S rDNA sites co-localized with *Rex3*, suggesting that these are associated in the genome. In addition, the origin of the large metacentric Y chromosome in karyomorph D by centric fusion was highlighted by the presence of internal telomeric sites and 5S rDNA/*Rex3* sites on this chromosome.

Conclusion: We demonstrated that some repetitive DNAs (5S rDNA, *Rex3* retroelement and $(TTAGGG)_n$ telomeric repeats) were crucial for the evolutionary divergence inside *E. erythrinus*. These elements were strongly associated with the karyomorphic evolution of this species. Our results indicate that chromosomal rearrangements and genomic modifications were significant events during the course of evolution of this fish. We detected centric fusions that were associated with the differentiation of the multiple sex chromosomes in karyomorph D, as well as a surprising increase of associated 5S rDNA/*Rex3* loci, in contrast to karyomorph A. In this sense, *E. erythrinus* emerges as an excellent model system for better understanding the evolutionary mechanisms underlying the huge genome diversity in fish. This organism can also contribute to understanding vertebrate genome evolution as a whole.

Background

Repetitive DNA sequences include tandemly-arrayed satellites, as well as minisatellites, microsatellites and dispersed repeats such as transposable elements (TEs) [1]. Satellite DNAs are organized as long arrays of head-

to-tail linked repeats. TEs are DNA segments capable of integrating into new locations in the genome, and they also mobilize non-autonomous sequences [2,3]. TEs and satellite DNAs are some of the most important components of the genome that contribute to genetic variations within and between species [4]. The possible functions of these repetitive DNAs have been the focus of several studies, and there are indications that they

* Correspondence: mbello.ufscar@gmail.com

¹Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

could play important roles at both the chromosomal and nuclear levels [5-8].

Fish genomes contain all known types of transposable elements: classical DNA transposons, miniature inverted-repeat transposable elements and retroelements, which include long terminal repeat (LTR) retrotransposons and non-LTR retrotransposons [9]. While DNA transposons move directly as DNA molecules from one genomic site to another, retroelements transpose via an RNA intermediate. Among retrotransposable elements, *Rex* is comprised of various families of transposable elements that are abundant in teleosts. *Rex3*, the first reverse transcriptase (RT)-encoding retrotransposon isolated from the melanoma fish model, *Xiphophorus*, is a non-LTR element related to the RTE family that shows wide distribution and different patterns of organization in the genomes of several fish species [10,11].

The molecular organization and cytogenetic locations of repetitive DNAs, including rDNA repeats [12-18], satellite DNAs [19,20], telomeric sequences [18,21,22] and several classes of TEs [2,3,23,24], have been analyzed in a large number of fish species. These studies have demonstrated the enormous potential that the investigation of repetitive DNAs offers toward extending our knowledge of karyotype differentiation and sex chromosome evolution in fish [16,18,25-29]. These genomic components are able to change the molecular composition of sex chromosomes and reduce the rate of recombination between them, which are crucial steps in the differentiation of sex chromosomes [30-33].

Erythrinus is a cytogenetically poorly studied genus inside the Erythrinidae family. Until now, classical cytogenetic analyses have only been conducted with the species, *E. erythrinus*. These have shown a karyotypic diversity among populations, with four currently identified karyomorphs (A to D) [34]. Karyomorph A is comprised of populations with $2n = 54$ chromosomes, which have very similar karyotypic structures ($6m + 2st + 46a$) and an absence of differentiated sex chromosomes. Karyomorphs B, C and D share an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system, but they differ in their diploid number and chromosomal morphology. It has been proposed that a centric fusion between two non-homologous acrocentric chromosomes may have created the specific Y chromosome and, consequently, the unpaired X_1 and X_2 chromosomes in the male karyotypes. Karyomorph B has $2n = 54$ ($6m + 2st + 46a$) chromosomes in females and $2n = 53$ ($7m + 2st + 44a$) in males. Both karyomorphs C and D show $2n = 52/51$ chromosomes but differ in their karyotypic formula, i.e., $6m + 2sm + 6st + 38a$ in females and $7m + 2sm + 6st + 36a$ in males of karyomorph C and $4m + 2sm + 2st + 44a$ in females and $5m + 2sm + 2st + 42a$ in males of karyomorph D. The distinct chromosomal features found

among isolated populations suggest the occurrence of several unnamed new species within this fish group [34].

In this report, new samples from allopatric populations of karyomorphs A and D were analyzed using new methodological approaches and molecular cytogenetic analyses to find useful new characteristics for comparative genomics at the chromosomal level and to provide insights into the karyoevolutionary pathways in this fish group. The results show that chromosomal rearrangements and genomic modifications were significant events during the course of evolution of this fish. Centric fusions were found to be clearly associated with the differentiation of the multiple sex chromosomes in karyomorph D. In addition, a surprising increase in the number of associated 5S rDNA/*Rex3* loci was found in karyomorph D, in contrast to karyomorph A.

Results

Karyotyping and C-banding

The two populations showed evidence of the general karyotypic structures of the *Erythrinus* species, with few biarmed chromosomes and a large number of acrocentric ones (Fig. 1). The sample from Penápolis-SP showed $2n = 54$ chromosomes ($6m + 2st + 46a$) and lacked morphologically differentiated sex chromosomes, which is characteristic of karyomorph A. The samples from Natal-RN showed $2n = 52$ chromosomes ($4m + 2sm + 2st + 42a$) in females and $2n = 51$ chromosomes ($5m + 2sm + 2st + 42a$) in males, with a multiple $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system, which is characteristic of karyomorph D (Fig. 1). Conspicuous C-positive bands were observed in the centromeric/pericentromeric region of several chromosomes, as well as in the telomeric region of some pairs, in both karyomorphs. A small but significant heterochromatic block was found in the interstitial region of the long arms of the Y and X_1 chromosomes of karyomorph D (Fig. 1).

Nucleotide sequences

Nucleotide sequences were determined for the *Rex3* clones to confirm that the PCR-isolated DNA fragments corresponded to copies of the retrotransposable element, *Rex3*. One of these sequences was deposited in GenBank under the accession number, GU989321. NCBI BlastN searches identified a similarity between the *E. erythrinus* *Rex3* sequence and sequences found in fish from other distinct orders, such as Anguilliformes, Perciformes, Beloniformes, Cyprinodontiformes and Tetraodontiformes.

Cytogenetic mapping of 18S and 5S rDNAs, *Rex3* and (TTAGGG)_n telomeric repeats

Double-FISH with 5S and 18S rDNAs showed a similar distribution pattern for the 18S rDNA sites in both the

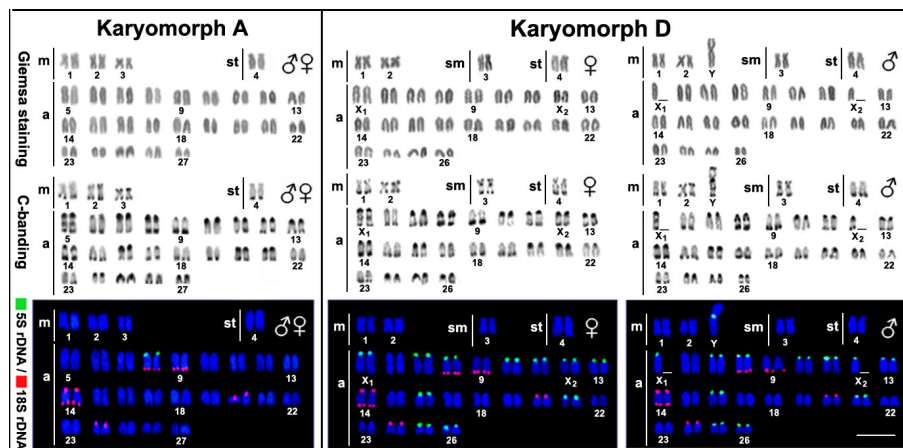


Figure 1 Karyotypes of males and females of *Erythrinus erythrinus* (karyomorphs A and D) under different cytogenetic analyses. The karyotypes, arranged by sequentially Giemsa-stained and C-banded chromosomes, were probed with 5S rDNA and 18S rDNA after a double-FISH analysis. Note the significant increase of 5S rDNA sites in karyomorph D. m, metacentric chromosomes; sm, submetacentric chromosomes; st, subtelocentric chromosomes; a, acrocentric chromosomes. Bar = 5 μ m.

A and D karyomorphs. Five acrocentric pairs with telomeric sites on the long or short arms were found. In addition, bitelomeric sites were found on pair no. 14. In contrast, a large difference was seen in 5S rDNA distribution. Karyomorph A showed only two 5S rDNA sites in the centromeric region of acrocentric pair no. 8, which also bears a telomeric 18S rDNA site on its long arm. Although karyomorph D shared the syntenic condition seen in karyomorph A, it showed a surprising increase in the number of 5S rDNA sites, with 22 in females and 21 in males. These sites were all found in the centromeric region of acrocentric chromosomes except for a site in the metacentric Y chromosome in males (Fig. 1).

Double-FISH with 5S rDNA and *Rex3* probes showed that *Rex3* has an interstitial and dispersed distribution pattern along most chromosomes in both karyomorphs. In addition, *Rex3* clusters were predominantly located in the centromeric regions and co-localized with heterochromatic blocks in both karyomorphs, which matches the 5S rDNA distribution pattern (Fig. 2).

Mapping of the (TTAGGG)_n telomeric repeats in males of karyomorph D showed the typically expected telomeric signals on both telomeres of all chromosomes. Interstitial telomeric sites (ITS) were located in the centromeric regions of the only submetacentric pair and on the largest metacentric Y chromosome (Fig. 3).

Discussion

Among Characiformes fish, which include the Erythrinidae family, the most frequent chromosomal number is $2n = 54$, and this number may represent the basal diploid number of this order [35]. In this context, karyomorph A of *E. erythrinus*, which has a diploid

number of $2n = 54$, may have the most primitive karyotype found in the *Erythrinus* genus. This finding also takes into account the fact that differentiated sex chromosomes are absent in this karyomorph. Similarly, karyomorph D, which is most likely derived from karyomorph A, shows a smaller diploid number due to chromosomal rearrangements and a well-differentiated multiple $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system. However, despite differences in diploid numbers and the occurrence of differentiated sex chromosomes, karyomorphs A and D share a relatively similar karyotypic structure formed by several acrocentric and a few biarmed chromosomes with similarly distributed C-bands and 18S rDNA sites. However, the repetitive 5S rDNA and *Rex3* sequences have quite distinct distributions in the two karyomorphs.

A reduction in chromosome numbers often results from centric fusion rearrangements from acrocentric chromosomes. Based only on classical cytogenetic data, it was previously proposed that an initial centric fusion gave rise to the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex system found in karyomorphs B, C and D of *E. erythrinus*. Also, it was proposed that the differentiation of karyomorph D resulted from another centric fusion between two non-homologous acrocentric chromosomes, which was the origin of the only submetacentric pair found in the karyotype. In addition, pericentric inversions completed this karyotypic differentiation by decreasing the number of metacentric chromosomes and increasing the number of acrocentric chromosomes [34]. Indeed, this karyomorph differentiation in *E. erythrinus* has now been corroborated by our FISH mapping of repetitive DNA sequences (Fig. 4).

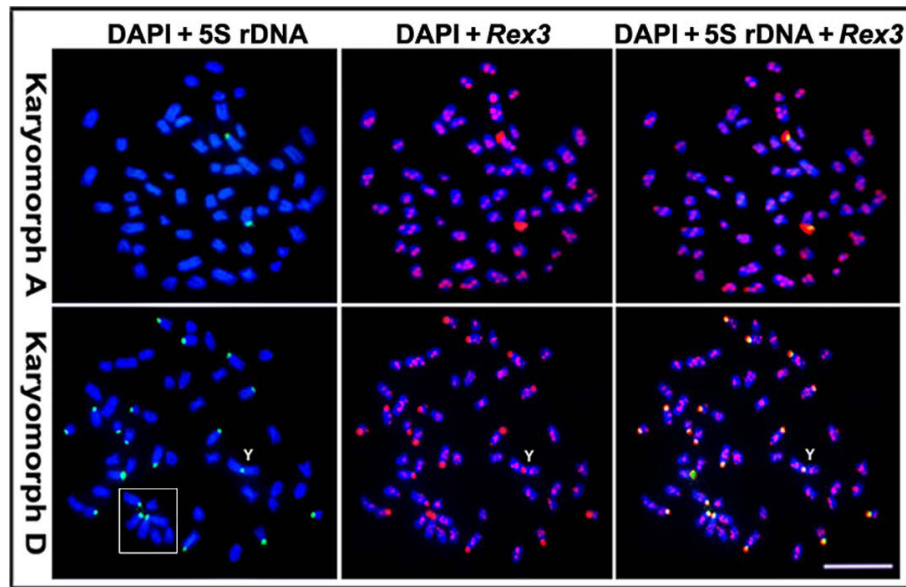


Figure 2 Metaphase plates of karyomorphs A and D of *Erythrinus erythrinus* showing the locations of the 5S rDNA and the *Rex3* retroelement on the chromosomes using double-FISH analysis. Note the dispersed interstitial pattern of *Rex3* in both karyomorphs and its co-localization with the 5S rDNA on the centromeric region of the chromosomes. The box indicates the clear aggregation of some acrocentric chromosomes, which was seen in almost all chromosome preparations. The Y chromosome is indicated. Bar = 5 μ m.

The chromosomal location of 5S rDNA, *Rex3* and telomeric repeats clearly corroborates the centric fusions that occurred during the karyotypic differentiation of karyomorph D. The mapping of ITS in the centromeric region of the submetacentric pair highlights the centric fusion that was involved in the origin of this chromosome pair, which is not found in karyomorph A. Similarly, our results support the proposed origin for the largest metacentric Y chromosome from another centric fusion. As expected, (TTAGGG)_n repeats were also found in the centromeric region of this chromosome (Fig. 3). ITS have been found in the centromeric region of a large number of vertebrate species, suggesting that chromosomal rearrangements can occur without the loss of these telomeric sequences [36]. The general hypothesis that ITS may be remnants of chromosome rearrangements that occurred during genome evolution is supported by several investigations [37].

The location of 5SrDNA/*Rex3* sequences at the centromeric position of the Y chromosome is of particular relevance. These sequences were found in the centromeric region of several acrocentric chromosomes, including the ones proposed as X₁ (no. 5) and X₂ (no. 12) in the karyotype. The mapping of 5S rDNA/*Rex3* sites in the centromeric region of the Y chromosome suggests that this chromosome was created from a centric fusion of acrocentric pairs (nos. 5 and 12), which gave rise to the unpaired X₁ and X₂ chromosomes in the male karyotype (Figs. 1 and 2). Although the

identification of the X₂ chromosome remains unclear, the X₁ chromosome appears to be the first acrocentric pair (no. 5) in this karyotype. This result is supported by the C-banding pattern in which a faint but informative C-positive band occurs interstitially in corresponding regions of the X₁ chromosome and the long arm of the Y chromosome. It is probable that the same centric fusion also gave rise to the X₁X₂Y sex system in karyomorphs B and C, since it appears to have originated before the divergence of these three karyomorphs [34] (Fig. 4).

The most remarkable difference between karyomorphs A and D was the distribution of 5S rDNA/*Rex3* sites over the chromosomes. While only a single chromosome pair was found to bear these sites in karyomorph A, a surprisingly large number of these sites were found in karyomorph D, with 22 sites in females and 21 in males. (Figs 2 and 4). *Rex3*, a non-LTR retrotransposon first isolated from the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, shows a wide distribution among teleost fishes, where it appears to be associated with the evolution of different lineages [10,11]. Although *Rex3* shows a preferential localization in the centromeric region of chromosomes in some fishes [23,24,38-40], it is widely scattered over all chromosomes in several Antarctic ice-fish species, with intense hybridization signals in some specific chromosomal regions [3]. Since a large majority of fish species studied until now harbor a low number of 5S rDNA sites, with a few exceptions [41,42], the high

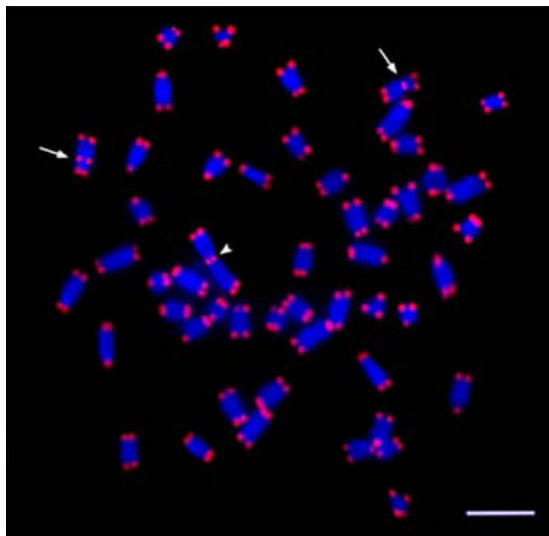


Figure 3 Male metaphase plate of *Erythrinus erythrinus* karyomorph D showing the location of the telomeric hybridization signals on both telomeres of all chromosomes. In addition, ITS are found in the centromeric region of the only submetacentric pair in the karyotype (arrows) and on the large metacentric Y chromosome (arrowhead). Bar = 5 μ m.

number of 5S rDNA sites found in karyomorph D was an intriguing feature. According to the most probable hypothesis that karyomorph D represents a derivative form compared to karyomorph A, our results clearly show a huge dispersal of 5S rDNA/*Rex3* elements throughout the centromeric regions of the acrocentric chromosomes. We hypothesize that *Rex3* may have inserted into 5S rDNA sequences and that the 5S rDNA-*Rex3* complex moved and dispersed in the karyotype, although this hypothesis deserves further investigation and a molecular characterization. The clear association among the centromeric regions of the acrocentric chromosomes appears to be a favorable condition for this spreading (see details in Fig. 2).

Previous reports have suggested that the rDNA locus can serve as an ideal niche for the long-term survival of TEs [43], as seen in several organisms [44-46]. *In situ* hybridization revealed permanent clustering of different TEs in the NOR regions, as well as near or within clusters of 5S rDNA [45,47]. Hybridization on extended DNA fibers identified insertions of TEs inside the rDNA region, the overlap of rDNA and TE-enriched regions, and small fragments of rDNA inside TE-enriched regions. The presence of TEs in or around rDNA sites increases the possibility for recombination, which appears to be a common event in plant karyotype evolution [48]. In flowering plants, the distribution of 5S rDNA genes is highly variable and may be partially explained by the activity of small non-autonomous retrotransposons named Cassandra [49]. It is currently

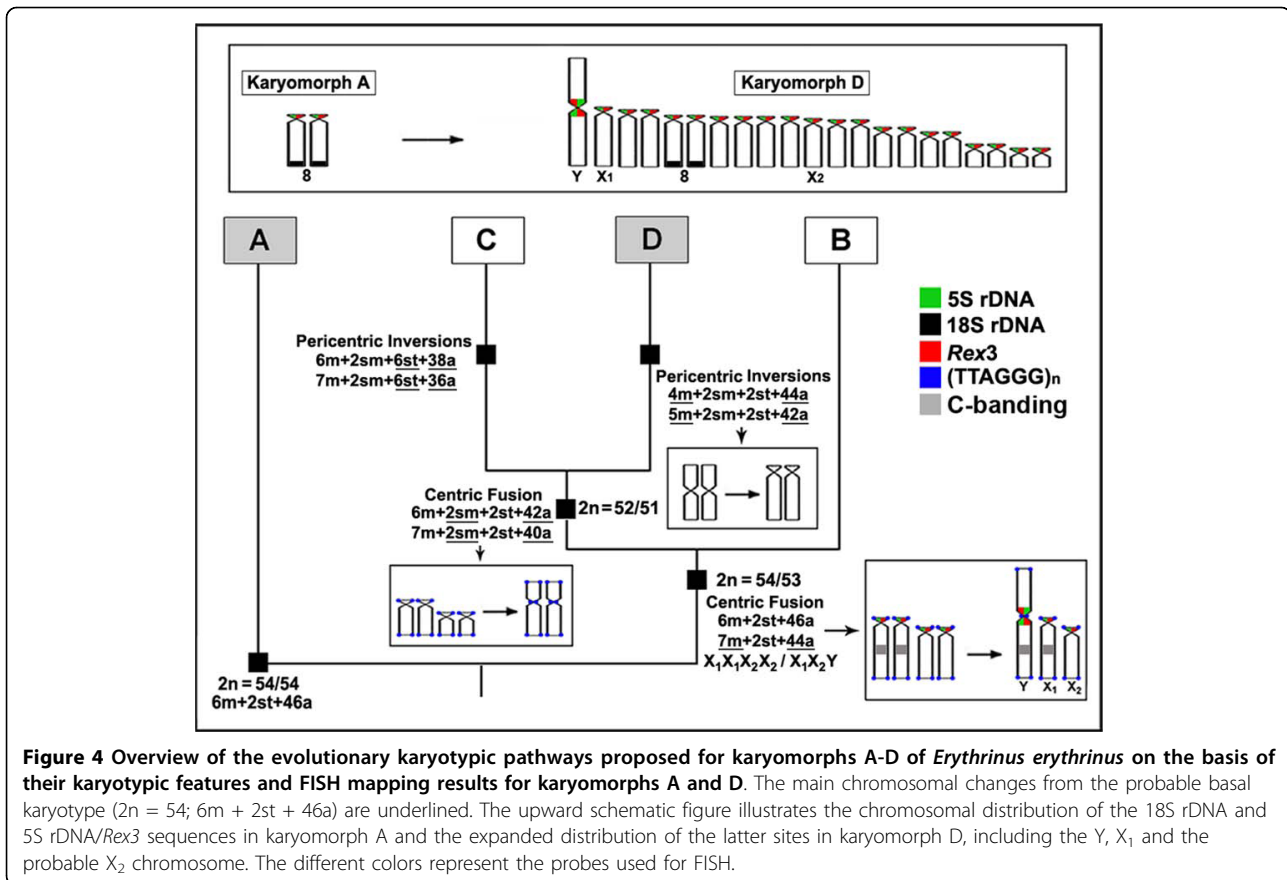
believed that TEs tend to accumulate in heterochromatic regions because there are fewer genes and a weaker selection in the heterochromatin than in the euchromatin [50]. Recent studies have proposed that the activity of TEs is one possible source for rDNA movement [43,48]. Studies have also documented the ability of some classes of transposons to capture entire genes and move them to different parts of the genome [51,52].

Thus, considering the correlation between karyotype rearrangement and retrotransposon activity [3], and that rapid chromosomal evolution in some vertebrate lineages may be driven by the activity of repetitive sequences [53], we propose two probable alternatives during the karyotypic diversification of *E. erythrinus*, i.e., (i) the chromosomes of this species have undergone rearrangements during an evolutionary process mediated by retrotransposon activity or (ii) rearrangement events, including posterior mobilization of TEs, promoted the karyotypic differentiation among populations. However, it is difficult to state if a change in TE content or activity is the cause or the consequence of a speciation process because the true role of transposable elements in speciation is still a subject of large debate [6].

The frequent switching between different sex determination systems and the rapid evolution of sex chromosomes in fishes may also be linked to the formation of new species [54]. Recent comparative studies have revealed that teleost genomes have experienced a higher rate of gene-linkage disruption and chromosomal rearrangements compared to mammals, which may be linked to the apparent plasticity of their genomes [55,56]. Studies in fish models would therefore help in better understanding the molecular and evolutionary mechanisms underlying the huge genome diversity in this group, and these studies would also contribute to our understanding of vertebrate genome evolution.

Conclusion

Our *in situ* investigation of repetitive DNA sequences resulted in useful new characteristics for comparative genomics at the chromosomal level and provided insights into the karyoevolutionary pathways in *E. erythrinus* fish. Chromosomal rearrangements and genomic modifications were significant events during the course of karyoevolution of this fish. The spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the genome and the differentiation of a multiple sex chromosome system was strongly associated with the evolution of karyomorph D. Considering the facts that fish occupy the basal position in the phylogeny of vertebrates, that they have a diversity of sex determining mechanisms and that many fish species lack heteromorphic sex chromosomes, *E. erythrinus* emerges as an excellent model system for better understanding the



evolutionary mechanisms underlying the huge genome diversity found among vertebrates.

Methods

Specimens, mitotic chromosome preparation, chromosome staining and karyotyping

In this study, we analyzed new samples from populations of karyomorphs A and D of the fish, *E. erythrinus*. We studied a total of 28 specimens (16 males and 12 females). Overall, 13 specimens (8 males and 5 females) of karyomorph A were obtained from Penápolis - São Paulo State, and 15 specimens (8 males and 7 females) of karyomorph D were obtained from Natal - Rio Grande do Norte State. These samples belong to distinct Brazilian hydrographic basins, which are isolated by thousands of kilometers.

Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney using the conventional air-drying method [57]. The experiments followed ethical conducts, and anesthesia was used prior to sacrificing the animals. The process was approved by the FAPESP committee under no. 2009/14881-3. Chromosomes were sequentially Giemsa-stained and C-banded using barium hydroxide to detect the C-positive heterochromatin [58].

Approximately 30 metaphase spreads were analyzed per specimen to determine the diploid chromosome number and karyotype structure. Images were captured by the CoolSNAP system software, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), coupled to an Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan). The chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) or acrocentric (a) according to the arm ratios [59].

Chromosome probes

Two tandemly-arrayed DNA sequences isolated from the genome of another Erythrinidae species, *Hoplias malabaricus*, were used. The first probe contained a 5S rDNA repeat copy and included 120 base pairs (bp) of the 5S rRNA transcribing gene and 200 bp of the non-transcribed spacer (NTS) [12]. The second probe corresponded to a 1,400-bp segment of the 18S rRNA gene obtained via PCR from nuclear DNA [16]. The 5S and 18S rDNA probes were cloned into plasmid vectors and propagated in DH5α *E. coli* competent cells (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

The retrotransposable element, *Rex3*, was obtained by PCR directly from the genome of *E. erythrinus* using the

primers *Rex3f* (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG) and *Rex3r* (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT- 3'), as previously described [2,3]. The obtained nucleotide segment of the *Rex3* transposon corresponds to the encoding domains 1, 2, 2A, A and B of the RT gene [2]. A PCR-generated amplicon (~500 bp) was isolated from a gel, purified with the Sephadex Band Prep Kit (Pharmacia Biotech, Orsay, France) and ligated into the pGEM-T plasmid (Promega, Heidelberg, Germany). This plasmid was used to transform DH5 α *E. coli* competent cells (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The positive clones were sequenced on an ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA) with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA). The nucleotide sequence was subjected to Blastn [60] searches at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> for the identification of any similarity of the isolated sequences to any known sequences from the nucleotide collection (nt/nr), whole-genome shotgun reads (WGS), genomic survey sequences (GSS) and high-throughput genomic sequences (HTGS) in GenBank.

The 5S rDNA probe was labeled with biotin-14-dATP by nick translation according to the manufacturer's recommendations (BioNick™ Labeling System; Invitrogen, San Diego, CA, USA). The 18S rDNA and *Rex3* probes were labeled by nick translation with DIG-11-dUTP according to the manufacturer's instructions (Roche, Mannheim, Germany).

A probe from the telomeric DNA sequence (TTAGGG)_n was generated by PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit, Roche) in the absence of a template using (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅ as primers [37].

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed under high stringency conditions on mitotic chromosome spreads [61]. The metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 μ g/ml) for 1.5 h at 37°C. After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide/2 \times SSC at 70°C, spreads were incubated in 2 \times SSC for 4 min at 70°C. The hybridization mixture (2.5 ng/ μ l probes, 2 μ g/ μ l salmon sperm DNA, 50% deionized formamide, 10% dextran sulphate) was dropped on the slides, and the hybridization was performed overnight at 37°C in a moist chamber containing 2 \times SSC. Two post-hybridization washes were carried out on a shaker (150 rpm) at 37°C. The first wash was in 2 \times SSC, 50% formamide for 15 min, followed by a second wash in 2 \times SSC for 15 min. A final wash was performed at room temperature in 4 \times SSC for 15 min. Avidin-FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for signal detection of the 5S rDNA probe and anti-digoxigenin-rhodamine (Roche, Mannheim, Germany) for 18S rDNA, *Rex3* and

(TTAGGG)_n probes. One-color FISH was performed to detect (TTAGGG)_n repeats, while 5S/18S rDNA and 5S rDNA/*Rex3* were detected by double-FISH. The chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 μ g/ml), mounted in Antifade solution (Vector, Burlingame, CA, USA) and analyzed in an epifluorescence microscope Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan)

Abbreviations

2n: diploid number; DAPI: 4'-6-Diamidino-2-phenylindole; FITC: fluorescein isothiocyanate; FISH: fluorescent in-situ hybridization; ITS: interstitial telomeric sites; LTR: long terminal repeats; NCBI: National Center for Biotechnology Information; NOR: nucleolar organizer region; NTS: non-transcribed spacer; PCR: polymerase chain reaction; RT: reverse transcriptase; rDNA: ribosomal DNA; SSC: sodium chloride-sodium citrate buffer; TEs: transposable elements.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Christian Biémont for his helpful suggestions and critical review of the manuscript and to Dr. Wagner Franco Molina for supplying fish specimens. This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Author details

¹Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brazil. ²UNESP- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, Brazil.

Authors' contributions

MBC performed the experiments and drafted the manuscript. CM helped in analysis and drafted the manuscript. LACB designed and coordinated the study, and drafted and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 10 May 2010 Accepted: 6 September 2010

Published: 6 September 2010

References

1. Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J: **Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements.** *Cytogenet Genome Res* 2005, **110**:462-467.
2. Volff JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C: **Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes.** *Trends Genet* 2003, **19**:674-678.
3. Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisavo E, Bonillo C, Contanceau JP, Volff JN: **Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish.** *Antarct Sci* 2004, **16**:51-57.
4. Biémont C: **Within-species variation in genome size.** *Heredity* 2008, **101**:297-298.
5. Larin Z, Fricker MD, Tyler-Smith C: **De novo formation of several features of a centromere following introduction of an Y alphoid YAC into mammalian cells.** *Hum Mol Genet* 1994, **3**:689-695.
6. Biémont C, Vieira C: **Junk DNA as an evolutionary force.** *Nature* 2006, **443**:521-524.
7. Feschotte C, Pritham EJ: **DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes.** *Annu Rev Genet* 2007, **41**:331-368.
8. Longo MS, Carone DM, Marzelli M, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, O'Neill MJ, O'Neill RJ: **Distinct retroelement classes define evolutionary breakpoints demarcating sites of evolutionary novelty.** *BMC Genomics* 2009, **10**:334.
9. Volff JN: **Genome evolution and biodiversity in teleost fish.** *Heredity* 2005, **94**:280-294.
10. Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharlt M: **The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**:1427-1438.

11. Malik HS, Eickbush TH: The RTE class of non-LTR retrotransposons is widely distributed in animals and is the origin of many SINES. *Mol Biol Evol* 1998, **15**:1123-1134.
12. Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5 S rDNA. *Genetica* 2006, **127**:133-141.
13. Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC: Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet Mol Biol* 2005, **28**:103-110.
14. Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Co localization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janeiroensis*. *Cytogenet Genome Res* 2008, **122**:67-72.
15. Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics* 2009, **10**:34.
16. Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae Fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res* 2009, **125**:132-141.
17. Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Diniz D, Moreira-Filho O: Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Rev Fish Biol Fisheries* 2009, **20**:1-8.
18. Cioffi MB, Bertollo LAC: Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 2010.
19. Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C: Comparative chromosome mapping of 5 S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fish (Characiformes) with emphasis on *Hoplias malabaricus* "species complex". *Cytogenet Genome Res* 2007, **118**:78-83.
20. Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC: Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 Chromosomal location of a satellite DNA. *Cytogenet Genome Res* 2008, **122**:61-66.
21. Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ: Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma* 2002, **111**:45-52.
22. Sola L, De Innocentis S, Gornung E, Papalia S, Rossi AR, Marino G, De Marco P, Cataudella S: Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18 S and 5 S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence. *Marine Biol* 2000, **137**:47-51.
23. Mazzuchelli J, Martins C: Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 2009, **136**:461-469.
24. Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC, Martins C: 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* 2009, **125**:224-234.
25. Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JC: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 1990, **30**:456-462.
26. Nanda I, Volff JN, Weis S, Körtling C, Froschauer A, Schimid M, Scharlt M: Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* 2000, **109**:173-180.
27. Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schimid M, Scharlt M: A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:11778-11783.
28. Stein J, Phillips RB, Devlin RH: Identification of the Y chromosome in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet* 2001, **92**:108-110.
29. Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F: Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res* 2007, **116**:218-223.
30. Liu ZY, Moore PH, Ma H, Ackerman CM, Ragiba M, Yu Q, Pearl HM, Kim MS, Charlton JW, Stiles JI, Zee FT, Peterson AH, Ming R: A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 2004, **427**:348-352.
31. Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G: Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 2005, **95**:118-128.
32. Marchal JA, Acosta MJ, Bullejos M, Puerma E, Díaz de la Guardia R, Sánchez A: Distribution of L1-retrotransposons on the giant sex chromosomes of *Microtus cabreræ* (Arvicolidae, Rodentia): functional and evolutionary implications. *Chromosome Res* 2006, **14**:177-186.
33. Kejnovsky E, Hobza R, Cermák T, Kubát Z, Vyskot B: The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 2009, **102**:533-541.
34. Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcão JN, Fenocchio : Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 2004, **93**:228-233.
35. Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F: Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In *Fish cytogenetics*. Edited by: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kappor BG. Enfield NH, USA: Science Publisher; 2007:111-164.
36. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK: Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:7049-7053.
37. Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST: Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:4780.
38. Dasilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Crollius HR: Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:1636-1641.
39. Bouneau L, Fisher C, Ozouf-Costaz C, Froschauer A, Jaillon O, Coutanceau JP, Korting C, Weissenbach J, Bernot A, Volff JN: An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res* 2003, **13**:1686-1695.
40. Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E: Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenet Genome Res* 2009, **127**:43-53.
41. Affonso PRAM, Galetti PM Jr: Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica* 2005, **123**:227-233.
42. Poletto AB, Ferreira IA, Martins C: The B chromosome of the cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbors 18 S rRNA genes. *BMC Genetics* 2010, **11**:1-8.
43. Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH: Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 2008, **180**:1617-1626.
44. Eickbush TH: R2 and related site-specific non-long terminal repeat retrotransposons. In *Mobile DNA II*. Edited by: Craig NL, Craigie R, Gellart M, Lambowitz AM. Washington DC: American Society of Microbiology; 2002:813-835.
45. Belyayev A, Raskina O, Nevo E: Variability of Ty3 gypsy retrotransposons chromosomal distribution in populations of two wild Triticeae species. *Cytogenet Genome Res* 2005, **109**:43-50.
46. Ye J, Eickbush TH: Chromatin structure and transcription of the R1- and R2-inserted rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 2006, **26**:8781-8790.
47. Raskina O, Belyayev A, Nevo E: Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA clusters variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:14818-14823.
48. Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A: Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 2008, **120**:351-357.
49. Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg O, Schulman A: Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5 S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:5833-5838.
50. Venner S, Feschotte C, Biémont C: Dynamics of transposable elements: Towards a community ecology of the genome. *Trends Genet* 2009, **25**:317-323.
51. Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR: Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* 2004, **431**:569-573.

52. Lai Z, Nakazato T, Salmasso M, Burke JM, Tang S, Knapp SJ, Rieseberg LH: **Extensive chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species.** *Genetics* 2005, **171**:291-303.
53. Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ: **Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution.** *J Hered* 1991, **82**:369-377.
54. Barske LA, Capel B: **Blurring the edges in vertebrate sex determination.** *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**:499-505.
55. Ravi V, Venkatesh B: **Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity.** *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**:544-550.
56. Venkatesh B: **Evolution and diversity of fish genomes.** *Curr Opin Genet Dev* 2003, **13**:588-592.
57. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae).** *Brazil J Genet* 1978, **1**:103-120.
58. Sumner AT: **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Exp Cell Res* 1972, **75**:304-306.
59. Levan A, Fredga K, Sandberg AA: **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas* 1964, **52**:201-220.
60. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403-410.
61. Pinkel D, Straume T, Gray J: **Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:2934-2938.

doi:10.1186/1471-2148-10-271

Cite this article as: Cioffi *et al.*: 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* 2010 **10**:271.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 2

Distribuição cromossômica de microssatélites no genoma do peixe *Hoplias malabaricus*, com enfoque nos cromossomos sexuais

Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC
Cytogenetic and Genome Research 132:289-296 (2011)

The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes

M.B. Cioffi^a E. Kejnovsky^b L.A.C. Bertollo^a

^aUniversidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, Brazil; ^bLaboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Brno, Czech Republic

Key Words

Fish sex chromosomes • Fluorescence in situ hybridization • *Hoplias malabaricus* • Microsatellites

Abstract

Distribution of 12 mono-, di- and tri-nucleotide microsatellites on the chromosomes of 2 karyomorphs with 2 distinct sex chromosome systems (a simple XX/XY – karyomorph B and a multiple $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ – karyomorph D) in *Hoplias malabaricus*, commonly referred to as wolf fish, was studied using their physical mapping with fluorescence in situ hybridization (FISH). The distribution patterns of different microsatellites along the chromosomes varied considerably. Strong hybridization signals were observed at subtelomeric and heterochromatic regions of several autosomes, with a different accumulation on the sex chromosomes. A massive accumulation was found in the heterochromatic region of the X chromosome of karyomorph B, whereas microsatellites were gathered at centromeres of both X chromosomes as well as in corresponding regions of the neo-Y chromosome in karyomorph D. Our findings are likely in agreement with models that predict the accumulation of repetitive DNA sequences in regions with very low recombination. This pro-

cess is however in contrast with what was observed in multiple systems, where such a reduction might be facilitated by the chromosomal rearrangements that are directly associated with the origin of these systems.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Given the absence of differentiated sex chromosomes in most fish species, along with the presence of distinct sex chromosome systems in other ones, fish prove to be an excellent model for evolutionary analysis of sex chromosomes. This is in contrast to the comparatively stabilized sex chromosome systems found in higher vertebrates. Intriguingly, repetitive DNA sequences have accumulated on fish sex chromosomes in a manner that is different to the enrichment found on autosomes, thereby highlighting the potential role of these sequences in the differentiation of fish sex chromosomes [Nanda et al., 1990; Martins, 2007; Cioffi et al., 2010].

The wolf fish, *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), is a neotropical freshwater fish with remarkable karyotypic diversity, characterized by 7 well-differentiated karyomorphs [Bertollo et al., 2000]. Four sex chromosome systems occur in this nominal species, namely XX/XY

(karyomorph B), $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (karyomorph D), XX/XY_1Y_2 (karyomorph G), and an incipient XX/XY system (karyomorph C) [Bertollo et al., 2000; Cioffi and Bertollo, 2010]. Karyomorph B ($2n = 42$) shows a well-differentiated XX/XY sex chromosome system, characterized by a medium-sized subtelocentric X chromosome and a Y that is the smallest submetacentric chromosome in the karyotype. The differentiation of these sex chromosomes was accomplished by the accumulation of repetitive DNA sequences, thereby highlighting an unusual enrichment of repetitive sequences on the X chromosome in fish [Born and Bertollo, 2000; Cioffi et al., 2010]. Moreover, karyomorph D ($2n = 40$ females/ $2n = 39$ males) is characterized by an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system, exclusive for this chromosomal form. In this karyomorph, the male-specific neo-Y chromosome is a large submetacentric chromosome, resulting from the tandem fusion of an ancestral medium-sized Y chromosome and a small autosome [Bertollo et al., 1997]. Thus, some repetitive DNA sequences appear to be associated with the differentiation of sex chromosome systems [Cioffi and Bertollo, 2010].

In this study, we aim to characterize the chromosomal distribution of different classes of microsatellites in the genome of karyomorphs B and D of the fish *H. malabaricus*, focusing on their distribution within the sex chromosomes.

Material and Methods

Twelve males of *H. malabaricus* belonging to karyomorph B, and 11 males belonging to karyomorph D were collected from the Doce River basin (Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais State, Brazil) and Monjolinho stream (UFSCar reservoir, São Paulo State, Brazil), respectively. The specimens were deposited in the fish collection facility of the Cytogenetic Laboratory, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney using the conventional air-drying method [Bertollo et al., 1978].

Fluorescence in situ hybridization experiments were performed as described in Kubat et al. [2008], with slight modifications. We used the following labeled oligonucleotides as probes: $(GA)_{15}$, $(CA)_{15}$, $(C)_{30}$, $(CAC)_{10}$, $(GC)_{15}$, $(CAA)_{10}$, $(A)_{30}$, $(CAG)_{10}$, $(CAT)_{10}$, $(GAG)_{10}$, $(TAA)_{10}$ and $(CGG)_{10}$. These sequences were directly labeled with Cy3 at the 5' end during synthesis by VBC-Biotech (Vienna, Austria). Because of the short length of the microsatellite probes used in this study we applied low stringent condition in our FISH experiments. The used conditions were then optimized for obtaining specific and reproducible signal pattern for all microsatellite probes despite their different composition and melting temperature. When we used more stringent hybridization washes ($0.1 \times$ SSC, 42°C) [Lengerova et al., 2004], no sig-

nal was observed, while at less stringent conditions or no washing non-specific binding of the probes resulting in strong signal background appeared (data not shown). The denatured probe (500 ng of DNA) was applied to the slide, covered with a plastic coverslip, and hybridized for 18 h at 37°C . Slides were then washed at room temperature, twice for 5 min each in $2 \times$ SSC and once for 1 min in $1 \times$ PBS. Slides were analyzed using an Olympus Provis microscope, and image analysis was performed using ISIS software (Metasystems).

Results

We studied the chromosomal distribution of microsatellites in karyomorphs B and D in *Hoplias malabaricus* using fluorescence in situ hybridization (FISH) with the following labeled oligonucleotides: $(A)_{30}$, $(C)_{30}$, $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(GC)_{15}$, $(CAA)_{10}$, $(CAC)_{10}$, $(CAG)_{10}$, $(CAT)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(GAG)_{10}$, $(TAA)_{10}$. A discrete banding pattern was observed in some microsatellites, whereas others were uniformly distributed along chromosomes. In general, the same distribution pattern was found in both karyomorphs when looking at the distribution of a specific microsatellite probe in autosomes. However, the sex chromosomes demonstrated a remarkable and specific accumulation of several microsatellites, usually located in their heterochromatic regions.

Chromosomal Distribution of Microsatellites on Autosomes

The probes $(GA)_{15}$, $(CA)_{15}$, $(C)_{30}$, $(GC)_{15}$ and $(CAA)_{10}$ provided a rich banding pattern in the subtelomeric region along most chromosome arms, with some signals appearing stronger and more extended than the others. The microsatellites $(A)_{30}$ and $(TAA)_{10}$ provided strong dispersed signals across the entire length of all chromosomes, highlighting their widespread presence in the genome of *H. malabaricus*. However, some specific highly repetitive bands were characteristic of particular chromosome pairs, in which most of the probes were more or less clustered around the subtelomeric regions whereas some others had a centromeric location. Particularly, there was a remarkable difference in the hybridization pattern of $(CGG)_{10}$ probe between karyomorphs B and D, once this probe showed a dispersed distribution pattern over all autosomes in karyomorph B and a remarkable accumulation in the subtelomeric regions of almost all chromosomes in karyomorph D. The following trinucleotide microsatellites, $(CAC)_{10}$, $(CAG)_{10}$, $(CAT)_{10}$ and $(GAG)_{10}$, all produced a scattered distribution and are thus more spread out along the chromosomes. Among

them, (CAG)₁₀ exhibited the smallest number of hybridization signals, especially in karyomorph D, with some weak signals on the heterochromatic areas of just a few chromosomes (fig. 1 and 2).

Chromosomal Distribution of Microsatellites on Sex Chromosomes

The sizes of the X and Y chromosomes in karyomorph B differ significantly due to a marked accumulation of heterochromatin on the long arm of the X chromosome. Accordingly, this chromosome showed a strong concentration of most microsatellites in its conspicuous heterochromatic block, unlike the pattern found on the Y chromosome. The microsatellites (C)₃₀, (A)₃₀, (GAG)₁₀ and (CGG)₁₀ exhibited the strongest accumulation, while (GA)₁₅, (CA)₁₅ and (TAA)₁₀ had only slight accumulation on the X chromosome. Furthermore, the microsatellites (CAC)₁₀, (GC)₁₅, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀ and (CAT)₁₀ were uniformly spread along this chromosome, with just some weak signals in the heterochromatic areas. Most microsatellites on the Y chromosome were slightly accumulated in the centromeric and/or telomeric heterochromatic regions. Again, the (C)₃₀, (A)₃₀, (GAG)₁₀ and (CGG)₁₀ sequences showed a higher accumulation in the telomeric region of this chromosome (fig. 1).

Intriguingly, the hybridization pattern found for the multiple X₁, X₂ and neo-Y sex chromosomes of karyomorph D was very different from that found for the X and Y chromosomes of karyomorph B. Several microsatellites, including (GA)₁₅, (CA)₁₅, (C)₃₀, (GC)₁₅, (GAG)₁₀ and (TAA)₁₀, showed varying extents of accumulation along the neo-Y chromosome. Given that the neo-Y chromosome originated from a tandem fusion event that merged the ancestral homologs of the X₁ and X₂ chromosomes, it is not surprising that the same general distribution pattern of microsatellites was found in corresponding regions. The (CAG)₁₀ repeats exhibited the smallest accumulation across all sex chromosomes. The (CA)₁₅, (C)₃₀, (A)₃₀, (CAT)₁₀ and (CGG)₁₀ repeats were abundant only in the centromeric region of the X₁ and neo-Y chromosomes. The most accumulated microsatellite was (C)₃₀, found on the X₂ chromosome and on the corresponding region (the final segment of the long arm) of the neo-Y. Similarly, the microsatellites (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (TAA)₁₀ and (CGG)₁₀ were accumulated on the long arm of X₁ and in the corresponding region (short arm) of the neo-Y chromosomes (fig. 2). Figure 3 provides an ideogram summarizing the overall distribution of all microsatellites on the sex chromosomes.

Discussion

Chromosomal Distribution of Microsatellites on Autosomes

In the present study, we used fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect clustering of microsatellites in the genome of the two karyomorphs (B and D) of the fish *H. malabaricus*. All of the probes we used generated evident signals on both euchromatic and heterochromatic chromosomal regions but were preferentially located in heterochromatic regions. A strong accumulation of the microsatellites (GA)₁₅, (CA)₁₅, (C)₃₀, (GC)₁₅, (CAA)₁₀, (A)₃₀ and (TAA)₁₀ was found in the genomes of both karyomorphs, especially in subtelomeric regions. Moreover, some of these microsatellite repeats were also found to be even more clustered in other fish species. For example, Siluriformes fish, *Imparfinis schubarti* (Hepptapteridae), *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae) and *Rineloricaria latirostris* (Loricariidae), exhibit remarkable accumulation of both (GA)₁₅ and (A)₃₀ microsatellites in telomeric regions [Vanzela et al., 2002]. Furthermore, in zebrafish, *Danio rerio*, the (CA)₁₅ and (GC)₁₅ repeats are preferentially located in centromeric and telomeric regions [Shimoda et al., 1999]. This preferential accumulation in particular locations may indicate chromosomal regions where microsatellites are present as very large perfect or degenerate arrays. Comparison of microsatellite evolution between various taxonomic groups could further elucidate the processes underlying differences in the dynamics of their genomes [Kejnovsky et al., 2009a].

The general distribution patterns of microsatellites did not indicate a universal mode of evolution that was common for both karyomorphs of *H. malabaricus*. Microsatellites differed dramatically in their genomic concentrations, suggesting that the more abundant repeats may play a significant role in generating the genetic diversity of *H. malabaricus*. In addition, the distribution patterns of some microsatellites, such as (CAG)₁₀, (CAC)₁₀, (CGG)₁₀, (C)₃₀ and (CAT)₁₀, were distinct between karyomorphs B and D, indicating that they might also contribute to genetic differentiation between the distinct karyotypic forms of this fish group.

Chromosomal Distribution of Microsatellites on Sex Chromosomes

In the present study, we focused on the distribution pattern of microsatellites found in the sex chromosomes. To the best of our knowledge, this is the first time that this approach has been conducted in fish.

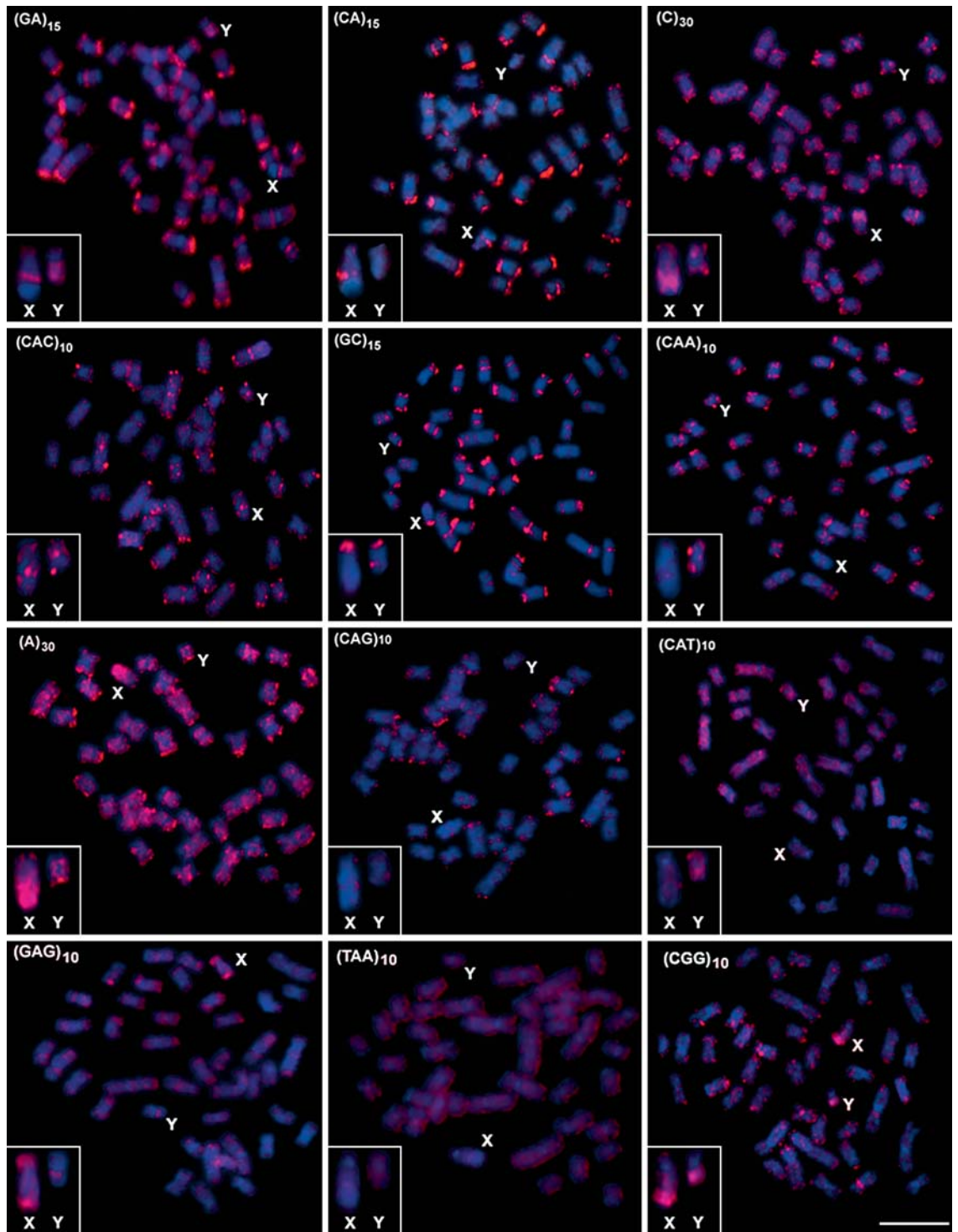


Fig. 1. Mitotic metaphase chromosomes of *Hoplias malabaricus* males (karyomorph B) with an XY sex chromosome system, hybridized with different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Chromosomes were counterstained with DAPI (blue) and microsatellite probes were directly labeled with Cy3 during synthesis (red signals). The X and Y chromosomes are indicated and are also shown in enlarged forms in boxes. Bar = 5 μ m.

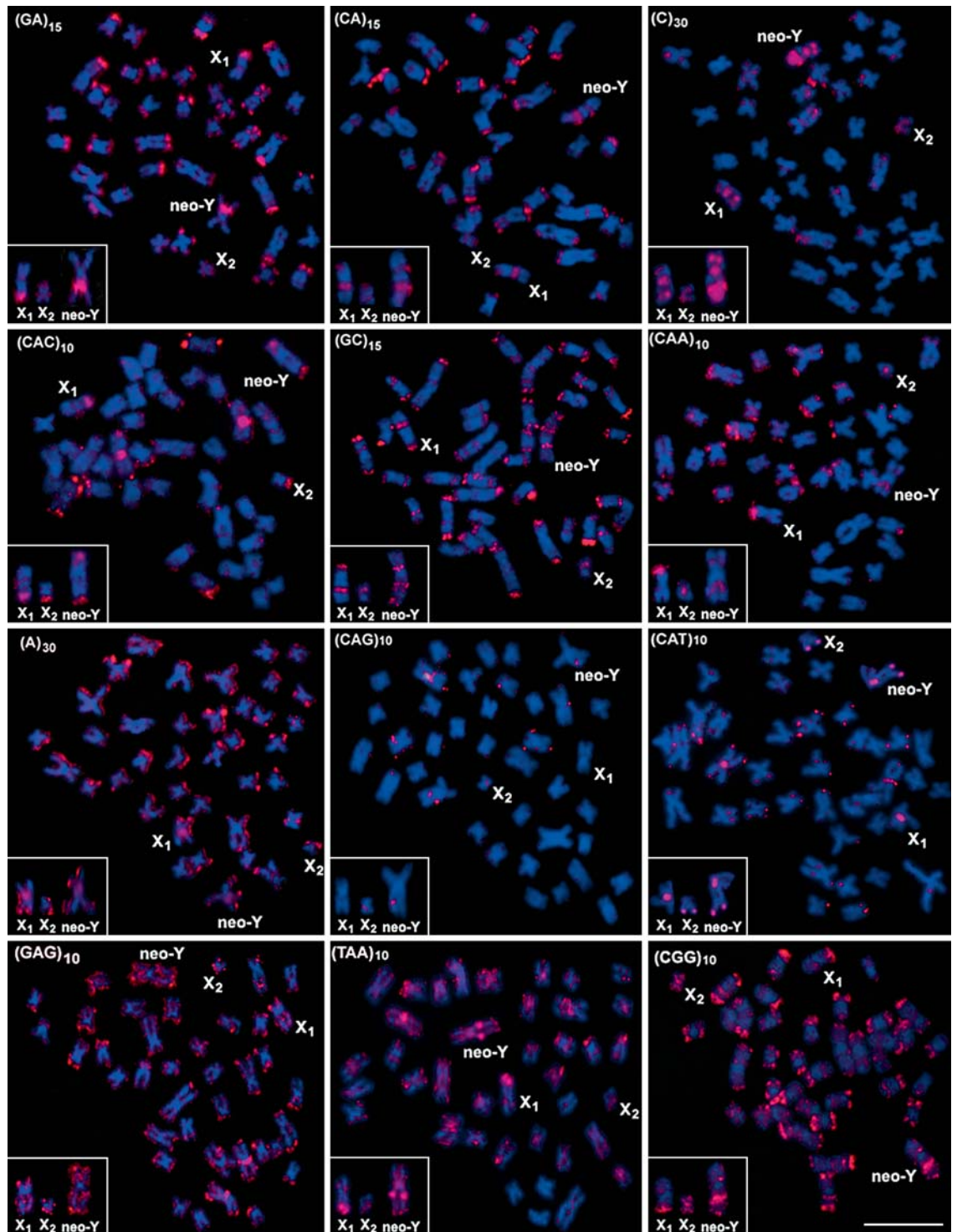


Fig. 2. Mitotic metaphase chromosomes of *Hoplias malabaricus* males (karyomorph D) with an X_1X_2Y sex chromosome system, hybridized with different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Chromosomes were counterstained with DAPI (blue) and microsatellite probes were directly labeled with Cy3 during synthesis (red signals). The X_1 , X_2 and neo-Y chromosomes are indicated and are also shown in enlarged forms in boxes. Bar = 5 μm .

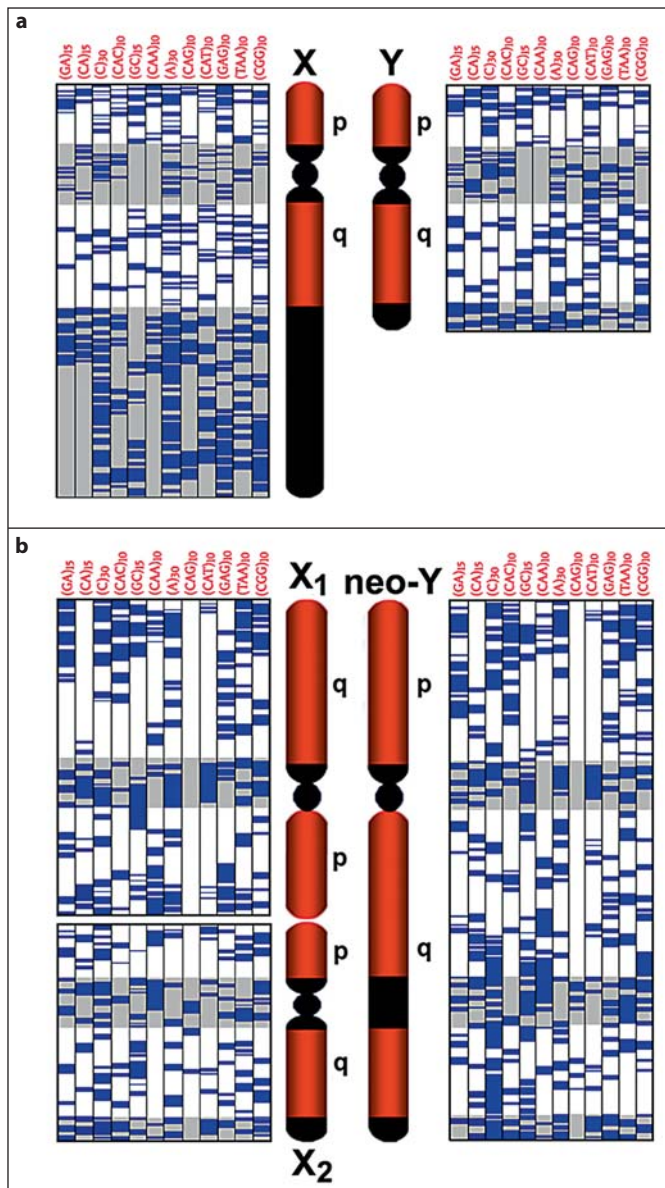


Fig. 3. Schematic map of the sex chromosomes of *Hoplias malabaricus*, highlighting the patterns of distribution for microsatellites, derived from FISH data. **a** X and Y chromosomes from karyomorph B. **b** X₁, X₂ and neo-Y chromosomes from karyomorph D. The black segments and the blue bars represent the heterochromatinic regions and the patterns of microsatellite distribution in the chromosomes, respectively. Note the conspicuous accumulation of microsatellites in the X chromosome of karyomorph B versus the relative absence of accumulation in the sex chromosomes of karyomorph D. This diagram depicts the origin of the long arm of the neo-Y chromosome, resulting from a tandem fusion of the short arms of 2 chromosomes that are similar to X₁ and X₂.

A comparative analysis reveals that in karyomorph B, the corresponding heterochromatinic regions of the Y and X chromosomes have relatively similar patterns of microsatellite distribution. A previous report also showed the presence of distinct repetitive DNA sequences mapped over these sex chromosomes, such as a satellite 5S*Hind*III-DNA site at the centromeric region, as well as a concentration of (GATA) sequence in the proximal region of long arms of both X and Y chromosomes [Cioffi et al., 2010]. Different microsatellites were accumulated in the heterochromatinic region of the X chromosome, reinforcing our previous hypothesis that this chromosome accumulates more repetitive DNAs than the Y chromosome [Cioffi et al., 2010], and, moreover, suggesting their involvement in the differentiation of this chromosome.

In fish species, heterochromatinization is commonly associated with the differentiation of the ZW and XY sex chromosome systems [Galetti Jr. and Foresti, 1986; Moreira-Filho et al., 1993; Artoni et al., 2001; Almeida-Toledo et al., 2000]. Similarly, in *H. malabaricus* karyomorph B, an increase of heterochromatin has driven the differentiation of the X chromosome and contributed to its large size in comparison to the Y chromosome. Simple sex chromosome systems originated when an ordinary pair of autosomes stopped recombining and began gradually diverging from each other [Ohno, 1967]. It resulted in degeneration of genes and the accumulation of repetitive DNA sequences within these non-recombining regions [Charlesworth et al., 2005; Bergero and Charlesworth, 2009]. As microsatellites accumulated in heterochromatin regions of the X chromosome, prior to recent genome expansion, it could have triggered the evolutionary divergence of the X and Y chromosomes, subsequently increasing the size of the X chromosome.

Unlike in karyomorph B, the multiple X₁X₂Y sex chromosome system found in karyomorph D originated from the tandem fusion of an early differentiated Y chromosome and an autosome. Although the association of several repetitive DNA sequences with the differentiation of this sex chromosome system was also verified, there was no detectable accumulation of heterochromatin in the sex chromosomes, in contrast to what occurs in karyomorph B [Cioffi and Bertollo, 2010]. Therefore, the stability of the sex determination in karyomorph D depends on the alternate segregation of the X₁ and X₂ chromosomes in relation to the neo-Y from the male sex trivalent. In fact, this is evident in this karyomorph once similar frequencies of 2 types of spermatocytes ($n = 20$, X₁X₂; $n = 19$, neo-Y) are produced during meiosis [Bertollo and Mestriner, 1998]. Thus, the differentiation of multiple

systems is achieved through chromosomal rearrangements that occurred during their own origin. Furthermore, the heterochromatin that is present in the sex chromosomes is 'pre-existing', meaning that there is no significant increase in the amount of heterochromatin compared to other sex systems, such as XY or ZW. The chromosomal rearrangements that have occurred in multiple sex systems may, in and of themselves, reduce or suppress recombination at sites near the breakpoints [Vieira et al., 2003], suggesting that other events may not be necessary to trigger this process. This model can also explain why almost all of the microsatellites in the neo-Y chromosome have approximately the same pattern of distribution as the corresponding chromosomal regions of the X_1 and X_2 chromosomes (fig. 3). In spite of this similarity, it is also noteworthy that some microsatellites show a pattern that is somewhat differentiated, for example the $(C)_{30}$ and $(GA)_{15}$ repeats are accumulated on the long arm of the neo-Y chromosome, thereby indicating that a certain degree of differentiation from the ancestral X_2 homolog already occurred (fig. 2 and 3).

It is possible that the accumulation of microsatellites plays an important role in sex chromosome evolution. This could be a consequence of their ability to adopt unusual DNA conformations, including hairpins, triplex, tetraplex or 'sticky DNA' [Sakamoto et al., 1999; Kejnovská et al., 2003; Wells et al., 2005]. Potential interactions of 'sticky DNA' can bring together distant regions of the same chromosome, thereby facilitating recombination-based processes, such as gene conversion. Indeed, the role of gene conversion in the formation of large palindromes and the protection of genes located on the Y chromosome have been demonstrated in humans [Skaltsky et al., 2003]. Similarly, gene conversion was suggested as a mechanism of homogenization for transposable elements located on the Y chromosome [Kejnovsky et al., 2007]. Non-B DNA conformations adopted by microsatellites can serve as the breakpoints for large rearrangements, such as inversions, that are thought to play a key role in the evolution of sex chromosomes [Kejnovsky et al., 2009b].

Suppression of recombination is a prerequisite for stable genetically determined sex systems, and thus the massive accumulation of repetitive sequences, including microsatellites, usually occurs in non-recombining regions. In this way, our findings are in agreement with models predicting accumulation of repetitive DNA sequences in regions with very low recombination, such as near centromeres and telomeres, where satellites are typically accumulated, thereby forming the heterochromatic parts of

the chromosomes [Charlesworth et al., 1994; Stephan and Cho, 1994].

In summary, we have illustrated a comparative scenario for the distribution of microsatellites across 2 distinct fish sex chromosome systems, a simple XY and a multiple X_1X_2 neo-Y. We have also demonstrated the probable involvement of such sequences in the origin and differentiation of sex chromosomes. We hypothesize that the differential distribution of microsatellites along the chromosomes in both systems is a direct reflection of their mode of origin. Therefore, the accumulation of repetitive sequences appears to be important in XY systems, perhaps representing an initial step in reducing the exchange between the 2 ancestral undifferentiated chromosomes. In *H. malabaricus* karyomorph B (XY system) microsatellites are accumulated in the heterochromatin of the X chromosome while e.g. in the dioecious plant *Silene latifolia* (evolutionary young XY system) microsatellites are more gathered on the Y chromosome [Kubat et al., 2008]. In *H. malabaricus* karyomorph D (X_1X_2 neo-Y system) the localization of microsatellites on the neo-Y reflects its origin from 2 progenitor chromosomes. It suggests that various processes determining dynamism of microsatellites on the evolving sex chromosomes can be in action including both accumulation of repetitive DNA in non-recombining or heterochromatin parts of sex chromosomes and large chromosomal rearrangements that formed multiple sex chromosome systems.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and by the Grant Agency of the Czech Republic (grant P305/10/0930) and from the Academy of Sciences of the Czech Republic (grants AV0Z50040507 and AV0Z50040702).

References

- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho AS: Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma* 109:197–200 (2000).
- Artoni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triplotheus*. *Chromosome Res* 9: 449–456 (2001).

- Bergero R, Charlesworth D: The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends Ecol Evol* 24:94–102 (2009).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1:103–120 (1978).
- Bertollo LAC, Mestriner CA: The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Res* 6:141–147 (1998).
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res* 5:493–499 (1997).
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotoxic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613 (2000).
- Born GG, Bertollo LAC: An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res* 8:111–118 (2000).
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220 (1994).
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G: Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118–128 (2005).
- Cioffi MB, Bertollo LAC: Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X_1X_2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* (Epub ahead of print). doi:10.1038/hdy.2010.18 (2010).
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC: Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sex Dev* 4:176–185 (2010).
- Galetti PM Jr., Foresti F: Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet Cell Genet* 43:43–46 (1986).
- Kejnovská I, Kypr J, Vorličková M: Circular dichroism spectroscopy of conformers of (guanine plus adenine) repeat strands of DNA. *Chirality* 15:584–592 (2003).
- Kejnovsky E, Hobza R, Kubat Z, Widmer A, Marais GAB, Vyskot B: High intrachromosomal similarity of retrotransposon long terminal repeats: Evidence for homogenization by gene conversion on plant sex chromosomes? *Gene* 390:92–97 (2007).
- Kejnovsky E, Leitch I, Leitch A: Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes. *Trends Ecol Evol* 24:572–582 (2009a).
- Kejnovsky E, Hobza R, Kubat Z, Cermak T, Vyskot B: The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 102:533–541 (2009b).
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E: Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome* 51:350–356 (2008).
- Lengerova M, Kejnovsky E, Hobza R, Macas J, Grant SR, Vyskot B: Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia*. *Theor Appl Genet* 108:1193–1199 (2004).
- Martins C: Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 421–453 (Science Publisher, Inc., Enfield 2007).
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti PM Jr: Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46:115–125 (1993).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JC: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30:456–462 (1990).
- Ohno S: *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*. Springer, Berlin Heidelberg New York (1967).
- Sakamoto N, Chastain PD, Parniewski P, Ohshima K, Pandolfo M, Griffith JD, Wells RD: Sticky DNA: Self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol Cell* 3:465–475 (1999).
- Shimoda N, Knapik EW, Ziniti J, Sim C, Yamada E, et al: Zebrafish genetic map with 200 microsatellite markers. *Genomics* 58:219–232 (1999).
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et al: The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825–837 (2003).
- Stephan W, Cho S: Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136:333–341 (1994).
- Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, et al: Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia* 67:9–13 (2002).
- Vieira CP, Coelho PA, Vieira J: Inferences on the history of the *Drosophila americana* polymorphic X/4 fusion from patterns of polymorphism at the X-linked *paralytic* and *elav* genes. *Genetics* 164:1459–1469 (2003).
- Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M, Son LS: Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucl Acids Res* 33:3785–3798 (2005).

Anexo 3

DNAs Repetitivos e Diferenciação dos Cromossomos Sexuais em Peixes Neotropicais

Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC
Cytogenetic and Genome Research 132: 188-194 (2011)

Repetitive DNAs and Differentiation of Sex Chromosomes in Neotropical Fishes

M.B. Cioffi^a J.P.M. Camacho^b L.A.C. Bertollo^a^aDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil;^bDepartamento de Genética, Universidad de Granada, Granada, Spain

Key Words

Chromosomal evolution · Erythrinidae fish ·
Heteromorphic sex chromosomes · Repetitive sequences

Abstract

The processes working on sex chromosome differentiation are still not completely understood. However, the accumulation of repetitive DNA sequences has been shown to be one of the first steps in the early stages of such differentiation. In addition, regions with suppressed or no recombination have a potential to accumulate these DNA sequences and, for this reason, the absence of recombination between the sex chromosomes favors, by itself, the accumulation of repetitive sequences on these chromosomes during evolution. The diversity of sex-determining mechanisms in fish, alongside with the absence of heteromorphic sex chromosomes in many species, makes this group a useful model to better understand evolutionary processes of sex chromosomes in vertebrates, considering that fish occupy the basal position in the phylogeny of this group. In this review we draw attention to a preferential accumulation and enrichment in repetitive DNAs in sex chromosomes of many neotropical fish species in comparison with autosomes. This phenomenon has been observed between both morphologically differentiated and nascent sex chromosome systems, which highlight the potential role of these sequences in the differentiation of fish sex chromosomes generating differences in morphology and size between them.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Repetitive DNA constitutes a large fraction of the eukaryotic genome [Jurka et al., 2005], including tandemly-arrayed satellite, minisatellite and microsatellite DNA sequences, and dispersed elements such as transposons and retrotransposons [Charlesworth et al., 1994]. The chromosomal organization of these DNA sequences has provided new insights for understanding genome evolution and was useful to reveal the process of sex chromosome differentiation in many vertebrate species.

Advances in studies of the non-coding repetitive DNA sequences have shown that they play important roles in the structural and functional organization of the genome [Schueler et al., 2001; Biémont and Vieira, 2006]. A clear correlation between sex chromosomes and repetitive DNAs has been pointed out in several studies [Singh et al., 1976; Nanda et al., 1990; Nishioka et al., 1993; Erlandsson et al., 2000; Schmid et al., 2002; Vicente et al., 2003; Steinemann and Steinemann, 2005; Hobza et al., 2006; Marchal et al., 2006; Matsubara et al., 2006; Vicari et al., 2008; Kejnovsky et al., 2009; Wang et al., 2009; Cioffi and Bertollo, 2010; Cioffi et al., 2010], indicating that the differentiation of sex chromosomes is frequently associated with the accumulation of repetitive DNA sequences in these chromosomes. It is well known that repetitive DNAs can also occur and accumulate in the autosomes of several organisms. However, sex chromosomes are preferred sites for the accumulation of these elements, since it is favored by the absence or low frequency of recombination in these chromosomes [Charlesworth et al., 2005].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com© 2010 S. Karger AG, Basel
1424–8581/11/1323–0188\$38.00/0Accessible online at:
www.karger.com/cgrLuiz Antonio Carlos Bertollo
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos
Departamento de Genética e Evolução
CP 676, São Carlos, SP 13565-905 (Brazil)
Tel. +55 16 3351 8431, Fax +55 16 3351 8377, E-Mail bertollo@ufscar.br

It is postulated that structural and/or DNA changes should occur for sex chromosome differentiation, in order to achieve the partial or complete suppression of crossing-over between the ancestral homomorphic X and Y chromosomes [Ohno, 1967]. The accumulation of repetitive sequences, resulting fundamentally from transposition and amplification processes, is believed to take place at first in the vicinity of the sex-determining region, favored by the absence or low frequency of recombination events in this area. The suppression of recombination favors the accumulation of gene mutations, leading to numerous deletions of the functionally inactivated genes and accumulation of repetitive DNA sequences, generating morphological and size differentiation during the early stages of sex chromosome evolution [Bull, 1983]. In this sense, heterochromatin accumulation could also lead to a reduction of recombination between sex chromosomes. However, whether the heterochromatinization process represents the cause or the consequence of reduced recombination, is still a question that remains to be solved [Charlesworth et al., 1994].

In contrast to higher vertebrates, where differentiated sex chromosomes and relatively stable sex-determining systems are found in the basis of the phylogeny, most fish species lack heteromorphic sex chromosomes, although cases have been found with different sex chromosome determination systems [Dettai et al., 2007]. This makes fish, the oldest vertebrate group, a good model for analyzing the evolution of sex chromosome differentiation in vertebrates, since this issue can be followed from the absence of sex chromosomes to their presence through several stages of differentiation.

Accumulation of Repetitive DNA Sequences in Fish Sex Chromosomes

Some distinct kinds of differentiated sex chromosome systems have already been found among fishes [Bertollo et al., 2000; Almeida-Toledo and Foresti, 2001; Devlin and Nagahama, 2002]. As in other vertebrates, fish sex chromosomes can also be enriched in repetitive DNA sequences [Martins, 2007], as shown by the isolation and mapping of sex-specific repetitive DNAs in this group [Nanda et al., 1990; Devlin et al., 1991; Capriglione et al., 1994; Nakayama et al., 1994; Stein et al., 2001, 2002; Harvey et al., 2002; Vicente et al., 2003; Ezaz et al., 2004; Parise-Maltempi et al., 2007; Wang et al., 2009].

However, most fish do not have differentiated sex chromosomes. Nevertheless, in some cases, sex chromo-

somes could be evidenced by a differential accumulation of repetitive DNAs on morphologically undifferentiated chromosomes. This is illustrated in some Poeciliidae species, where sex chromosomes cannot be identified by conventional staining, but they can be easily characterized by a differential heterochromatic block, rich in repetitive DNA sequences, located in the telomeric region of the Y and W chromosomes. Although this same heterochromatic region is present on the X and Z chromosomes, it occurs in a lesser amount, suggesting that the accumulation of repetitive DNAs is related with the initial differentiation of the sex chromosomes [Nanda et al., 1990]. A similar condition also occurs in the electric eel, *Eigenmannia virescens* [Almeida-Toledo et al., 2001], where the amplification of heterochromatic segments was not found to occur on the Y, but on the X chromosome.

The exclusive neotropical Parodontidae family is characterized by a conservative karyotype, in which all species show $2n = 54$ chromosomes. While some species apparently lack differentiated sex chromosomes, others bear a clear heteromorphic ZZ/ZW sex system. All these species appear to share the same sex chromosome differentiation by increasing heterochromatic segments and accumulation of repetitive DNAs in the W chromosome from an ancestral homomorphic pair [Centofante et al., 2002; Vicente et al., 2003; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006]. A satellite DNA family composed of a 200-bp unit (pPh2004) was isolated from the genome of *Parodon hilarii* using genomic DNA restriction [Vicente et al., 2003]. Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis detected the presence of this satellite DNA in both Z and W sex chromosomes, as well as in some other autosomes. However, it was shown that the pPh2004 was clearly related with the differentiation of the W chromosome through amplification, which gives rise to its long arm.

A similar situation occurs in another neotropical genus, *Leporinus* (Anostomidae), where a ZZ/ZW sex chromosome system is shared by several species. As in the Parodontidae family, the W chromosome is always highly heterochromatic and enriched in repetitive sequences [Galetti et al., 1995; Koehler et al., 1997; Molina et al., 1998]. Particularly in *L. elongatus*, 3 satellite DNA families have been isolated and used as probes for FISH analysis. One of them, named L5, was found in both Z and W chromosomes, whereas the second family, named L46, was specific to the W chromosome [Nakayama et al., 1994]. The third one, LeSpeI, was a sex-specific dispersed repetitive element showing distinct distribution patterns on 2 exclusive female chromosomes (W_1 and W_2). There-

fore, it was suggested that instead of ZW sex chromosomes, this species should have a multiple $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$ sex chromosome system, in which both Z_2 and W_2 are also NOR-bearing chromosomes [Parise-Maltempi et al., 2007].

Characidium (Crenuchidae) and *Triportheus* (Characidae) are other well analyzed neotropical genera bearing a heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system. Remarkable differences occur in relation to the size and morphology of the Z and W chromosomes among *Characidium* species where, in addition to deletions and/or inversions, heterochromatinization appears to have played a major role in the differentiation of the W chromosome, which is always totally heterochromatic [Vicari et al., 2008]. A similar situation is found in the genus *Triportheus* (Characidae), which appears to be characterized by an exclusive synapomorphic ZW condition among the large Characidae family [Artoni et al., 2001; Diniz et al., 2008]. However, in this case, while the Z chromosome is largely conserved, the W chromosome shows morphological differentiation among species and populations. After microdissection, a probe of the Z chromosome of *T. nematurus* was obtained and used for FISH in several other *Triportheus* species. Complete homology was found among the Z chromosomes, whereas only small positive signals were found on the W chromosomes. Besides reduction of size, W chromosomes have undergone accentuated composition changes in relation to Z chromosomes, since only a small region, usually located in the short arm, kept homology with the Z chromosomes [Diniz et al., 2008].

Transposable elements, which are expected to be overabundant in chromosomal regions where recombination is reduced, can also be accumulated on the sex chromosomes [Charlesworth et al., 1994]. Several reports from different taxa refer to the accumulation of retroelements in the sex chromosomes [Steinemann and Steinemann, 1992; Erlandsson et al., 2000; Abe et al., 2002; Rohr et al., 2002; Marchal et al., 2006; Cermak et al., 2008]. The massive accumulation of transposable elements interferes strongly with the activity of genes and this is an important step in promoting the morphogenesis of sex chromosomes [Steinemann and Steinemann, 2005].

The above mentioned results highlight the potential role of repetitive DNA sequences for sex chromosome differentiation in several neotropical fish groups. In this sense, repetitive DNAs have been shown to be important tools to clarify both the morphological differentiation of fish sex chromosomes, and the diversity of sex systems that occurs in these lower vertebrates. However, the as-

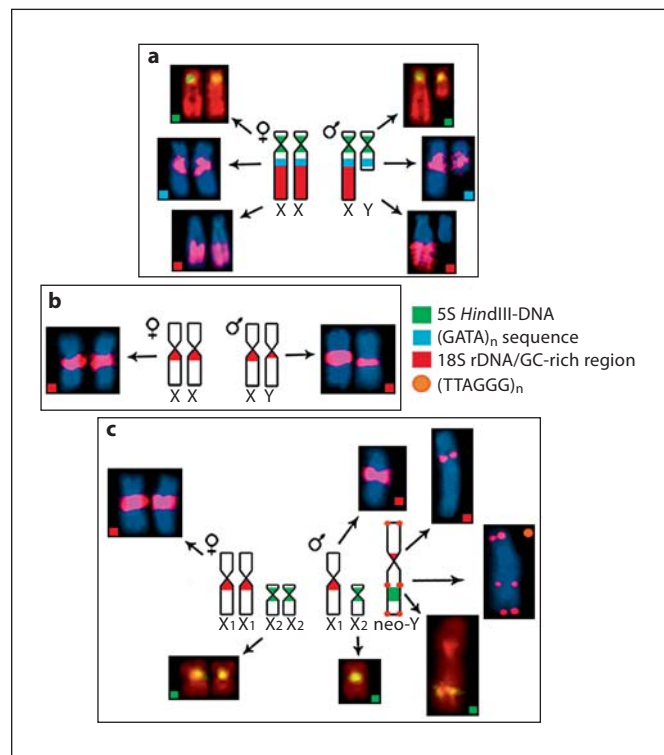
sociation between sex chromosome differentiation and accumulation of repetitive DNA is not always evident, and the use of molecular markers could help to uncover the precise role of repetitive DNA during this process. For instance, Ser et al. [2010] identified four distinct sex chromosomes in cichlid fish, in which different genes have been recruited on each chromosome for a new role in sex determination. These data provided additional evidence that the mechanisms of sex determination can be quite labile in fish lineages. The presence of four sex-determining loci and the relatively undifferentiated state of the sex chromosomes in these species again show how fish can be an excellent model for evolutionary studies on sex chromosome differentiation and sex determination.

***Hoplias malabaricus* as a Useful Model for Studies in Differentiation and Evolution of Sex Chromosomes in Fish**

The widespread Neotropical Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus* is well known for its population karyotypic diversity. Seven karyomorphs (A to G) are easily distinguishable with regard to chromosome shapes, sizes, or diploid numbers and the presence/absence of heteromorphic sex chromosomes [Bertollo et al., 2000]. Three karyomorphs (A, E and F) lack heteromorphic sex chromosomes, whereas 3 other ones show well-differentiated sex chromosomes, comprising an XX/XY system in karyomorph B, an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ system in karyomorph D and an XX/XY_1Y_2 system in karyomorph G [Bertollo et al., 2000]. Finally, karyomorph C shows a nascent XX/XY sex chromosome system [Cioffi and Bertollo, 2010]. Therefore, different sex chromosome systems, as well as distinct evolutionary stages of sex chromosome differentiation can be found in this species. Variation in the amount of several types of repetitive DNA has been shown to be associated with the genomic diversity and sex chromosome evolution in *H. malabaricus*. Chromosomal mapping of different repetitive sequences supported the characterization of the karyomorphs as distinct evolutionary units, besides showing a closer relationship between some of them [Cioffi et al., 2009]. Remarkably, a clear tendency of sex chromosomes to accumulate repetitive DNAs was put in evidence [Cioffi et al., 2009, 2010; Rosa et al., 2009].

Karyomorph B ($2n = 42$ for both sexes) is characterized by a well-differentiated XX/XY sex chromosome system, the X chromosome being the only subtelocentric found in both female and male karyotypes, and the Y

Fig. 1. Chromosomal distribution of repetitive DNAs on the sex chromosomes of the fish *Hoplias malabaricus*. **a** XX/XY system of karyomorph B: both X and Y chromosomes harbor a 5S *Hind*III-DNA site at the centromeric region, as well as a concentration of an interstitial (GATA)_n sequence in the long arms. The differentiation of the long arms of the X chromosome occurred by increasing the amount of GC-rich heterochromatin and 18S rDNA cistrons. Note the abundance of repetitive sequences accumulated on the X chromosome in contrast with the Y chromosome. **b** XX/XY system of karyomorph C: initial steps in the differentiation of the sex chromosomes, where the X and Y differ only slightly due to the amplification of GC-rich heterochromatin and 18S rDNA sequences on the X chromosome. **c** X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y system of karyomorph D: X₁ and neo-Y chromosomes harboring a proximal GC-rich heterochromatin and 18S rDNA sequences, as found in the XY chromosomes of karyomorph C. The satellite 5S *Hind*III-DNA was mapped on the pericentromeric region of the X₂ chromosome and interstitially on the long arm of the neo-Y, corroborating the tandem fusion between the X₂ and the ancestral Y chromosome of karyomorph C originating of the neo-Y chromosome of karyomorph D. An ITS site was found in the long arm of the neo-Y chromosome, also supporting the origin of this sex chromosome by a tandem fusion. Representative idiograms of the different sex chromosomes are also presented, highlighting the direct correlation between the repetitive DNAs and the differentiation of the sex chromosomes [modified from Cioffi and Bertollo, 2010, and Cioffi et al., 2010].



chromosome the smallest submetacentric in male karyotype. In addition, the X chromosome is also easily recognized by a conspicuous heterochromatic block on the long arm [Born and Bertollo, 2000]. In fact, chromosomal mapping of distinct repetitive DNA sequences indicated that the differentiation of the X chromosome was accomplished by the accumulation of repetitive DNAs on the long arm, which did not occur in the Y chromosome [Cioffi et al., 2010].

Both X and Y chromosomes harbor 5S *Hind*III DNA at the centromeric regions and a concentration of (GATA)_n sequences in the long arms (fig. 1a). 5S *Hind*III is a satellite DNA family isolated from the *H. malabaricus* genome, showing an exclusive location at centromeric regions of several chromosomes in this species [Martins et al., 2006]. (GATA)_n repetitions are the main component of a satellite DNA isolated from the W chromosome of the snake *Elaphe radiata*, playing an important role in the evolution of sex chromosomes in several eukaryotic species [Eppelen et al., 1982; Singh and Jones, 1982; Jones and Singh, 1985]. Although both repetitive DNAs were mapped in the sex chromosomes of *H. malabaricus* karyomorph B, no significant difference was found between its concentration on the X and Y chromosomes

(fig. 1a), suggesting that 5S *Hind*III and (GATA)_n sequences were not directly related with the differentiation of these chromosomes. On the other hand, the X chromosome clearly differs from the Y by a conspicuous rDNA site occupying a great extent of its long arm (fig. 1a), which is also characterized as a heterochromatic GC-rich region, evidencing that its differentiation was accomplished by the accumulation of these repetitive sequences [Born and Bertollo, 2000; Cioffi et al., 2010]. In males, the rDNA sequences are no longer observed on the Y chromosome, indicating that they were deleted from the ancestral form of this chromosome [Cioffi et al., 2010].

In XX/XY sex chromosome systems, the Y chromosome usually shows a clear tendency to accumulate repetitive DNAs, becoming largely heterochromatic. In *H. malabaricus*, however, the above results, as well as FISH mapping of a Cot-1 DNA fraction showed that the accumulation of highly and moderately repetitive DNA sequences occurred in the X but not in the Y chromosome [Cioffi et al., 2010]. In this sense, the karyomorph B of *H. malabaricus* emphasizes an unusual enrichment of repetitive DNAs on the X chromosome during the sex chromosome differentiation.

Repetitive sequences were also able to identify a nascent XX/XY sex chromosome system in karyomorph C ($2n = 40$ for both sexes), with X and Y chromosomes differing by a small, but significant amplification of repetitive DNAs on the X chromosome (fig. 1b). This heteromorphic condition was clearly evidenced both by CMA₃ staining and FISH for 18S rDNA sequences. However, the slight differentiation between the X and Y chromosomes was not enough to promote a chromosome size heteromorphism, indicating an initial sex chromosome system in this karyomorph from chromosomes other than the XY chromosomes of karyomorph B [Cioffi and Bertollo, 2010]. The accumulation of tandem repeats may represent early steps in the differentiation of the sex chromosomes by generating asynchrony in the DNA replication, and thus reducing the frequency of crossing-over between them, which is an important prerequisite for the differentiation of these chromosomes [Charlesworth et al., 2005].

In turn, *H. malabaricus* karyomorph D ($2n = 40$ females/ $2n = 39$ males) is characterized by an X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y sex chromosome system, exclusive for this chromosomal form. Previous studies demonstrated that a small submetacentric chromosome, similar to X₂, was fused onto the short arm of a larger submetacentric chromosome, similar to X₁, originating the long arm of the great neo-Y chromosome characteristic of the male specimens [Bertollo et al., 1997].

The mapping of repetitive DNAs allowed verifying the association of these sequences with the sex chromosome differentiation [Cioffi and Bertollo, 2010]. The conspicuous proximal GC-rich heterochromatic/18S rDNA site, found on the long arms of the X and Y chromosomes of karyomorph C, was also located in the same region on the X₁ chromosome, as well as on the short arm of the neo-Y chromosome of this karyomorph. Coincidentally, the neo-Y chromosome also showed the less conspicuous CMA₃⁺ site found in the Y chromosome of karyomorph C, while the X₁ chromosome presented the major one (fig. 1c), thus clearly evidencing that the X₁ and neo-Y chromosomes of karyomorph D were derived from the XY chromosomes of karyomorph C [Cioffi and Bertollo, 2010].

In addition, the satellite 5S *Hind*III-DNA was mapped on the centromeric region of the X₂ chromosome and interstitially on the long arm of the neo-Y, the latter being the only non-centromeric location of this DNA sequence in the whole karyotype. These findings suggest that this interstitial site corresponds to the centromere of the submetacentric X₂ chromosome that was fused onto the

short arm of the ancestral Y found in karyomorph C, giving rise to the large neo-Y chromosome of karyomorph D. In addition, it was also reinforced that this chromosome behaves as a dicentric but stable component of the karyotype [Bertollo et al., 1997; Bertollo and Mestriner, 1998; Martins et al., 2006]. Interstitial telomeric sites were also mapped on the long arm of the neo-Y chromosome (fig. 1c), which are presumably telomeric DNA remnants from the rearranged chromosomes, thus strongly supporting the origin of this chromosome by means of tandem fusion [Cioffi and Bertollo, 2010].

In summary, *H. malabaricus* is characterized by remarkable variation in sex chromosomes, including well-differentiated (XX/XY and X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y) and nascent (XX/XY) systems, in addition to another XX/XY₁Y₂ multiple system that occurs in karyomorph G, which still remains to be further explored as to their origin and differentiation. The data obtained so far have shown a close relationship between sex chromosomes and accumulation of different kinds of repetitive DNAs, thus contributing to the physical differentiation of these chromosomes both among differentiated and nascent sex systems. In fact, the distribution patterns of repetitive DNAs on the sex chromosomes in the different karyomorphs of *H. malabaricus* highlight the plasticity of its sex chromosome differentiation and make this fish an excellent model for studying sex chromosome evolution.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Antonio S. Baca for useful comments on the manuscript. This study was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (CGL2009-11917) and Plan Andaluz de Investigación (CVI-1664).

References

- Abe H, Sugasaki T, Terada T, Kanehara M, Ohbayashi F, et al: Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*. *Insect Mol Biol* 11:307–314 (2002).
- Almeida-Toledo LF, Foresti F: Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica* 111:91–100 (2001).
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Pequignot EV, Daniel-Silva MF: XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the neotropical electric eel *Eigenmannia virescens*. *Cytogenet Cell Genet* 95:73–78 (2001).
- Artoni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triporthus*. *Chromosome Res* 9:449–456 (2001).
- Bertollo LAC, Mestriner CA: The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Res* 6:141–147 (1998).
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res* 5:493–499 (1997).
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotoxic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613 (2000).
- Biémont C, Vieira C: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521–524 (2006).
- Born GG, Bertollo LAC: An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res* 8:111–118 (2000).
- Bull JJ: Evolution of sex determining mechanisms, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, pp 248–269 (1983).
- Capriglione T, Morescalchi A, Olmo E, Rocco L, Stingo L, Manzo S: Satellite DNAs, heterochromatin and sex chromosomes in *Chinodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). *Polar Biol* 14:285–290 (1994).
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55:139–150 (2002).
- Cermak T, Kubat Z, Hobza R, Koblikova A, Widmer A, et al: Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Res* 16:961–976 (2008).
- Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220 (1994).
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G: Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118–128 (2005).
- Cioffi MB, Bertollo LAC: Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X_1X_2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* (2010). doi:10.1038/hdy.2010.18
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics* 10:34–44 (2009).
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC: Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sex Dev* 4:176–185 (2010).
- Dettai A, Bouneau L, Fischer C, Schultheis C, Schmidt C, et al: FISH analysis of fish transposable elements: tracking down mobile DNA in teleost genomes, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 361–383 (Science Publisher, Inc., Enfield 2007).
- Devlin RH, Nagahama T: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364 (2002).
- Devlin RH, McNeil BK, Donaldson EM: Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in chinook salmon. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1606–1612 (1991).
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC: Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triporthus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 122:163–168 (2008).
- Epplen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S: Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3798–3802 (1982).
- Erlandsson R, Wilson JF, Pääbo S: Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans. *Mol Biol Evol* 17:804–812 (2000).
- Ezaz MT, Myers JM, Powell SF, McAndrew BJ, Penman DJ: Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 232:205–214 (2004).
- Galetti PM Jr, Lima NRW, Venere PC: A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia* 60:375–382 (1995).
- Harvey SC, Masabanda J, Carrasco LAP, Bromage NR, Penman DJ, Griffin DK: Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation. *Cytogenet Genome Res* 97:76–80 (2002).
- Hobza R, Lengerova M, Svoboda J, Kubekova H, Kejnovsky E, Vyskot B: An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. *Chromosoma* 115:376–382 (2006).
- Jones KW, Singh L: Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends Genet* 1:55–61 (1985).
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J: Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110:462–467 (2005).
- Kejnovsky E, Hobza R, Cermak T, Kubat Z, Vyskot B: The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 102:533–541 (2009).
- Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, Galetti PM Jr: Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). I. Karyotype analysis, heterochromatin distribution, and sex chromosomes. *Chromosome Res* 5:12–22 (1997).
- Marchal JA, Acosta MJ, Bullesos M, Puerma E, Díaz de la Guardia R, Sánchez A: Distribution of LI-retrotransposons on the giant sex chromosomes of *Microtus cabrerai* (Arvicolidae, Rodentia): functional and evolutionary implications. *Chromosome Res* 14:177–186 (2006).
- Martins C: Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 421–453 (Science Publisher, Inc., Enfield 2007).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133–141 (2006).
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, Matsuda Y: Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18190–18195 (2006).
- Molina WF, Schmid M, Galetti PM Jr: Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios* 94:141–149 (1998).
- Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Scharl M, Chourrou D: Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* 103:31–39 (1994).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schröder JH, Zischler H, Epplen JT: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30:456–462 (1990).

- Nishioka Y, Dolan BM, Zahed L: Molecular characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence amplified in distantly related species in the genus *Mus*. *Genome* 36: 588–593 (1993).
- Ohno S: Sex chromosomes and sex-linked genes (Springer, Berlin 1967).
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F: Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res* 116:218–223 (2007).
- Rohr CJ, Ranson H, Wang X, Besansky NJ: Structure and evolution of *mtanga*, a retrotransposon actively expressed on the Y chromosome of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol* 19:149–162 (2002).
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP: Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. *Genetica* 128: 159–166 (2006).
- Rosa R, Vanzela AL, Rubert M, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L: Differentiation of Y chromosome in the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Cytogenet Genome Res* 127:54–60 (2009).
- Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Rupprecht A, Haaf T, Kaiser H: Chromosome banding in amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet Genome Res* 97:81–94 (2002).
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard H: Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294:109–115 (2001).
- Ser JR, Roberts RB, Kocher TD: Multiple interacting loci control sex determination in lake Malawi cichlid fish. *Evolution* 64:486–501 (2010).
- Singh L, Jones KW: Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent non-reciprocal crossover involving the X and an aberrant Y chromosome. *Cell* 28:205–216 (1982).
- Singh L, Purdom IF, Jones KW: Satellite DNA and evolution of sex chromosome. *Chromosoma* 59: 43–62 (1976).
- Stein J, Phillips RB, Devlin RH: Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet* 92:108–110 (2001).
- Stein J, Reed KM, Wilson CC, Phillips R: A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. *Environ Biol Fishes* 64:211–216 (2002).
- Steinemann M, Steinemann S: Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7591–7595 (1992).
- Steinemann S, Steinemann M: Y chromosomes: born to be destroyed. *BioEssays* 27:1076–1083 (2005).
- Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LAC: ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenet Genome Res* 114:163–168 (2006).
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311–317 (2008).
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O: Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). *Satellite DNA, G and C-banding. Genetica* 119:115–120 (2003).
- Wang X, Zhang Q, Ren J, Jiang Z, Wang C, Zhuang W, Zhai T: The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture* 297:78–84 (2009).

Anexo 4

**Distribuição cromossômica de seqüências repetitivas de DNA
evidencia a diferenciação independente dos cromossomos
sexuais múltiplos em duas espécies de peixes estreitamente
relacionadas**

Cioffi MB, Molina WF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC
Cytogenetic and Genome Research 134: 295-302 (2011)

Chromosomal Distribution of Repetitive DNA Sequences Highlights the Independent Differentiation of Multiple Sex Chromosomes in Two Closely Related Fish Species

M.B. Cioffi^a W.F. Molina^b O. Moreira-Filho^a L.A.C. Bertollo^a

^aDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, e ^bDepartamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Key Words

Erythrinidae fish · Karyomorphs · Molecular cytogenetics · Satellite DNAs · Sex chromosome differentiation

Abstract

The arrangement of 6 repetitive DNA sequences in the mitotic and meiotic sex chromosomes of 2 Erythrinidae fish, namely *Hoplias malabaricus* and *Erythrinus erythrinus*, both with a multiple $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system, was analyzed using fluorescence in situ hybridization. The distribution patterns of the repetitive sequences were distinct for each species. While some DNA repeats were species-specific, others were present in the sex chromosomes of both species at different locations. These data, together with the different morphological types of sex chromosomes and the distinct chromosomal rearrangements associated with the formation of the neo-Y chromosomes, support the plasticity of sex chromosome differentiation in the Erythrinidae family. Our present data highlight that the sex chromosomes in fish species may follow diverse differentiation patterns, even in the same type of sex chromosome system present in cofamilial species.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

A clear correlation between sex chromosomes and repetitive DNAs has been pointed out by several studies. The chromosomal organization of the repetitive DNA sequences has provided new insights in understanding genomic evolution in many species, demonstrating that the differentiation of the sex chromosomes is frequently associated with the accumulation of such DNA sequences in the chromosomes [Singh et al., 1976; Nanda et al., 1990; Nishioka et al., 1993; Schmid et al., 2002; Vicente et al., 2003; Steinemann and Steinemann, 2005; Hobza et al., 2006; Marchal et al., 2006; Matsubara et al., 2006; Vicari et al., 2008; Wang et al., 2009; Cioffi and Bertollo, 2010; Cioffi et al., 2010].

Unlike higher vertebrates, which are characterized by the origination of sex chromosomes at the base of their phylogeny and by relatively stable sex-determining systems [Dettai et al., 2007], fish exhibit a huge diversity in their sex-determining mechanisms. In addition to the absence of differentiated sex chromosomes in most species, this diversity makes fish a good model for analyzing the differentiation process of sex chromosomes in vertebrates.

Erythrinidae is a small Characiformes family that is widely distributed throughout South America and has only 3 genera (*Hoplias*, *Hoplerythrinus* and *Erythrinus*). This fish family presents a high chromosome diversity of

its several recognized karyomorphs and its well-differentiated sex chromosomes [Bertollo, 2007] in addition to others in an early stage of differentiation [Cioffi and Bertollo, 2010]. The wolf fish, *Hoplias malabaricus*, shows a conspicuous karyotypic diversification with 7 karyomorphs (A to G), easily distinguishable by their diploid number, shape and size of chromosomes and sex chromosome systems [Bertollo et al., 1986, 2000]. Three well-differentiated sex chromosome systems occur in this group, namely XX/XY in karyomorph B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ in karyomorph D and XX/XY₁Y₂ in karyomorph G [Bertollo et al., 2000], as well as a nascent XX/XY system in karyomorph C [Cioffi and Bertollo, 2010]. In contrast, karyomorphs A, E and F display homomorphic sex chromosomes. The red wolf fish, *Erythrinus erythrinus*, is another interesting species with 4 karyomorphs (A to D) currently identified. Karyomorph A comprises populations with a very similar karyotypic structure and the absence of differentiated sex chromosomes, while karyomorphs B, C and D share the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system but differ in terms of diploid number and chromosomal morphology [Bertollo et al., 2004].

In the present study, we performed a comparative analysis of chromosomal markers on the X_1X_2Y sex chromosomes of karyomorphs D of *H. malabaricus* and *E. erythrinus* through mapping of 6 repetitive DNA classes (18S rDNA, 5S rDNA, *Rex3*, (TTAGGG)_n, Cot-1 DNA and the 5S*Hind*III-DNA satellite family) in the mitotic and meiotic chromosomes. The contrasting distribution of the repetitive sequences in both species highlights the independent X_1X_2Y sex chromosome differentiation in these 2 closely related species.

Materials and Methods

Specimens, Chromosome Preparation and Karyotyping

Eleven *H. malabaricus* males, belonging to karyomorph D, were obtained from São Carlos city (São Paulo State), and 8 *E. erythrinus* males, belonging to karyomorph D, were obtained from Natal city (Rio Grande do Norte State). These samples belong to distinct Brazilian hydrographic basins isolated by thousands of kilometers. The experiments followed ethical protocols, and anesthesia was used prior to sacrificing the animals.

Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney, using the conventional air-drying method [Bertollo et al., 1978]. Meiotic chromosomes were obtained according to Kligerman and Bloom [1977] as described in Bertollo and Mestriner [1998]. For conventional analyses, chromosomes were stained with 5% Giemsa solution in phosphate buffer pH 6.8 for 5–6 min. Images of the metaphase plates were captured by the CoolSNAP system, which is part of the Image Pro Plus 4.1 software package (Media Cybernetics, Silver Spring, Md., USA), cou-

pled to an Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan). The chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) or acrocentric (a) according to the arm ratios [Levan et al., 1964].

Probes

Three tandem-arrayed DNA sequences isolated from the *H. malabaricus* genome were used. The first probe contained a 5S rDNA repeat copy and included 120 bp of the 5S rRNA encoding gene and 200 bp of the non-transcribed spacer [Martins et al., 2006]. The second probe contained a copy of the repetitive satellite 5S*Hind*III-DNA sequence. This 360-bp sequence was composed of a 95-bp segment with similarity to the 5S rRNA gene of the first probe and a 265-bp segment similar to the non-transcribed spacer of the first probe [Martins et al., 2006]. The third probe corresponded to a 1,400-bp segment of the 18S rRNA gene obtained via PCR from the nuclear DNA [Cioffi et al., 2009]. All these probes were cloned into plasmid vectors and propagated in DH5 α *E. coli*-competent cells (Invitrogen, San Diego, Calif., USA).

The genomic DNA of *H. malabaricus* and *E. erythrinus* was extracted using the phenol-chloroform procedure described by Sambrook and Russell [2001]. For both species, an enriched library with repetitive sequences was constructed on the basis of the renaturation kinetics of Cot-1 DNA (DNA enriched for highly and moderately repetitive DNA sequences) according to Zwick et al. [1997].

The retrotransposable element *Rex3* was obtained by PCR from the nuclear DNA of *E. erythrinus* as described by Volff et al. [1999]. The 5S rDNA probe was labeled with biotin-14-dATP by nick translation according to the manufacturer's recommendations (BioNick™ Labeling System; Invitrogen). The 18S rDNA, 5S*Hind*III-DNA, Cot-1 DNA and *Rex3* probes were labeled by nick translation with DIG-11-dUTP, according to the manufacturer's instructions (Roche, Mannheim, Germany). In addition, a telomeric DNA probe (TTAGGG)_n was generated by PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit; Roche) in the absence of a template, using (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅ as primers [Ijdo et al., 1991].

Chromosome Hybridization

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed under high stringency conditions on mitotic and meiotic chromosome spreads [Pinkel et al., 1986]. The metaphase chromosomes were incubated with RNase (40 μ g/ml) for 1.5 h at 37°C. After denaturing the chromosomal DNA in 70% formamide, 2 \times SSC at 70°C, the spreads were incubated in 2 \times SSC for 4 min at 70°C. The hybridization mixture (100 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2 \times SSC and 50% formamide in a final volume of 30 μ l) was dropped onto the slides, and hybridization was performed overnight at 37°C in a moist chamber containing 2 \times SSC. Two post-hybridization washes were carried out on a shaker (150 rpm) at 37°C, the first one in 50% formamide, 2 \times SSC for 15 min, the second one in 2 \times SSC for 15 min. A final wash was performed at room temperature in 4 \times SSC for 15 min. Avidin-FITC (Sigma, St. Louis, Mo., USA) was used for signal detection of the 5S rDNA probe, and anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) was used to detect the 18S rDNA, 5S*Hind*III-DNA, Cot-1 DNA, *Rex3* and (TTAGGG)_n probes. The chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 μ g/ml) and mounted in Antifade solution (Vector, Burlingame, Calif., USA).

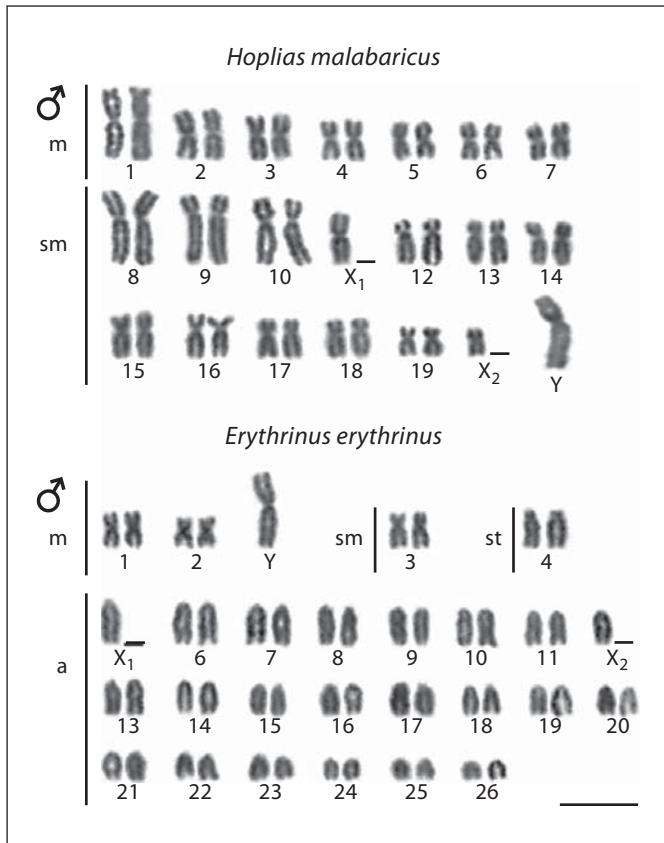


Fig. 1. Giemsa-stained male karyotypes of karyomorphs D of *Hoplias malabaricus* ($2n = 39$) and *Erythrinus erythrinus* ($2n = 51$), both with an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system. Bar = 5 μm .

Results

Karyotype and Mitotic Sex Chromosome Mapping of Repeated DNA Sequences

The males of both species presented the karyotype pattern that characterizes karyomorph D of each group, i.e., $2n = 39$ chromosomes (14 m + 25 sm) for *H. malabaricus* and $2n = 51$ chromosomes (5 m + 2 sm + 2 st + 42 a) for *E. erythrinus*, with a multiple $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system. While the sex chromosomes were all submetacentric in *H. malabaricus*, in *E. erythrinus* the X_1 and X_2 are acrocentric and the Y is the largest meta-centric chromosome in the karyotype (fig. 1).

The 5S rDNA was mapped in the centromeric region of the X_1 , X_2 and Y chromosomes in *E. erythrinus*, while the sex chromosomes of *H. malabaricus* did not show any 5S rDNA sites. In turn, the sex chromosomes of *E. erythrinus* lacked 18S rDNA sites, while *H. malabaricus* showed con-

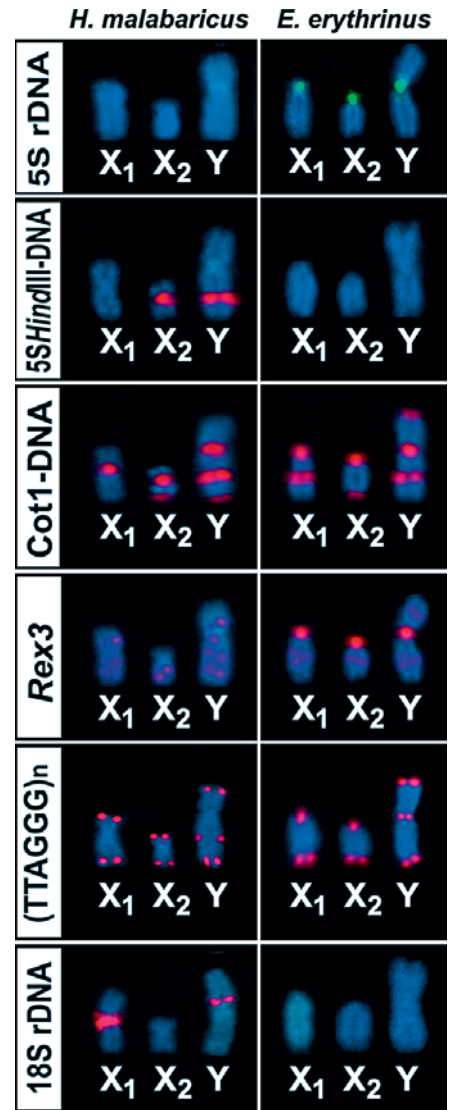
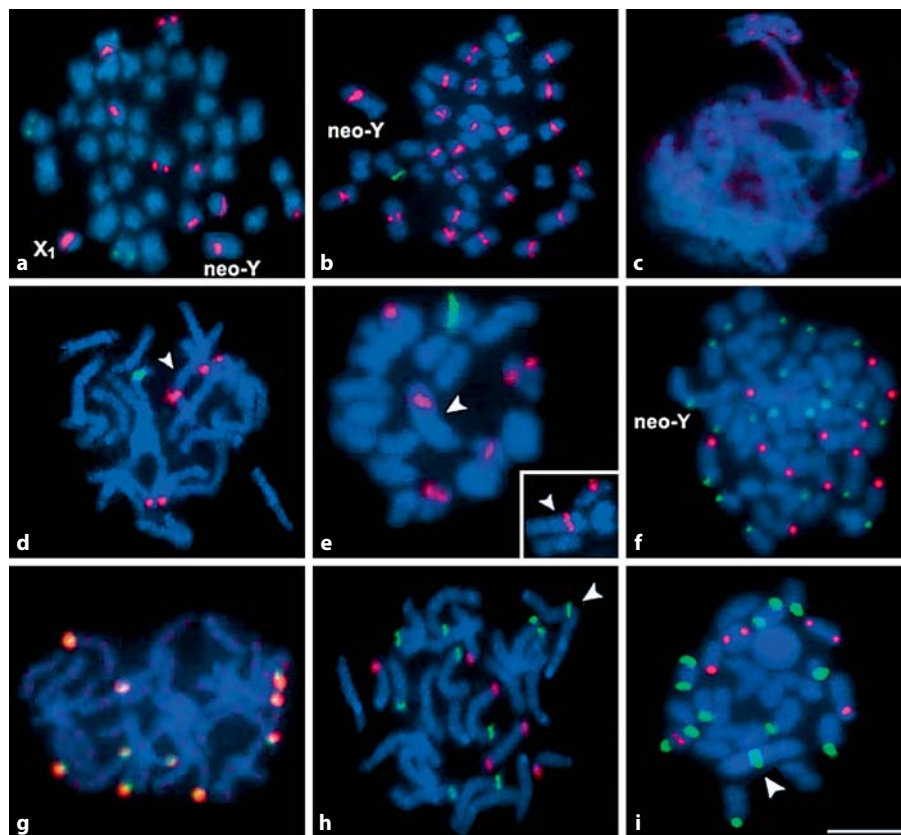


Fig. 2. X_1X_2Y sex chromosomes of *Hoplias malabaricus* and *Erythrinus erythrinus* after FISH with various repetitive DNA sequences.

spicuous proximal sites on the long and short arms of the X_1 and Y chromosomes, respectively. The satellite 5SHindIII-DNA was also exclusively mapped to the chromosomes of *H. malabaricus*, with a characteristic centromeric location on the X_2 chromosome and an interstitial location on the long arm of the Y chromosome (fig. 2).

For both species, the hybridization pattern of the Cot-1 DNA fraction coincided with the heterochromatin sites, including the centromeric, interstitial and telomeric chromosome regions. Cot-1 DNA hybridization occurred at the same location on the X_2 chromosomes of

Fig. 3. Meiotic chromosomes of *Hoplias malabaricus* (a–e) and *Erythrinus erythrinus* males (f–i). **a, b** Spermatogonial cells with $2n = 39$ chromosomes showing 10 18S rDNA (pink) and 2 5S rDNA (green) signals (**a**) and 22 5S *Hind*III-DNA (pink) and 2 5S rDNA (green) signals (**b**). **c** Zygotene/pachytene stage displaying dispersed distribution of *Rex3* sites (pink) and 1 5S rDNA site (green) on the synapsed chromosomes. **d** Zygotene/pachytene stage and **e** diakinesis/metaphase I stage displaying 18S rDNA (pink) and 5S rDNA (green) signals in 5 and 1 synapsed chromosomes, respectively; the inset highlights the sex trivalent with a 5S *Hind*III-DNA site. Arrowheads indicate sex trivalents. **f** Spermatogonial cell with $2n = 51$ chromosomes showing 12 18S rDNA (pink) and 21 5S rDNA (green) signals. **g** Zygotene/pachytene stage showing the interstitially dispersed pattern of *Rex3* sequences (pink) and their co-localization with the 5S rDNA (green) in the centromeric regions of the chromosomes. **h** Zygotene/pachytene stage and **i** diakinesis/metaphase I stage displaying 18S rDNA (pink) and 5S rDNA (green) sites in 5 and 10 synapsed chromosomes, respectively. Arrowheads indicate sex trivalents. Bar = 5 μ m.



both species with a centromeric and a telomeric site in the long arms. However, some conspicuous differences could be detected on the X_1 and Y chromosomes. While the X_1 chromosome of *H. malabaricus* only presented a Cot-1 DNA centromeric site, the X_1 chromosome of *E. erythrinus* showed a characteristic interstitial site on its long arm in addition to the centromeric one. On the contrary, the Y chromosome exhibited centromeric and interstitial Cot-1 DNA sites in both species, as well as discrete telomeric sites on the long and short arms in *H. malabaricus* and *E. erythrinus*, respectively (fig. 2).

The non-LTR retrotransposon *Rex3* showed a more dispersed distribution pattern along the chromosomes of both species. However, conspicuous clusters were highlighted in the centromeric region of the X_1 , X_2 and Y chromosomes in *E. erythrinus*. Typical (TTAGGG)_n repeats were characteristically localized in the telomeric regions of the chromosomes. In addition, an exclusive interstitial telomeric site was found on the Y chromosome; it occupied the middle region of the long arm in *H. malabaricus* and the centromeric region in *E. erythrinus* (fig. 2).

Meiotic Chromosomes

The male meiotic chromosomes of *H. malabaricus* and *E. erythrinus* were analyzed in spermatogonial, early prophase I and diplotene-diakinesis cells.

Spermatogonial Cells

The spermatogonial cells of *H. malabaricus* have 39 chromosomes, in accordance with the male karyotype. Two 5S rDNA sites were interstitially mapped on the long arms of a metacentric autosome pair, and ten 18S rDNA sites were localized: eight to the telomeric region of autosomes, and those with an interstitial localization on the X_1 and Y chromosomes (fig. 3a). FISH with 5S *Hind*III-DNA detected 22 centromeric sites for this satellite DNA, including the one localized to the single X_2 chromosome and the one found in the interstitial region of the long arm of the Y chromosome; none of these colocalized with the 5S rDNA sites (fig. 3b). The spermatogonial cells of *E. erythrinus* have 51 chromosomes, in accordance with the male karyotype; 20 of these displayed 5S rDNA centromeric sites on acrocentric chromosomes, including the X_1 and X_2 , in addition to a centromeric site on the metacen-

tric Y chromosome. Five chromosome pairs displayed 18S rDNA telomeric sites, including those with bitelomeric locations (fig. 3f).

Early Prophase I Cells

During the first meiotic division, *H. malabaricus* presented 18 bivalents and *E. erythrinus* 24 bivalents in addition to a characteristic sex trivalent. While the bivalents corresponded to the synapsed autosomal pairs, the trivalent was formed by the X_1 , X_2 and Y chromosomes. Double-FISH with 5S rDNA and *Rex3* probes in early prophase cells showed that *Rex3* repeats follow an interstitial and dispersed distribution pattern along most chromosomes in *H. malabaricus* (fig. 3c). A similar widely-scattered hybridization pattern was also found in *E. erythrinus*, but with conspicuous co-localized *Rex3* and 5S rDNA clusters in the centromeric region of several chromosomes (fig. 3g). Double-FISH with the 5S rDNA and 18S rDNA probes in *H. malabaricus* showed one 5S rDNA and five 18S rDNA paired sites due to synapsis of the homologous chromosomes in the zygotene/pachytene stages (fig. 3d). In *E. erythrinus*, cells in the same stage showed 10 paired 5S rDNA sites, including the associated sites on the X_1 , X_2 and Y chromosomes on the sex trivalent and 6 paired 18S rDNA sites (fig. 3h).

Diplotene-Diakinesis Cells

In *H. malabaricus*, these cells presented one 5S rDNA and five 18S rDNA synapsed sites, including the 18S rDNA site on the sex trivalent, as expected (fig. 3e). Accordingly, eleven 5SHindIII-DNA sites were also detected during this stage, with 10 located on the bivalents (data not shown) and 1 located on the sex trivalent (fig. 3e, inset). In *E. erythrinus*, 5 and 10 synapsed chromosomes displayed 18S rDNA and 5S rDNA sites, respectively, as was observed in the early prophase cells, including the 5S rDNA site located on the sex trivalent (fig. 3i).

Discussion

Multiple sex chromosomes usually arise from centric fusions, translocations or tandem fusions between ancestral sex chromosomes (X or Z; Y or W) and autosomes. A Y-autosome rearrangement leads to $X_1X_1X_2X_2$ sex chromosomes in females and X_1X_2Y sex chromosomes in males with a neo-Y chromosome partially composed of the ancestral autosome and Y chromosome. Consequently a characteristic sex trivalent results in male meiosis through synapsis of the X_1 , X_2 and neo-Y sex chromo-

somes [White, 1973]. In fish, the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ system has already been described in species from different families [Murofushi et al., 1983; Pezold, 1984; Suzuki et al., 1988; Morescalchi et al., 1992; Almeida-Toledo et al., 2000; Bertollo et al., 2000, 2004; Caputo et al., 2001; Ueno and Takai, 2008]. In several cases, the neo-Y is a metacentric chromosome, while the X_1 and X_2 are acrocentric ones, suggesting the occurrence of Robertsonian rearrangements.

Although possessing different diploid numbers, the karyomorphs D of *H. malabaricus* ($2n = 39/40$) and *E. erythrinus* (51/52) have a similar $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system. At first sight, this might suggest a close relationship between these sex systems, with a probable ancestral origin before the divergence of the genera *Hoplias* and *Erythrinus*. However, in spite of this possibility, the comparative mapping of repetitive DNA sequences pointed to an independent differentiation process for the X_1X_2Y sex chromosomes in both species.

The occurrence of repetitive DNA sequences on the X_1 , X_2 and Y chromosomes allowed us to verify the association of these repeats with the sex chromosomes. Not only morphologically different, the sex chromosomes of *H. malabaricus* and *E. erythrinus* also differ in the distribution pattern of the aforementioned DNA sequences. All sex chromosomes of *H. malabaricus* are submetacentric: the Y chromosome originated by a tandem fusion between 2 submetacentric chromosomes [Cioffi and Bertollo, 2010], as evidenced by the presence of interstitial telomeric sequences and an interstitial 5SHindIII-DNA site on the long arm of the neo-Y chromosome (fig. 2, 4). However, in *E. erythrinus*, the X_1 and X_2 chromosomes are acrocentric, while the Y is a large metacentric chromosome, all of them displaying 5S rDNA, Cot-1 DNA, *Rex3* and telomeric repeats in their centromeric regions (fig. 2). These features suggest that a centric fusion between the ancestral homologues of the unpaired X_1 and X_2 chromosomes led to the formation of the neo-Y chromosome in this karyomorph (fig. 4). The 5S rDNA sequences associated with heterochromatic centromeric regions have been postulated to enhance some chromosomal rearrangements, such as centric fusions, in a *Chromis* fish species [Molina and Galetti, 2002]. Although the roles of specific sequences in the origin of chromosomal rearrangements are unclear, the pool of distinct repetitive sequences that were co-localized in the heterochromatic centromeric region of the X_1 and X_2 chromosomes of *E. erythrinus* indicate a dynamic evolutionary process for these regions. This process probably favored the occurrence of the chromosomal rearrange-

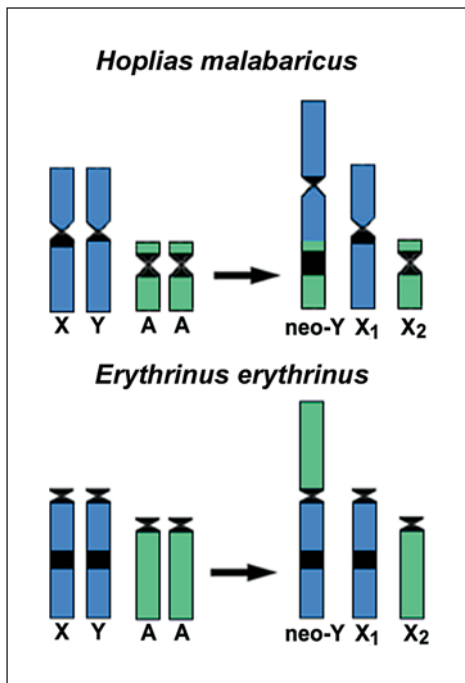


Fig. 4. Schematic diagram illustrating the chromosomal rearrangements associated with the differentiation of the X_1X_2Y sex chromosomes of *Hoplias malabaricus* and *Erythrinus erythrinus*. In *H. malabaricus* karyomorph D, the neo-Y chromosome was derived from a tandem fusion between a submetacentric Y chromosome and a submetacentric autosome (A). The ancestral XY pair was characterized by an early stage of differentiation for the proximal heterochromatic bands. In *E. erythrinus* karyomorph D, the neo-Y chromosome originated from a centric fusion between an acrocentric Y chromosome and an acrocentric autosome (A). The ancestral sex pair did not present differentiation between the X and Y chromosomes. The dark regions on the chromosomes represent heterochromatic bands. Data from Cioffi and Bertollo [2010] and Cioffi et al. [2010].

ments associated with the origin of the neo-Y chromosome in this species.

The meiotic data confirmed the differential distribution of the repetitive DNAs on the chromosomes of both species. The diploid spermatogonial cells, as well as those in the early prophase and diplotene/diakinesis stages, showed the expected distribution patterns of these repeats both in the unpaired and synapsed chromosomes, respectively (fig. 3), in agreement with some of our previous results on mitotic chromosomes of somatic cells [Cioffi et al., 2009, 2010; Cioffi and Bertollo, 2010]. The sex trivalent in *H. malabaricus* showed 18S rDNA sites corresponding to those found in the X_1 and neo-Y chromosomes; the 5S*Hind*III-DNA sequence was mapped to

the centromere of the X_2 and interstitially located on the long arm of the neo-Y chromosome. In turn, the sex trivalent of *E. erythrinus* displayed co-localized 5S rDNA and *Rex3* sites which correspond to those found in the centromeric region of the X_1 , X_2 and neo-Y chromosomes.

Intriguingly, repetitive DNA sequences have accumulated in fish sex chromosomes in a manner that is different to the enrichment found on autosomes, thereby highlighting the potential role of these sequences in the differentiation of fish sex chromosomes [Nanda et al., 1990; Martins, 2007; Cioffi et al., 2010]. Hence, it seems that the sex chromosomes of these Erythrinidae species are able to accumulate repeated sequences, but the evolutionary pathways of these repeats are very different. It seems that sequences included in the sex heterochromatin have been randomly selected and amplified in the sex chromosomes in each species. In fact, most sex chromosome repeats are species-specific and highly variable, even between closely related taxa [Tone et al., 1984; Itoh and Mizuno, 2002; Marchal et al., 2004; Hughes et al., 2010], suggesting that rapid amplification and molecular differentiation occurred repeatedly after divergence from a common ancestor.

Heteromorphic sex chromosomes have evolved many times independently in different plant and animal lineages. Two plant species belonging to the genus *Silene*, *S. colpoophylla* and *S. latifolia*, are characterized by an XX/XY sex chromosome system. However, the sex chromosomes of each species evolved from different autosomal pairs, i.e., they have independent origins in these closely related species [Mrackova et al., 2008]. In higher vertebrates, sex chromosome systems have been found to be polymorphic, indicating the dynamic evolutionary nature of these systems [Graves, 2008]. Matsubara et al. [2006] investigated the conservation of linkage homology of snake sex chromosomes to humans and chickens by comparative gene mapping and concluded that the sex chromosomes of these 3 groups were all derived from different autosomal pairs of the common ancestor and differentiated independently in each lineage. Interestingly, although sharing the same ZZ/ZW system, the autosomes that were converted to sex chromosomes in birds were different from those that gave rise to these chromosomes in snakes. In fish, non-homologous sex chromosomes have also been reported for some related fish species [Phillips et al., 2001; Devlin and Nagahama, 2002; Woram et al., 2003; Takehana et al., 2007; Henning et al., 2008]. The most plausible explanation for the independent origins of sex chromosomes in fish is that different

primary sex-determining genes may have evolved on different chromosomes in which an autosomal gene or a duplicated gene copy acquired a new mutation and gave rise to either male or female development, resulting in the novel sex-determining gene and the emergence of new sex chromosomes from different autosomes [Takehana et al., 2007].

In summary, the Erythrinidae family is characterized by species with or without differentiated sex chromosomes. In addition to different kinds of sex chromosome systems, there are also species that share the same system, as is the case of the karyomorphs D of *H. malabaricus* and *E. erythrinus* now analyzed, making this fish family an excellent model for studying sex chromosome evolution. In *H. malabaricus*, the X₁X₂Y sex chromosomes originated from ancestral XY chromosomes at an early stage of differentiation [Cioffi and Bertollo, 2010]. Accordingly, the X₁X₂Y sex chromosome system of *E. erythrinus* appears to be derived from an XY sex chromosome pair that was still morphologically undifferentiated, and for which there seems to be no apparent specific marker between the X and Y chromosomes (fig. 4). However, the

extensive variations concerning several kinds of repetitive DNAs on the sex chromosomes clearly show that they went through different processes of differentiation in these 2 cofamilial species. This distinct distribution pattern of the repetitive DNAs, alongside with the different morphological types of the sex chromosomes and the distinct chromosomal rearrangements associated with the formation of the neo-Y chromosomes, highlight the plasticity of sex chromosome differentiation in these fishes. Although these characteristics suggest an independent origin, the data available so far do not allow excluding a common origin for such sex systems from possible homeologous chromosomes. This question should then be focused in our further studies.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MF, Lopes CE, Toledo-Filho AS: Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X₁X₂Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Res* 8:335–340 (2000).
- Bertollo LAC: Chromosome evolution in the neotropical Erythrinidae fish family: an overview, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 195–211 (Science Publisher, Inc., Enfield 2007).
- Bertollo LAC, Mestriner CA: The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Res* 6:141–147 (1998).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1:103–120 (1978).
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti PM Jr: Cytogenetics and taxonomy considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* 28:153–159 (1986).
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613 (2000).
- Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, et al: Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 93:228–233 (2004).
- Caputo V, Machella N, Nisi-Cerioni P, Olmo E: Cytogenetics of nine species of Mediterranean blennies and additional evidence for an unusual multiple sex-chromosome system in *Parablennius tentacularis* (Perciformes, Blenniidae). *Chromosome Res* 9:3–12 (2001).
- Cioffi MB, Bertollo LAC: Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105:554–561 (2010).
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics* 10:34 (2009).
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol* 10:217 (2010).
- Detta A, Bouneau L, Fischer C, Schultheis C, Schmidt C, et al: FISH analysis of fish transposable elements: tracking down mobile DNA in teleost genomes, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 361–383 (Science Publisher, Inc., Enfield 2007).
- Devlin RH, Nagahama Y: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364 (2002).
- Graves JAM: Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet* 42:565–586 (2008).
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF: Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res* 121:55–58 (2008).
- Hobza R, Lengerova M, Svoboda J, Kubekova H, Kejnovsky E, Vyskot B: An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. *Chromosoma* 115:376–382 (2006).
- Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Graves TA, Daalen SKM, et al: Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* 463:536–539 (2010).

- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST: Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780 (1991).
- Itoh Y, Mizuno S: Molecular and cytological characterization of *SspI*-family repetitive sequence on the chicken W chromosome. *Chromosome Res* 10:499–511 (2002).
- Kligerman AD, Bloom SE: Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J Fish Res Board Can* 34:266–269 (1977).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220 (1964).
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, et al: X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Res* 12:767–776 (2004).
- Marchal JA, Acosta MJ, Bullejos M, Puerma E, Díaz de la Guardia R, Sánchez A: Distribution of L1-retrotransposons on the giant sex chromosomes of *Microtus cabreræ* (Arvicolidae, Rodentia): functional and evolutionary implications. *Chromosome Res* 14:177–186 (2006).
- Martins C: Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 421–453 (Science Publisher, Inc., Enfield 2007).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133–141 (2006).
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, et al: Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18190–18195 (2006).
- Molina WF, Galetti PM Jr: Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet Mol Biol* 25:373–377 (2002).
- Morescalchi A, Hureau JC, Olmo E, Ozouf-Costaz C, Pisano E, Stanyon R: A multiple sex-chromosome system in Antarctic icefishes. *Polar Biol* 11:655–661 (1992).
- Mrackova M, Nicolas M, Hobza R, Negrutiu I, Monéger F, et al: Independent origin of sex chromosomes in two species of the genus *Silene*. *Genetics* 179:1129–1133 (2008).
- Murofushi M, Nishikawa S, Yoshida TH: Cytogenetical studies on fishes. Multiple sex chromosome mechanism (XX-Y) found in two Dragonet fishes. *Proc Japan Acad* 59:58–61 (1983).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Eppelen JT: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30:456–462 (1990).
- Nishioka Y, Dolan BM, Zahed L: Molecular characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence amplified in distantly related species in the genus *Mus*. *Genome* 36:588–593 (1993).
- Pezold F: Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus shufeldtii* (Pisces: Gobiidae). *Copeia* 1984:235–238 (1984).
- Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein JD: Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica* 111:119–123 (2001).
- Pinkel D, Straume T, Gray J: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938 (1986).
- Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001).
- Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Rupperecht A, Haaf T, Kaiser H: Chromosome banding in Amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Lepidodactylidae). *Cytogenet Genome Res* 97:81–94 (2002).
- Singh L, Purdom IF, Jones KW: Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. *Chromosoma* 59:43–62 (1976).
- Steinemann S, Steinemann M: Y chromosomes: born to be destroyed. *Bioessays* 27:1076–1083 (2005).
- Suzuki A, Taki Y, Takeda M, Akatsu S: Multiple sex chromosomes in a monodactylid fish. *Jpn J Ichthyol* 35:98–101 (1988).
- Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M: Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. danconena*. *Chromosoma* 116:463–470 (2007).
- Tone M, Sakaki Y, Hashiguchi T, Mizuno S: Genus specificity and extensive methylation of the W chromosome-specific repetitive DNA sequences from the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Chromosoma* 89:228–237 (1984).
- Ueno K, Takai A: Multiple sex chromosome system of X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y type in lutjanid fish, *Lutjanus quinquelineatus* (Perciformes). *Genetica* 132:35–41 (2008).
- Vicari MR, Artioni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311–317 (2008).
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O: Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. *Genetica* 119:115–120 (2003).
- Volff JN, Korting C, Sweeney K, Scharl M: The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol* 16:1427–1438 (1999).
- Wang X, Zhang Q, Ren J, Jiang Z, Wang C, et al: The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture* 297:78–84 (2009).
- White MJD: *Animal Cytology and Evolution*, 3rd ed (Cambridge University Press, Cambridge 1973).
- Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, et al: Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Res* 13:272–280 (2003).
- Zwick MS, Hanson RE, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, et al: A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. *Genome* 40:138–142 (1997).

Anexo 5

Pintura cromossômica evidencia a origem independente de cromossomos sexuais múltiplos presente em duas espécies de peixes da família Erythrinidae

Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T,
Trifonov V, Bertollo LAC
BMC Evolutionary Biology 11: 186 (2011)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes

Marcelo B Cioffi^{1*}, Antonio Sánchez², Juan A Marchal², Nadezda Kosyakova³, Thomas Liehr³, Vladimir Trifonov⁴ and Luiz AC Bertollo¹

Abstract

Background: The Erythrinidae fish family is characterized by a large variation with respect to diploid chromosome numbers and sex-determining systems among its species, including two multiple X_1X_2Y sex systems in *Hoplias malabaricus* and *Erythrinus erythrinus*. At first, the occurrence of a same sex chromosome system within a family suggests that the sex chromosomes are correlated and originated from ancestral XY chromosomes that were either homomorphic or at an early stage of differentiation. To identify the origin and evolution of these X_1X_2Y sex chromosomes, we performed reciprocal cross-species FISH experiments with two sex-chromosome-specific probes designed from microdissected X_1 and Y chromosomes of *H. malabaricus* and *E. erythrinus*, respectively.

Results: Our results yield valuable information regarding the origin and evolution of these sex chromosome systems. Our data indicate that these sex chromosomes evolved independently in these two closed related Erythrinidae species. Different autosomes were first converted into a poorly differentiated XY sex pair in each species, and additional chromosomal rearrangements produced both X_1X_2Y sex systems that are currently present.

Conclusions: Our data provide new insights into the origin and evolution of sex chromosomes, which increases our knowledge about fish sex chromosome evolution.

Keywords: chromosome painting, microdissection, fish cytogenetics, sex chromosome evolution, Erythrinidae fish

Background

Fluorescence in situ hybridization (FISH) using whole chromosome-specific probes (wcp) is an important cytogenetic tool to study the origin and evolution of sex chromosomes in several organisms [1-8]. The diversity of sex-determining mechanisms, as well as the absence of heteromorphic sex chromosomes in many fish species make this group a useful model to study the evolution of vertebrate sex chromosomes [9,10]. However, research involving chromosome painting in fish is rarely performed because it is difficult to obtain the necessary probes. The few available studies are focused on karyotypic [11,12] and sex chromosome evolution [2,5,7,13-15]. The current literature suggests that a

variety of sex-determining mechanisms and sex chromosomes may have evolved independently in different fish species.

Erythrinidae is a Neotropical fish family that is characterized by species that have a wide variety of chromosomal forms, as well as a wide range of distinct sex chromosomes. The red wolf fish *Erythrinus erythrinus* (EER) is karyotypically diverse among different populations, with four currently identified karyomorphs (A to D) [16]. Karyomorph A is characterized by $2n = 54$ chromosomes that have very similar karyotypic structures and the absence of heteromorphic sex chromosomes. Karyomorphs B, C and D share an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system, but they can differ in the diploid number and chromosomal morphology. Karyomorph D has $2n = 52$ chromosomes in females and $2n = 51$ in males; previously published data suggests that karyomorph D was derived from a karyomorph A-

* Correspondence: mbcioffi@ufscar.br

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

like system [17]. In fact, although there are differences in the diploid number between karyomorphs A and D and only karyomorph D has a differentiated $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex system, they share a relatively similar karyotypic structure that is characterized by several acrocentric chromosomes and a few bi-armed chromosomes. Additionally, mapping of distinct classes of repetitive sequences (5S rDNA, Cot-1 DNA, *Rex3* and telomeric repeats) in the centromeric region of the Y chromosome indicated that a centric fusion between acrocentric pair number 5 and 12 in karyomorph A led to the formation of these sex chromosomes, in addition to the unpaired X_1 and X_2 chromosomes in the male karyotype of karyomorph D [17].

Similarly, the wolf fish *Hoplias malabaricus* (HMA) also demonstrates significant karyotypic diversity and well-defined population differences in the diploid number, chromosome morphology and sex chromosome systems. Currently, seven easily distinguishable karyomorphs (A to G) have been identified [18]. Three well-differentiated sex chromosome systems occur in this group, namely XX/XY in karyomorph B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ in karyomorph D and XX/ XY_1Y_2 in karyomorph G; additionally, karyomorph C has an early differentiated XX/XY system [18,19]. Karyomorph D has $2n = 40$ chromosomes in females and $2n = 39$ chromosomes in males; repetitive DNA chromosomal mapping suggests that karyomorph D may have derived from a karyotype similar to karyomorph C, which is characterized by $2n = 40$ chromosomes in both sexes [19,20]. A conspicuous proximal GC-rich heterochromatic/18S rDNA site, which is present on the long arms of the X and Y chromosomes in karyomorph C, is also located in the same region on the X_1 chromosome and the short arm of the large Y chromosome of karyomorph D; this suggests that the X_1 and Y chromosomes of karyomorph D derived from the XY chromosomes of karyomorph C. In addition, the Y chromosome of karyomorph D shares similar DNA sequences with chromosomes Y and 20 of karyomorph C. Chromosomal pair number 20 in karyomorph C and its homolog in karyomorph D (X_2) have centromeric satellite 5S *HindIII*-DNA, as well as an exclusive interstitial site that is present on the long arms of the Y chromosome of karyomorph D, which is the only non-centromeric location of this DNA sequence in the entire karyotype. These data indicate that this interstitial site is derived from the centromere of chromosome 20, which was fused to the ancestral Y chromosome in karyomorph C and resulted in the dicentric Y chromosome currently present in karyomorph D [19]. Moreover, additional studies have shown that this dicentric Y chromosome behaves as a stable component of the karyotype having a correct segregation during meiosis [20].

In the present study, we analyzed the origin of the EER and HMA X_1X_2Y sex chromosomes by performing chromosome painting analysis with sex-chromosome-specific probes established by microdissection. The X_1 chromosome of HMA (karyomorph D) and the Y chromosome of EER (karyomorph D) were microdissected and wcp-FISH was performed on the EER (karyomorphs A and D) and HMA (karyomorphs C and D) chromosomes. The results characterized the chromosomes that gave rise to the multiple sex determination systems and that both sex systems originated from different autosomal pairs. Our data provide new insights into the origin and evolution of sex chromosomes in fish, which increases our understanding of vertebrate sex chromosome evolution.

Results

Hm- X_1 probe hybridization to HMA chromosomes

In karyomorph C, the X_1 chromosome-specific probe (Hm- X_1) hybridized to both of the X chromosomes in females and the X and Y chromosomes in males (Figure 1). When the Hm- X_1 probe was hybridized to karyomorph D, two chromosomes were completely painted in females, corresponding to both X_1 chromosomes; in males, one chromosome was completely painted, corresponding to the X_1 chromosome, and half of another chromosome was painted, corresponding to the Y chromosome (termed neo-Y). No signal was observed on the X_2 chromosome (Figure 1). In general, there was a uniform signal for all of the sex chromosomes except X_2 , which indicates that there is high homology between their euchromatic and heterochromatic regions. Additionally, faint hybridization signals were observed in the subtelomeric heterochromatic segments of some autosomes, which may possibly be due to shared repetitive sequences. These results suggest that the painted chromosome pair in karyomorph C is the ancestral chromosome pair for the sex chromosome system observed in karyomorph D.

Ee-Y probe hybridization to EER chromosomes

The Y-chromosome-specific probe (Ee-Y) completely painted two chromosome pairs in both males and females of karyomorph A (Figure 2), as well as the X_1 and X_2 chromosomes in females and the X_1 , X_2 and Y chromosomes in males of karyomorph D (Figure 2). Weak signals were observed in the subtelomeric heterochromatic segments of some autosomes, which indicate that these chromosomes may have similar repetitive sequences. These results suggest that the painted chromosome pairs in karyomorph A are the ancestral pairs for the sex chromosome system observed in karyomorph D.

Reciprocal cross-species FISH

None of the distinguishable sex chromosomes in either species displayed consistent hybridization signals with

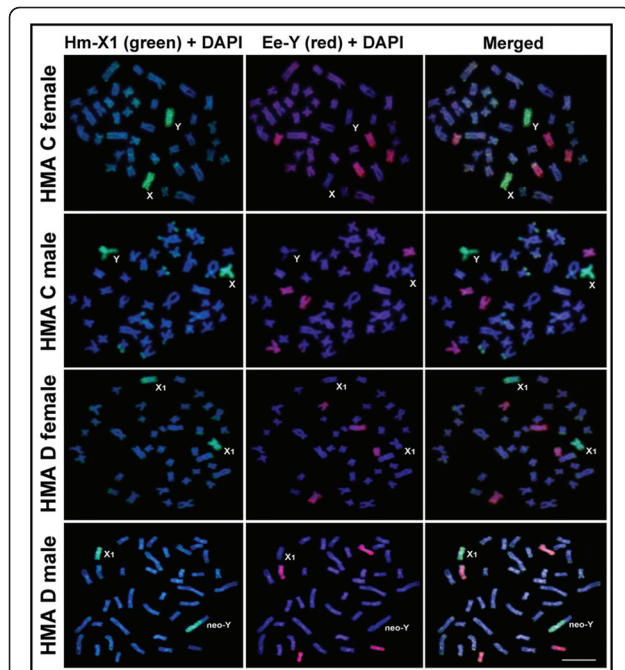


Figure 1 Chromosome painting with the HMA-derived Hm-X₁ (green) and EER-derived Ee-Y (red) probes. The probes hybridized to the female and male metaphase chromosomes in *Hoplias malabaricus* (HMA) karyomorphs C (2n = 40, XX/XY) and D (2n = 40/39, X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y). Note that the Hm-X₁ probe hybridized completely to the poorly differentiated X and Y chromosomes in karyomorph C, as well as the X₁ chromosome and a large extension of the neo-Y chromosome in karyomorph D. The EER-derived Ee-Y probe entirely labeled two distinct submetacentric autosomal pairs of HMA chromosomes. Scale bar = 5 μm.

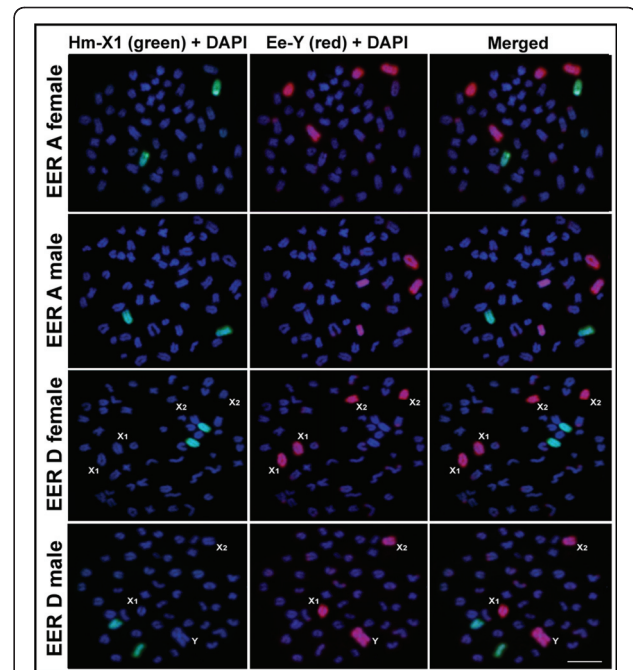


Figure 2 Chromosome painting with the Hm-X₁ (green) and Ee-Y (red) probes. The probes hybridized to the female and male metaphase chromosomes in *Erythrinus erythrinus* (EER) karyomorphs A (2n = 54, both sexes) and D (2n = 52/51, X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y). Note that the Ee-Y probe hybridized to four acrocentric chromosomes in EER karyomorph A, as well as the X₁, X₂ and Y chromosomes in EER karyomorph D. The HMA derived Hm-X₁ probe hybridized to a distinct autosomal pair in EER. Scale bar = 5 μm.

the cross-FISH experiments. In HMA, the Ee-Y probe hybridized completely to a medium and small autosomal submetacentric pair in males and females of karyomorphs C and D (Figure 1). In EER, the Hm-X₁ probe hybridized to a medium-sized autosomal acrocentric pair in males and females of karyomorphs A and D (Figure 2). The reciprocal cross-species FISH experiments (the Hm-X₁ probe with EER and the Ee-Y probe with HMA, respectively) clearly show that hybridization only occurred with autosomes in all of the karyomorphs that were analyzed.

Discussion

Origin of the sex chromosome systems in HMA karyomorphs

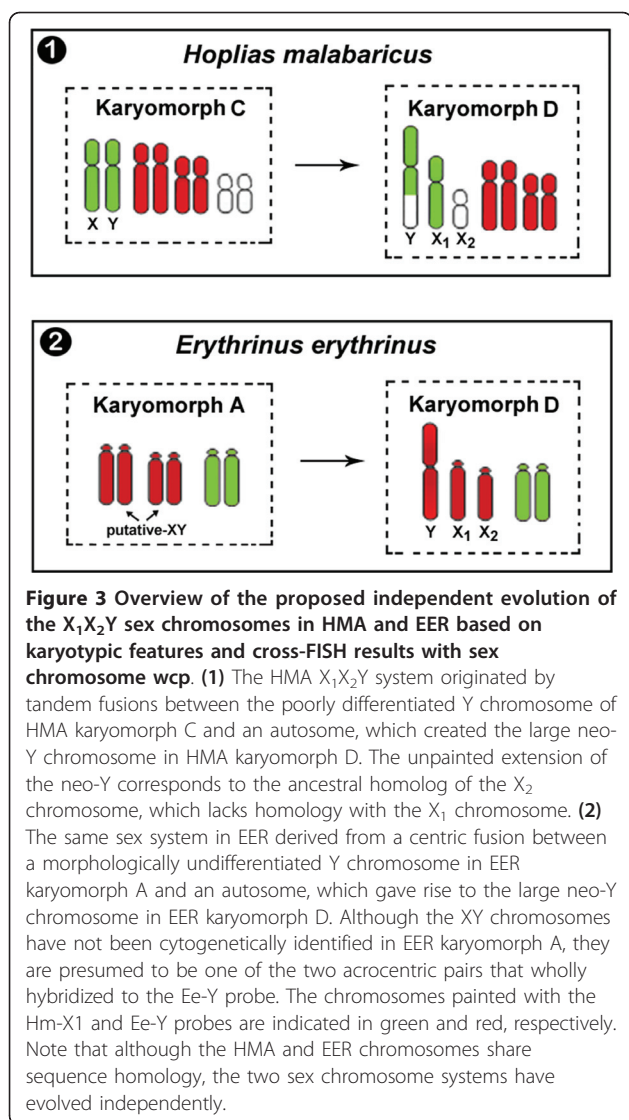
The complete staining of both the X and Y chromosomes with an HMA-derived X₁ probe for karyomorph C indicates that these sex chromosomes are highly similar. These results confirm the previous hypothesis that the XY chromosomes of HMA karyomorph C are at an early stage of differentiation. Indeed, a previous study has indicated that these chromosomes differ only by a

slight amplification of repetitive sequences on the X chromosome [19].

When hybridized with HMA karyomorph D, the HMA X₁ probe painted both of the X₁ chromosomes in females, as well as the entire X₁ chromosome and half of the neo-Y chromosomes in males. However, we did not detect hybridization with the X₂ chromosome, which indicates that the X₁ and X₂ chromosomes lack sequence homology and are likely unrelated chromosomes. We hypothesize that the unpainted region of the neo-Y chromosome corresponds to the X₂ chromosome. Thus, the multiple X₁X₂Y system in HMA originated through a tandem fusion between the proto-Y chromosome conserved in karyomorph C and one autosome, which created the large neo-Y chromosome that is characteristic of karyomorph D and one additional unpaired chromosome that was renamed X₂ (see Figure 3).

Origin of the sex chromosome systems in EER karyomorphs

For EER karyomorph D, the EER-derived Ee-Y probe hybridized to the large metacentric Y chromosome, as well as the entire acrocentric X₁ and X₂ chromosomes in both male and female karyotypes. These results



indicate that the Y metacentric chromosome arose from a centric fusion between two non-homologous acrocentric chromosomes, which were renamed X_1 and X_2 . Additionally, the Ee-Y probe hybridized to four acrocentric chromosomes in males and females of EER karyomorph A. This indicates that the multiple sex system of EER karyomorph D derived from a karyomorph A-like ancestor through chromosomal rearrangements involving a putative sex pair that was morphologically undifferentiated and a pair of autosomes (see Figure 3). Although the sex chromosomes remain cytogenetically unidentified in karyomorph A, they are likely one of the acrocentric pairs that was entirely stained by the Ee-Y probe.

Thus, in both species, reorganizations between undifferentiated or poorly differentiated sex chromosomes and autosomes gave rise to the multiple sex chromosome

systems. Rearrangements between sex chromosomes and autosomal pairs have previously been reported in several organisms [3,16,17,21-24].

Chromosomal rearrangements during the evolution of multiple sex chromosomes systems may reduce the need for alternative mechanisms to suppress recombination at breakpoint sites [25]. In the systems described here, the tandem and centric fusions were crucial steps for the origin of the X_1X_2Y sex systems in HMA and EER, respectively; no further differentiation appears to have occurred between the sex chromosomes within each species. Thus, the primary chromosomal rearrangements that occurred during the origin of these multiple sex chromosome systems appear to have been sufficient to fix the resulting chromosomes in the respective populations.

Independent origin of X_1X_2Y sex systems in Erythrinidae fishes

One interesting feature of fish sex chromosome biology is that only a few species present cytogenetically differentiated sex chromosomes. Nonetheless, XY sex systems are not common in fish. Because both of the fish species analyzed here are closely related and have similar multiple sex chromosomes that were derived from incipient XY systems, we were interested in comparing the origin of both sex systems. Specifically, we were interested in whether the systems independently evolved or formed prior to the divergence of the *Hoplias* and *Erythrinus* genera. We used reciprocal cross-species FISH with X and Y probes to analyze the origin of the sex systems in these two genera. The absence of a signal on the recognizable sex chromosomes after inter-specific painting clearly indicates that the X_1X_2Y chromosomes evolved independently in each species and are not related. Therefore, distinct ancestral XY chromosomes and autosomal pairs were involved in the formation of the multiple sex chromosomes in each species (Figure 3).

Numerous heteromorphic sex chromosomes have evolved independently in various plant and animal lineages [26,27]. Moreover, comparative syntenic analysis supports the hypothesis that sex chromosomes have independently evolved in different vertebrate lineages [28]. In fish, a previous study that used linkage analysis with eight isolated sex-linked markers indicated that the sex chromosomes of *Oryzias javanicus* are not homologous to those of any other *Oryzias* species [29-31]. Reciprocal cross-FISH experiments using sex chromosome probes within the genus *Eigenmannia* clearly indicated that there is no homology between the X_1X_2Y and XY systems, which suggests that these sex chromosomes independently evolved [7]. Similar results have also been reported for the salmonoid fish, where two paint probes specific to the short and long arms of the Y

chromosome of *Salvelinus namaycush* hybridized to two different autosomal chromosome pairs in *Oncorhynchus mykiss* and *O. tshawytscha*; again, these data indicate that there is no homology between the sex chromosomes of these two closely related genera [2]. These findings suggest that a variety of sex-determining mechanisms and sex chromosomes have independently evolved several times in the various fish genera. The most plausible explanation for the independent origin of sex chromosomes in fish is that different primary sex-determining genes may have evolved on different sex chromosomes, where an autosomal gene or a duplicated gene copy acquired a new mutation and gave rise to either male or female development; this would result in a novel sex-determining gene and produce new sex chromosomes from different autosomes [26].

Conclusions

In summary, we analyzed X_1X_2Y sex chromosome evolution in HMA and EER fish species. Our data indicate that there is a high plasticity of sex determination mechanisms in fish. It is noteworthy that two cofamiliar species with the same type of multiple sex chromosome system that emerged from poorly differentiated XY sex chromosomes have independently evolved and have gone through distinct differentiation processes. This data highlight the potential role of studies conducted in fish models to better understand the process of vertebrate sex chromosome evolution.

Methods

Specimens and chromosome preparation

In this study, we analyzed HMA samples of karyomorphs C and D, and EER samples of karyomorphs A and D. We studied a total of 85 specimens (38 females and 47 males). Overall, 8 HMA karyomorph C females and 10 males were collected from the Bento Gomes River (Poconé, Mato Grosso State, Brazil); 11 karyomorph D females and 12 males were collected from the Monjolinho stream (São Carlos, São Paulo State, Brazil). Additionally, 9 EER karyomorph A females and 12 males were collected from the Tietê River (Penápolis, São Paulo State, Brazil), and 10 EER karyomorph D females and 13 males were collected from the Pirangi River (Parnamirim, Rio Grande do Norte State, Brazil). The specimens were deposited in the fish collection of the Cytogenetic Laboratory, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Brazil. Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney using the conventional air-drying method [32]. Approximately 30 cells were analyzed per karyomorph to assess the diploid number. The experiments followed ethical protocols, and anesthesia was administered prior to sacrificing the animals.

Chromosome microdissection

Eighteen copies of the X_1 chromosome and fifteen copies of the Y chromosome were microdissected from male HMA karyomorph D and EER karyomorph D metaphase plates, respectively (Figure 4), using the methodology previously described with minor modifications [33]. In contrast to the large metacentric Y chromosome of EER, which is easily identifiable after Giemsa staining, the HMA chromosomes were stained with Chromomycin A_3 to allow for precise identification of the X_1 chromosomes by identification of a differential GC-rich heterochromatic block adjacent to the centromeric region on the long arm.

Briefly, the chromosome suspensions were dropped onto pre-cleaned coverslips and subjected to regular Giemsa or Chromomycin A_3 staining. The microdissection was performed using an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) with a sterile glass needle attached to a mechanical micromanipulator (Zeiss). The glass needles were prepared with a pipette puller model PB-7 (Narishige, Japan), and the chromosomes were transferred to a micropipette containing a collection solution (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA pH 7.5-8.0, 0.1% Triton X-100, 1.44 mg/ml proteinase K and 30% glycerol). The solution was subsequently transferred to a 0.5 ml Eppendorf tube containing 0.63 μ l of Sequenase buffer (USB), 0.4 μ l of 0.2 mM dNTPs, 0.6 μ l of 40 mM DOP primer (5'-CCGACTCGAGNNNNN-NATGTGG-3') and 3.37 μ l of PCR water per sample.

The first eight cycles of DOP-PCR were conducted using sequenase T7 DNA polymerase (USB, Cleveland, USA) under the following program: 90°C for 1 min, 25°C for 2 min and 34°C for 2 min. An initial denaturation step at 92°C for 5 minutes was included to inactivate the proteinase K. A sequenase mix (0.2 μ l) containing 12 U μ l⁻¹ T7 DNA polymerase and 1.75 μ l of Sequenase

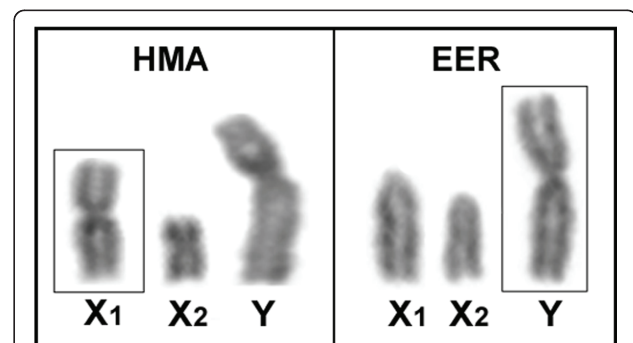


Figure 4 Multiple X_1X_2Y sex chromosomes of *Hoplias malabaricus* (HMA) and *Erythrinus erythrinus* (EER). The X_1 chromosome of HMA and the Y chromosome of EER that were microdissected and used for probe construction for wcp-FISH analysis are boxed.

dilution buffer was added at each cycle during annealing. The reaction volume was increased to 50 μ l by adding 0.1 U Taq polymerase, 0.2 mM dNTPs, 20 μ M DOP primer, 25 mM MgCl₂ and 34.23 μ l of PCR water. Subsequently, 33 additional cycles were conducted with the following program: 92°C for 1 min, 56°C for 2 min, 72°C for 2 min and a final 5 min extension step at 72°C.

We refer to these two probes as Hm-X₁ (for the HMA X₁ probe) and Ee-Y (for the EER Y probe).

Fluorescence in situ hybridization

The Hm-X₁ probe was PCR labeled with biotin-dUTP (Roche) and the Ee-Y probe was labeled with Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) with a 30-cycle label-PCR with DOP primer using 1 μ l of the primary DOP-PCR products as template DNA. The FISH analyses were performed on metaphase chromosome spreads from HMA (karyomorphs C and D) and EER (karyomorphs A and D). The slides were prepared and pre-treated as previously described [33] and denatured in 70% formamide with 2 \times SSC for 3 min at 72°C. For each slide, 12 μ l of hybridization solution (containing 0.2 μ g of each labeled probe, 50% formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulfate and 5 μ g of salmon sperm DNA) was denatured for 10 minutes at 75°C and allowed to pre-hybridize for 1 h at 37°C. The samples were allowed to hybridize for 16 h at 37°C in a moist chamber. Post-hybridization, the samples were washed with 0.4 \times SSC/0.3% Igepal detergent (SIGMA) for 5 min at 73°C and 2 \times SSC/0.1% Igepal for 30 s at room temperature. The biotinylated Hm-X₁ probe was detected with avidin-FITC (Vector Labs, USA). The slides were counterstained with DAPI and mounted in an anti-fade solution (Vectashield from Vector laboratories). Twenty metaphase plates per karyomorph were photographed with a digital CCD camera (Olympus DP70) coupled to a fluorescence microscope (Olympus BX51).

List of abbreviations

2n: diploid number; **DAPI**: 4',6'-diamidino-2-phenylindole; **dNTP**: deoxyribonucleotide triphosphate; **DOP-PCR**: degenerate oligonucleotide primed PCR; **dUTP**: deoxyuridine triphosphate; **EER**: *Erythrinus erythrinus*; **Ee-Y**: Y chromosome-specific probe; **FISH**: fluorescence in-situ hybridization; **HMA**: *Hoplias malabaricus*; **Hm-X₁**: X₁ chromosome-specific probe; **SSC**: Sodium Chloride-Sodium Citrate buffer; **PBS**: Phosphate-buffered saline; **WCP**: whole chromosome probe.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Wagner Franco Molina for supplying fish specimens. This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (pr. CGL2009-07754) co-funded by the European Regional Development Fund.

Author details

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil. ²Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Jaén, Spain. ³Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany. ⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia.

Authors' contributions

MBC performed the experiments and drafted the manuscript. AS and JAM participated of the techniques development and contributed to the discussion of data. NK realized the chromosome microdissection and contributed to the discussion of data. TL and VT helped interpret the results and reviewed the manuscript. LACB coordinated the study, helped interpret the results and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 April 2011 Accepted: 30 June 2011

Published: 30 June 2011

References

1. Shibata F, Hizume M, Kuroki Y: Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma* 1999, **108**:266-270.
2. Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein D: Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica* 2001, **111**:119-123.
3. Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia, Sánchez A: X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Res* 2004, **12**:767-776.
4. Rens W, O'Brien PCM, Grütznher F, Clarke O, Graphodatskaya D, Tsend-Ayush E, Trifonov V, Skelton H, Wallis MC, Johnston S, Veyrunes F, Graves JAM, Ferguson-Smith MA: The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biol* 2007, **8**:R243.
5. Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC: Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Tripurtheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 2008, **122**:163-168.
6. Swier VJ, Bradley RD, Rens W, Elder FF, Baker RJ: Patterns of chromosomal evolution in *Sigmodon*, evidence from whole chromosome paints. *Cytogenet Genome Res* 2009, **125**:54-66.
7. Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF: Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res* 2008, **121**:55-58.
8. Acosta MJ, Romero-Fernández I, Sánchez A, Marchal JA: Comparative Analysis by Chromosome Painting of the Sex Chromosomes in Arvicolid Rodents. *Cytogenet Genome Res* 2011, **132**:47-54.
9. Almeida-Toledo LF, Foresti F: Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. *Genetica* 2001, **111**:91-100.
10. Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC: Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. *Cytogenet Genome Res* 2011, **132**:188-194.
11. Ráb P, Rábová M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikánová S: Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker—the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. *Chromosome Res* 2008, **16**:863-873.
12. Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, de Souza ACP, Ferguson-Smith MA: Multiple rearrangements in cryptic species of electric knife-fish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genetics* 2010, **11**:28.
13. Phillips RB, DeKoning J, Morasch MR, Park LK, Devlin RH: Identification of the sex chromosome pair in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Cytogenet Genome Res* 2007, **116**:298-304.

14. Reed KM, Bohlander SK, Phillips RB: **Microdissection of the Y chromosome and FISH analysis of the sex chromosomes of lake trout, (*Salvelinus namaycush*).** *Chromosome Res* 1995, **5**:221-227.
15. Wang X, Zhang Q, Ren J, Jiang Z, Wang C, Zhuang W, Zhai T: **The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*).** *Aquaculture* 2009, **297**:78-84.
16. Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, das N Falcão J, Fenocchio AS: **Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes).** *Heredity* 2004, **93**:228-233.
17. Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: **Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish.** *BMC Evol Biol* 2010, **10**:271.
18. Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: **A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations.** *Chromosome Res* 2000, **8**:603-613.
19. Cioffi MB, Bertollo LAC: **Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group.** *Heredity* 2010, **105**:554-561.
20. Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: **The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* I. G-, C- and chromosome replication banding.** *Chromosome Res* 1997, **5**:493-499.
21. Graves JAM: **The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes— an evolving understanding.** *Bioessays* 1995, **17**:311-320.
22. Wilcox SA, Watson JM, Spencer JA, Graves JAM: **Comparative mapping identifies the fusion point of an ancient mammalian X-autosomal rearrangement.** *Genomics* 1996, **35**:66-70.
23. Ashley : **X-Autosome translocations, meiotic synapsis, chromosome evolution and speciation.** *Cytogenet Genome Res* 2002, **96**:33-39.
24. Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, Almeida-Toledo LF: **Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*).** *Heredity* 2011, **106**:391-400.
25. Vieira CP, Coelho PA, Vieira Jb: **Inferences on the history of the *Drosophila americana* polymorphic X/4 fusion from patterns of polymorphism at the X-linked paralytic and elav genes.** *Genetics* 2003, **164**:1459-1469.
26. Scharl M: **Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates.** *Curr Opin Genet Dev* 2004, **14**:634-641.
27. Vyskot B, Hobza R: **Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog.** *Trends Genet* 2004, **20**:432-438.
28. Schultheis C, Böhne A, Scharl M, Volff J, Galiana-Arnoux D: **Sex determination diversity and sex chromosome evolution in poeciliid fish.** *Sex Dev* 2009, **3**:68-77.
29. Nagai T, Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M: **Identification of the sex-determining locus in the Thai medaka, *Oryzias minutillus*.** *Cytogenet Genome Res* 2008, **121**:137-142.
30. Takehana Y, Demiyah D, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M: **Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*.** *Genetics* 2007, **175**:1335-1340.
31. Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M: **Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*.** *Chromosoma* 2007, **116**:463-470.
32. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae).** *Brazil J Genet* 1978, **1**:103-120.
33. Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP: **Generation of paint probes by flow-sorted and microdissected chromosomes.** In *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide*. Edited by: Liehr T. Springer Berlin Heidelberg; 2009:35-52.

doi:10.1186/1471-2148-11-186

Cite this article as: Cioffi et al.: Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. *BMC Evolutionary Biology* 2011 **11**:186.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 6

Pintura cromossômica revela a origem independente dos cromossomos sexuais entre formas intimamente relacionadas de uma espécie de peixe

Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T,
Trifonov V, Bertollo LAC

Genetica 139:1065-1072 (2011)

Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species

Marcelo de Bello Cioffi · Antonio Sánchez · Juan Alberto Marchal ·
Nadezda Kosyakova · Thomas Liehr · Vladimir Trifonov ·
Luiz Antonio Carlos Bertollo

Received: 13 May 2011 / Accepted: 8 September 2011 / Published online: 17 September 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract The wolf fish *Hoplias malabaricus* includes well differentiated sex systems (XY and X_1X_2Y in karyomorphs B and D, respectively), a nascent XY pair (karyomorph C) and not recognized sex chromosomes (karyomorph A). We performed the evolutionary analysis of these sex chromosomes, using two X chromosome-specific probes derived by microdissection from the XY and X_1X_2Y sex systems. A putative-sex pair in karyomorph A was identified, from which the differentiated XY system was evolved, as well as the clearly evolutionary relationship between the nascent XY system and the origin of the multiple X_1X_2Y chromosomes. The lack of recognizable signals on the sex chromosomes after the reciprocal cross-FISH experiments highlighted that they evolved independently from non-homologous autosomal pairs. It is noteworthy that these distinct pathways occur inside the same nominal species, thus exposing the high plasticity of sex chromosome evolution in lower vertebrates. Possible mechanisms underlying this sex determination liability are also discussed.

Keywords Sex chromosomes evolution · Chromosome painting · Microdissection · FISH · *Hoplias malabaricus*

Abbreviations

2n	Diploid number
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide primed PCR
dUTP	Deoxyuridine triphosphate
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Hm-X	X chromosome-specific probe
Hm- X_1	X_1 chromosome-specific probe
SSC	Sodium Chloride-Sodium Citrate buffer
PBS	Phosphate-buffered saline
WCP	whole chromosome probe

Introduction

In contrast to the upper vertebrates, most fish species do not present differentiated sex chromosomes, although a variety of sex chromosome systems has already been described in this group (Devlin and Nagahama 2002; reviewed in Cioffi et al. 2011a). However, despite this fact, primary sex determining genes have not been identified yet (Schartl 2004), and the syntenic relationships among sex chromosomes have not been investigated, with only few exceptions (Matsuda et al. 2002; Nanda et al. 1990). Overall, fish provide an interesting and unique opportunity to study the evolution of sex chromosomes and sex-determination in lower vertebrates.

The wolf fish *Hoplias malabaricus* has significant karyotypic diversity and well-defined population differences concerning distinct chromosomal characteristics, in which at least 7 karyomorphs were easily identified

M. de Bello Cioffi (✉) · L. A. C. Bertollo
Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de
São Carlos, São Carlos, SP, Brazil
e-mail: mbcioffi@ufscar.br

A. Sánchez · J. A. Marchal
Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias
Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

N. Kosyakova · T. Liehr
Institute of Human Genetics, Jena University Hospital,
Kollegiengasse 10, 07743 Jena, Germany

V. Trifonov
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
SB RAS, Novosibirsk, Russia

(Bertollo et al. 2000). Actually, distinct sex chromosome systems can be found in some karyomorphs, varying from subtle changes to major chromosomal differentiation. In karyomorph B ($2n = 42$, for both sexes), the differentiation of the XY system was due to an accumulation of repetitive DNAs on the long arm of the X chromosome, contrasting with the closely related karyomorph A ($2n = 42$, for both sexes) which presents sex chromosomes completely undifferentiated (Cioffi et al. 2010a). In karyomorph C ($2n = 40$, for both sexes) an XY sex system is found at a nascent stage and is only evidenced by a discrete accumulation of repetitive DNAs on a morphologically undifferentiated chromosome pair (Cioffi and Bertollo 2010). Finally, the karyomorph D ($2n = 40$ females/ $2n = 39$ males) is characterized by a unique X_1X_2Y sex chromosome system, in which the neo-Y chromosome was probably originated by means of tandem fusion (Cioffi and Bertollo 2010).

Several studies performing mapping of repetitive DNAs have shed light on the molecular composition and the mechanisms that led to the differentiation of the sex chromosomes in *H. malabaricus*. Different repeated DNA families (ribosomal genes, satellite DNAs, retroelements, and microsatellites) were characterized as components of these chromosomes (Cioffi et al. 2009; Rosa et al. 2009; Cioffi and Bertollo 2010; Cioffi et al. 2010a, b, 2011a), therefore highlighting the potential role of these DNA sequences in the differentiation of fish sex chromosomes (Nanda et al. 1990; Martins 2007; Cioffi et al. 2011a).

Chromosomal painting analysis using chromosome specific probes has contributed to the knowledge of supernumerary and sex chromosomes, species evolution, and the identification of several chromosomal rearrangements (Shetty et al. 1999; Griffin et al. 2007; Ferguson-Smith and Trifonov 2007; Stanyon et al. 2008; Teruel et al. 2009; Yang and Graphodatsky 2009; Cioffi et al. 2011b, among others). However, the application of chromosome painting for comparative chromosome studies in some animal groups is limited due to the difficulties for probe obtaining, as it occurs in fish. In fact, just a few studies with whole chromosome painting probes (wcp) have already been conducted in this animal group (Reed et al. 1995; Phillips et al. 2001, 2007; Diniz et al. 2008; Henning et al. 2008; Ráb et al. 2008; Wang et al. 2009; Nagamachi et al. 2010; Cioffi et al. 2011b).

In this sense, in an attempt to provide a deep study on the origin and evolution of fish sex chromosomes, chromosome painting analysis was performed in the species *H. malabaricus* using sex chromosome-specific probes established by microdissection. The X and X_1 chromosomes of karyomorphs B and D, respectively, were microdissected and used for whole chromosome painting FISH analysis in karyomorphs A-D. The results shed light on the processes

working on sex chromosomes evolution, besides revealing their independent origins inside a same nominal species. Additionally, possible mechanisms underlying these processes are also discussed.

Materials and methods

Specimens and chromosome preparation

Males and females of *H. malabaricus* belonging to karyomorphs A and B were collected from the Pântano River (Descalvado, São Paulo State, Brazil) and the Doce River (Parque Florestal do Rio Doce, Minas Gerais State, Brazil), respectively. Males and females of *H. malabaricus* belonging to karyomorphs C and D were collected from the Bento Gomes River (Poconé, Mato Grosso State, Brazil) and the Monjolinho stream (São Carlos, São Paulo State, Brazil), respectively. The specimens were deposited in the fish collection of the Cytogenetic Laboratory, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. The experiments followed ethical protocols, and anaesthesia was used prior to sacrificing the animals. Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney, using the conventional air-drying method (Bertollo et al. 1978).

Chromosome microdissection

Fifteen copies of the X chromosome and 18 copies of the X_1 chromosome were microdissected from the karyotype of karyomorphs B and D, respectively (Fig. 1), using the methodology previously described by Yang et al. (2009), with minor adaptations. In contrast to the subtelocentric X chromosome, which is easily identifiable after Giemsa staining, the chromosomes of karyomorph D were stained with Chromomycin A₃ to distinguish the X_1 chromosomes by identification of a differential GC-rich heterochromatic block adjacent to the centromeric region on the long arm.

Briefly, the chromosome suspensions were dropped onto pre-cleaned coverslips, and subjected to regular Giemsa or Chromomycin A₃ staining. The microdissection was performed using an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) with a sterile glass needle attached to a mechanical micromanipulator (Zeiss). The glass needles were prepared with a pipette puller model PB-7 (Narishige, Japan) and the chromosomes transferred to a micropipette containing a collection solution (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA pH 7.5–8.0, 0.1% Triton X-100, 1.44 mg/ml proteinase K and 30% glycerol). Afterwards, this solution was transferred to an Eppendorf 0.5 ml tube containing: 0.63 µl Sequenase buffer (USB), 0.4 µl of 0.2 mM dNTPs, 0.6 µl of 40 mM DOP primer

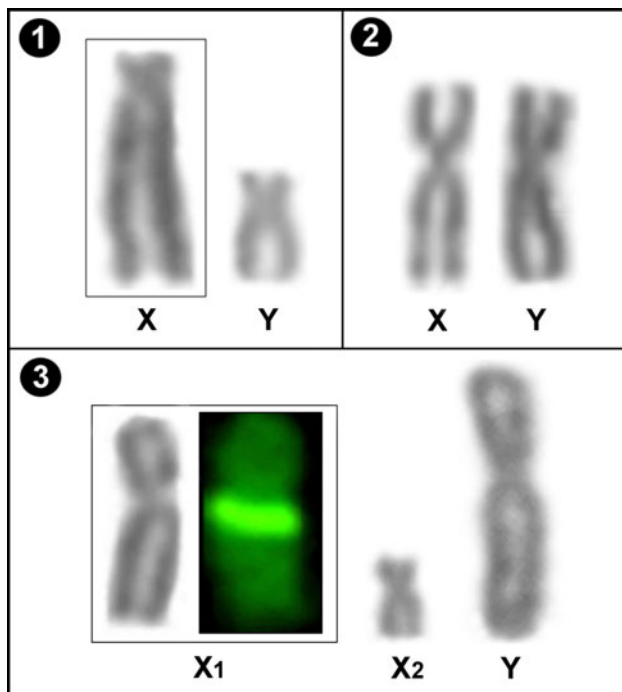


Fig. 1 Distinct sex chromosomes of *Hoplias malabaricus*. 1 Highly differentiated XY chromosomes of karyomorph B. 2 Nascent XY sex chromosomes of karyomorph C and 3 multiple X_1X_2Y sex chromosomes of karyomorph D. A detail of the X_1 chromosome stained with Chromomycin A_3 in order to allow its precise identification for microdissection procedures is also shown. The sex chromosomes that were microdissected and used for probe construction for wcp-FISH analysis are boxed

(5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') Telenius et al. (1992) and 3.37 μl of water per sample.

The first eight cycles of DOP-PCR were conducted using sequenase T7 DNA polymerase (USB, Cleveland, USA) under the following program: 90°C/1 min; 25°C/2 min; 34°C/2 min. An initial denaturation step at 92°C for 5 min was included to inactivate the proteinase K activity. 0.2 μl of a sequenase mix containing: 12 U μl^{-1} T7 DNA polymerase and 1.75 μl Sequenase dilution buffer was added at each cycle during annealing. Reaction volume was then increased to 50 μl by adding 0.1 U Taq polymerase, 0.2 mM dNTPs, 20 μM DOP primer, 25 mM MgCl_2 and 34.23 μl of PCR water. Then 33 cycles were conducted with the following program: 92°C/1 min; 56°C/2 min; 72°C/2 min, followed by a final 5 min extension step at 72°C.

We refer to these probes as Hm-X (for *H. malabaricus* karyomorph B—X probe) and Hm-X1 (for *H. malabaricus* karyomorph D— X_1 probe).

Fluorescence in situ hybridization

The probes were PCR labeled with biotin-16-dUTP (Roche) for the Hm-X probe and with Spectrum Orange-

dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) for the Hm-X1 probe, in a 30 cycle label-PCR with DOP primer using 1 μl of the primary DOP-PCR products as template DNA. FISH was performed on metaphase chromosome spreads of *H. malabaricus* (karyomorphs A–D). The slides were prepared and pre-treated according to Yang et al. (2009) and denatured in 70% formamide/2 \times SSC for 3 min at 72°C. For each slide, 12 μl of hybridization solution (containing 0.2 μg of each labelled probe, 50% of formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulphate and 5 μg of salmon sperm DNA) was denatured for 10 min at 75°C and allowed to pre-hybridize for 1 h at 37°C. Hybridization took place for 16 h at 37°C in a moist chamber. Post-hybridization washes were carried out in 0.4 \times SSC/0.3% Igepal detergent (SIGMA) for 5 min at 73°C and 2 \times SSC/0.1% Igepal for 30 s at room temperature. Detection of the biotinylated Hm-X probe was carried out using avidin-FITC (Vector Labs, USA). Finally, the slides were counterstained with DAPI and mounted in an antifade solution (Vectashield from Vector laboratories). Images were captured using a fluorescence microscope (Olympus BX51) equipped with a CCD camera (Olympus DP70).

Results

The karyomorph B X chromosome-specific probe (Hm-X) completely painted the sex chromosomes in both females and males of karyomorph B (Fig. 2a, b). The heterochromatic region located in the long arms of both X and Y chromosomes presented more intense signals due to the high number of repeated DNA sequences accumulated in this region. The euchromatic region presented a uniform signal, demonstrating the existence of a high level of similarity for these regions between both sex chromosomes (Fig. 2a, b). When applied to karyomorph A, the Hm-X probe painted two small submetacentric chromosomes in both male and female karyotypes (Fig. 2c, d). This pair also showed more intense signal present at the terminal heterochromatic regions of the long arms, as occurred with the sex chromosomes of karyomorph B (Fig. 2c, d).

The karyomorph D X_1 chromosome-specific probe (Hm-X1) completely painted the X_1 chromosomes in both females and males, and the small arm and approximately half of the long arm of the neo-Y chromosome in the same karyomorph (Fig. 3a, b). However, no signal was present in the submetacentric X_2 chromosome. In the same way, both X and Y chromosomes were also entirely painted in male and females' karyotypes of karyomorph C (Fig. 3c, d).

Reciprocal cross-species painting evidenced that the Hm-X1 probe completely painted a medium-sized submetacentric pair in karyomorphs A and B (Fig. 2a–d) while Hm-X probe painted a relatively small submetacentric pair

Fig. 2 Cross-species chromosome painting with the Hm-X (*green*) and Hm-X1 (*red*) sex chromosomes probes. **a** Female and **b** male specimens of karyomorph B ($2n = 42$, XX/XY) and **c** females and **d** male specimens of karyomorph A ($2n = 42$) of *Hoplias malabaricus*. The arrowheads indicate the putative sex chromosomes of karyomorph A. Bar = 5 μ m

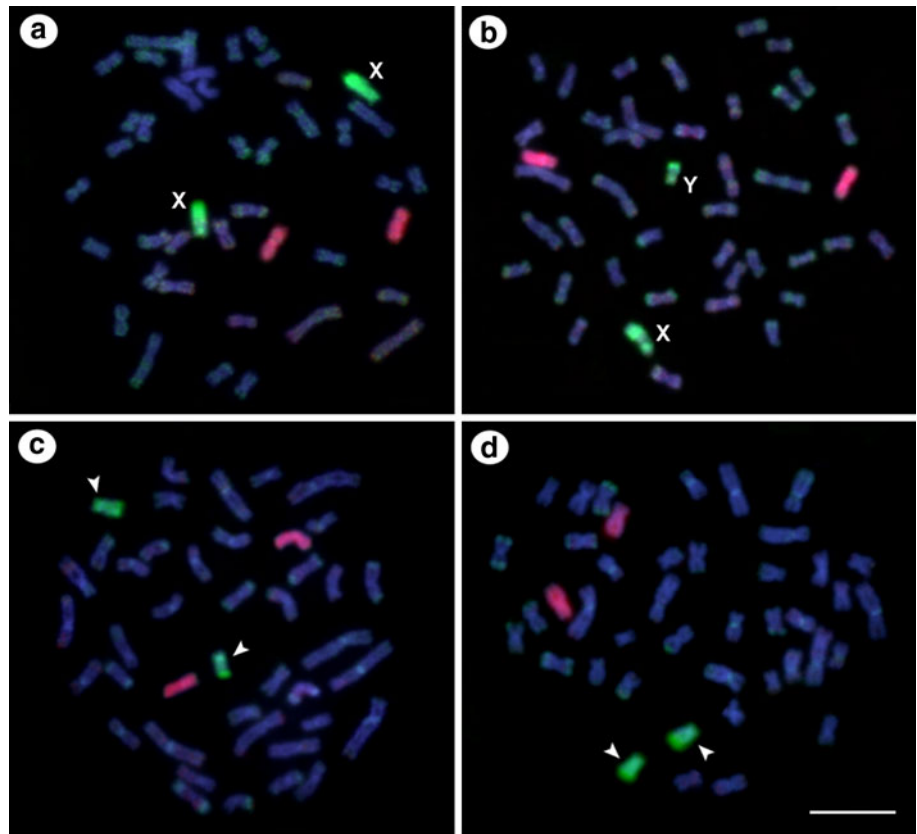
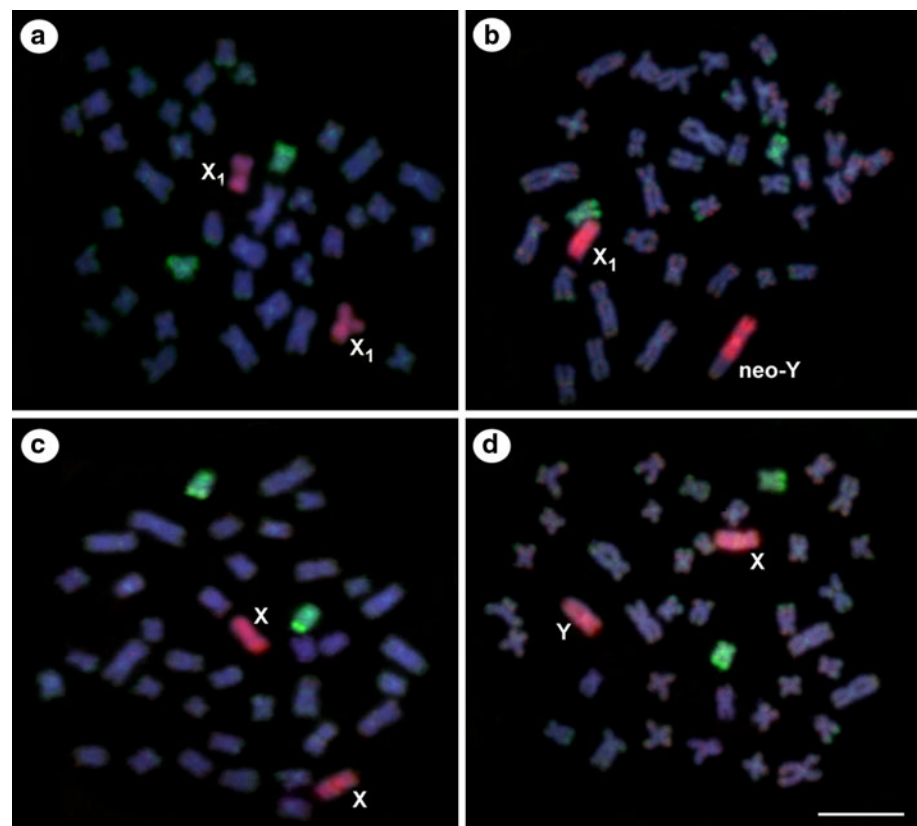


Fig. 3 Cross-species chromosome painting with the Hm-X (*green*) and Hm-X1 (*red*) sex chromosomes probes. **a** Female and **b** male specimens of karyomorph D ($2n = 40/39$, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$) and **c** females and **d** male specimens of karyomorph C ($2n = 40$, XX/XY) of *Hoplias malabaricus*. The unpainted extension of the neo-Y chromosome corresponds to the homologous segment of the X_2 chromosome, which lacks homology with the sequences present in the X_1 chromosome. Bar = 5 μ m



in karyomorphs C and D (Fig. 3a–d). Also, the last probe showed a more intense signal in the terminal regions of the small submetacentric chromosomes in both karyomorphs. Remarkably, none of the distinguishable sex chromosomes in karyomorphs B, C and D displayed hybridization signals after the cross-FISH experiments.

In all cases, weak hybridization signals were also detected on several autosomal pairs, demonstrating that genomes of all karyomorphs share some repetitive sequences.

Discussion

This study aimed to determine the origins and the relationships of different sex chromosome systems present in the nominal fish species *H. malabaricus*.

Karyomorph B is characterized by a well-differentiated XX/XY sex chromosome system. The subteloentic X chromosome is easily recognized by a conspicuous heterochromatic block on the long arm, which accumulated repetitive DNA sequences (Born and Bertollo 2000; Cioffi et al. 2010a). The Hm-X probe completely painted this chromosome, showing intensive hybridization signals on most part of its heterochromatic long arm. In fact, as the X chromosome accumulated a high number of repetitive elements, this could explain the faint hybridization signals located in many other chromosomes of the karyotype, evidencing the shared elements by these chromosomes.

Karyomorphs A and B are close karyotypic forms, with indications that the latter has most likely derived from the first one, through the differentiation of a clearly recognizable XY sex chromosome system (Bertollo et al. 2000; Cioffi et al. 2010a). The Hm-X probe completely painted a small submetacentric pair in Karyomorph A, proving our previous assumptions that the smallest autosomal pair of karyomorph A (chromosome 21) and the XY chromosomes of karyomorph B might be related, on the basis of their shared DNA sequences (Cioffi et al. 2010a). For this reason, this small submetacentric pair (chromosome 21) is indeed the strongest candidate to be the homomorphic sex chromosomes of karyomorph A. Finally, this putative-sex pair gave origin to the well-established XY system present in karyomorph B by an exclusive enrichment of repetitive DNAs on the X chromosome, which increased its long arm during the differentiation process (Cioffi et al. 2010a; Fig. 4).

Nascent XY sex chromosomes are found in karyomorph C, in which the X and Y chromosomes differ by a small, but significant amplification of repetitive DNAs on the X chromosome (Cioffi and Bertollo 2010). Accordingly, the Hm-X1 probe completely painted both X and Y

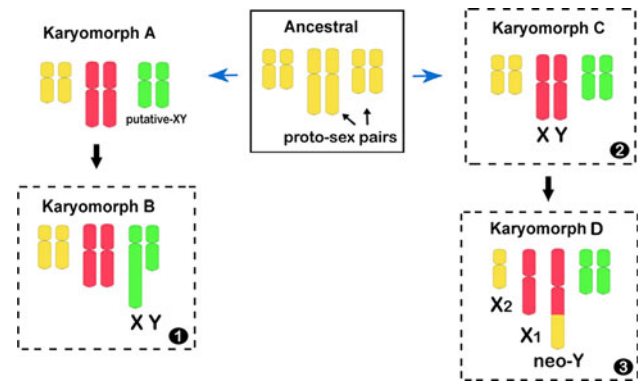


Fig. 4 Schematic diagram showing the derivation of sex chromosome system of karyomorphs B, C and D of *Hoplias malabaricus*, as evidenced by the chromosome painting with the Hm-X and Hm-X₁ probes. Distinct proto-sex chromosomes were probably present in the ancestral karyotypic form, from which the XY sex chromosomes evolved in, at least, two independent conditions. 1 The highly differentiated XY sex system of karyomorph B was derived from the putative sex chromosome pair of karyomorph A by the accumulation of repetitive DNA sequences on the X chromosome, increasing its long arm during the differentiation process. Although the XY chromosomes are yet to be demonstrated cytologically in karyomorph A, they are presumed to be the small submetacentric pair painted with the Hm-X probe. 2 The nascent XY sex chromosomes of karyomorph C are still poorly differentiated, differing only slightly by the amplification of some repetitive sequences on the X chromosome. 3 The multiple X₁X₂Y sex system of karyomorph D was originated through a tandem fusion between the Y chromosome and an autosome, giving rise to the large neo-Y chromosome. The unpainted segment on the neo-Y corresponds to the ancestral homologue of the X₂ chromosome, which lacks homology with the X₁ chromosome. The chromosomes painted with Hm-X and Hm-X₁ probes are indicated in green and red, respectively

chromosomes, demonstrating the high level of similarity between these chromosomes.

When applied to karyomorph D, the Hm-X₁ probe painted both X₁ chromosomes in females and the only X₁ and half of the neo-Y chromosome in males, but no signal was found on the X₂ chromosome. These results strongly confirm the evolutionary relationships between the sex chromosomes of both karyomorphs (C and D). In fact, previous studies based on the karyotypic features and the distribution of repetitive elements suggested a greater evolutionary proximity between these karyomorphs, and the probable correlation between their sex chromosomes (Cioffi et al. 2009; Cioffi and Bertollo 2010). For this reason, the present results clearly point out the origin of this multiple X₁X₂Y sex system through a tandem fusion between the ancestral Y chromosome present in karyomorph C and an autosome, creating the large neo-Y chromosome. The unpainted region of the neo-Y with the Hm-X₁ probe probably corresponds to the homologous segment of the X₂ chromosome (also unpainted) which lacks homology with the X₁ chromosome (Fig. 4).

Suppression of recombination around the probable sex-determining locus in proto-sex chromosomes may have allowed the subsequent heterochromatization in the X chromosomes of karyomorphs B and C by an enrichment of repetitive DNA sequences. This process, however, may have been triggered later in karyomorph C, once its XY chromosomes are at an early stage of differentiation and still morphologically undifferentiated.

The lack of signals on recognizable sex chromosomes after the reciprocal cross-karyomorph painting highlighted that the XY chromosomes of karyomorphs B and C evolved independently in *H. malabaricus*, in which distinct autosomal pairs were differentiated into sex chromosomes. In addition, further chromosomal rearrangements involving the sex chromosomes and other autosomes originated the unique X_1X_2Y sex system present in karyomorph D (Fig. 4).

As with *H. malabaricus*, some other fish groups also show different sex chromosomes among closely related species (Phillips et al. 2001; Woram et al. 2004; Peichel et al. 2004; Henning et al. 2008). In the weakly electric fish *Eigenmannia* it was demonstrated, by chromosomal painting analysis, an independent origin of the sex chromosome systems present in two closely related species (Henning et al. 2008, Henning et al. 2011). Similar results were also found in salmonid fishes, in which painting probes, specific to the Y chromosome of *Salvelinus namaycush*, hybridized to two different autosomal pairs of *Oncorhynchus mykiss* and *O. tshawytscha*, supporting the lack of homology between the sex chromosomes of these two closely related genera (Phillips et al. 2001). Sex determination also appear to be very complex within the stickleback genus, with some species having heteromorphic sex chromosomes, alongside with others with homomorphic karyotypes between sexes (Bell and Foster 1994; Filatov 2005).

Sex chromosomes originate after the acquisition of a sex-determining allele on an ordinary autosomal pair (Muller 1914) and differentiated by the accumulation of sexually antagonistic alleles (which are advantageous to only one sex) at loci closely linked to the sex-determining region (Fisher 1931; Bull 1983; Rice 1987). Selection favours the restriction of those loci to one sex by suppression of recombination, which may subsequently spread along most or the entire chromosome (Charlesworth and Charlesworth 1980; Bull 1983). In the absence of recombination, retrotransposons invade sex chromosomes, and repetitive sequences are amplified in the nonrecombining region (Charlesworth et al. 1994). Heterochromatin also accumulates, perhaps as a cellular defence against unchecked retrotransposition (Steinemann and Steinemann 2005). Our present results indicate that different autosomal pairs could carry sex-determining regions or genes in

H. malabaricus, suggesting that multiple loci can be assumed as triggering sex determination in fish. These could be genes, located in different pairs of chromosomes, involved in a relaxed primary ancestral gene pathway that leads to sexual differentiation. Once one of these pairs begun the process of sex chromosomal differentiation, the linked gene or genes from this pathway could acquire the main role of sex-determining gene. Genome-wide linkage mapping identified a single major chromosome region in *Gasterosteus aculeatus* that controls the sex determination, but closely related species uses different master sex-determination switches nevertheless, suggesting that these developmental pathways can evolve very quickly among stickleback fishes (Peichel et al. 2004). These findings highlight that a variety of sex-determining mechanisms and sex chromosomes have evolved independently in different fish groups.

Another plausible explanation for the independent origins of sex chromosomes in fish is that different primary sex-determining genes may have evolved on different chromosomes, in which an autosomal gene or a duplicated gene copy acquired a new mutation and gave rise to either male or female development, resulting in the novel sex-determining gene and sex chromosome from different autosomes (Kondo et al. 2004). For example, the medaka fish *Oryzias latipes* has an XY sex system in which a gene with high similarity to *Dmrt1* was found to be an excellent candidate for the master male sex determination gene (Nanda et al. 1990). It was shown that a region containing *Dmrt1*, located on the autosomal linkage group 9, was duplicated and the whole fragment was inserted into another chromosome, which now behaves as the Y chromosome in this species. However, the evolution of novel sex chromosomes can also be linked with the acquisition of novel genes. The activation of unlinked sex-determining genes on autosomes could also be a possible mechanism for the independent origin of sex chromosomes in different fish lineages, as proposed for the evolution of non-homologous sex chromosomes in salmonid fishes (Woram et al. 2004). Thus, *H. malabaricus* may have quickly evolved a variety of sex-determining genes, in such a way that even very close karyotypic forms belonging to the same nominal species, have originated independent sex chromosomes from different autosomal pairs.

The present results helped tracking the evolutionary process working on the distinct sex chromosome systems inside *H. malabaricus*, making clear their origin from non-homologous autosome pairs. Besides, this Erythrinidae group proved to be a very informative system, providing a useful opportunity to study the evolution of the sex chromosomes and the sex determination. Further investigations on the sex-determining regions will be important for unravelling the molecular mechanisms associated with the

alternative sex-determination systems and different sex-determining genes, as well as the process of differentiation of the fish sex chromosomes. As expected, fishes seem to be excellent models to analyze the evolution of sex chromosomes and the genetics of sex determination, providing important insights concerning this matter for vertebrates as a whole.

Acknowledgments This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (pr. CGL2009-07754) co-funded by the European Regional Development Fund.

References

- Bell MA, Foster SA (1994) The evolutionary biology of the three spine stickleback. Oxford University Press, Oxford
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1:103–120
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613. doi:10.1023/A:1009233907558
- Born GG, Bertollo LAC (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res* 8:111–118
- Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms. Benjamin/Cummings, San Francisco
- Charlesworth D, Charlesworth B (1980) Sex differences in fitness and selection for centric fusions between sex-chromosomes and autosomes. *Genet Res* 35:205–214
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220
- Cioffi MB, Bertollo LAC (2010) Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105:554–561
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2009) Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics* 10:34–44
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC (2010a) Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sex Dev* 4:176–185
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2010b) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol* 10:271
- Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC (2011a) Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. *Cytogenet Genome Res* 132:188–194
- Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC (2011b) Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes. *BMC Evol Biol* 11:186
- Devlin RH, Nagahama T (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC (2008) Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Tripottheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 122:163–168
- Ferguson-Smith MA, Trifonov V (2007) Mammalian karyotype evolution. *Nature* 8:950–962
- Filatov D (2005) Evolutionary genetics: stickleback's view of sex chromosome evolution. *Heredity* 94:275–276
- Fisher RA (1931) The evolution of dominance. *Biol Rev* 6:345–368
- Griffin DK, Robertson LBW, Tempest HG, Skinner BM (2007) The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* 117:64–77
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008) Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res* 121:55–58
- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, Almeida-Toledo LF (2011) Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity* 106:391–400
- Kondo M, Nanda I, Hornung U, Schmid M, Schartl M (2004) Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Curr Biol* 14:1664–1669
- Martins C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, pp 421–453
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C et al (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563
- Muller HJ (1914) A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. *J Exp Zool* 17:325–336
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, de Souza ACP, Ferguson-Smith MA (2010) Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genetics* 11:28
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JT (1990) Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30:456–462
- Peichel CL, Ross JA, Matson CK, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J et al (2004) The master sex-determination locus in three spine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr Biol* 14:1416–1424
- Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein D (2001) Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*. *Salmo and Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica* 111:119–123
- Phillips RB, DeKoning J, Morasch MR, Park LK, Devlin RH (2007) Identification of the sex chromosome pair in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Cytogenet Genome Res* 116:298–304
- Ráb P, Rábová M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikánová S (2008) Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker—the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. *Chromosome Res* 16:863–873
- Reed KM, Bohlander SK, Phillips RB (1995) Microdissection of the Y chromosome and FISH analysis of the sex chromosomes of lake trout, (*Salvelinus namaycush*). *Chromosome Res* 5:221–227

- Rice WR (1987) The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. *Evolution* 41:911–914
- Rosa R, Vanzela AL, Rubert M, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L (2009) Differentiation of Y chromosome in the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Cytogenet Genome Res* 127:54–60
- Schartl M (2004) Sex chromosome evolution in nonmammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 14:634–641
- Shetty S, Griffin DK, Graves JAM (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res* 7:289–295
- Stanyon R, Rocchi M, Capozzi O, Roberto R, Misceo D, Ventura M, Cardone MF, Bigoni F, Archidiacono N (2008) Primate chromosome evolution: Ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. *Chromosome Res* 16:17–39
- Steinemann S, Steinemann M (2005) Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* 110:134–143
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718–725
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JP (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Res* 17:11–18
- Wang X, Zhang Q, Ren J, Jiang Z, Wang C, Zhuang W, Zhai T (2009) The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture* 297:78–84
- Woram RA, McGowan C, Stout JA, Gharbi K, Ferguson MM, Hoyheim B et al (2004) A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome* 47:304–315
- Yang F, Graphodatsky AS (2009) Animal probes and ZOO-fish. In: Liehr T (ed) Fluorescence in situ hybridization (FISH)—application guide. Springer, Berlin, pp 323–346
- Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP (2009) Generation of paint probes by flow-sorted and microdissected chromosomes. In: Liehr T (ed) Fluorescence in situ hybridization (FISH)—application guide. Springer, Berlin, pp 35–52