



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

Cassia Fernanda Yano

“Estudos evolutivos no gênero *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae) com enfoque na diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW”

Tese de Doutorado

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

SÃO CARLOS, 2016

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

Cassia Fernanda Yano

“Estudos evolutivos no gênero *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae) com enfoque na diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW”

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 Doutora em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Genética e Evolução

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

SÃO CARLOS, 2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Y24e Yano, Cassia Fernanda
Estudos evolutivos no gênero *Triportheus*
(Characiformes, Triportheidae) com enfoque na
diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW
/ Cassia Fernanda Yano. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
154 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Cromossomos sexuais . 2. DNAs repetitivos. 3.
Hibridização genômica comparativa.. 4. Pintura
cromossômica. 5. Microdissecção . I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Cassia Fernanda Yano, realizada em 24/10/2016:

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi
UFSCar

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
UEPG

Prof. Dr. Fausto Foresti
UNESP

Prof. Dr. Paulo Cesar Venere
UFMT

Identificação Bibliográfica

Nome: **Cassia Fernanda Yano**

Título da Tese: **Estudos evolutivos no gênero *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae) com enfoque na diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW.**

Título da tese em Inglês: **Evolutionary studies in the *Triportheus* genus (Characiformes, Triportheidae) focusing in the differentiation of the ZZ/ZW sex chromosome system.**

Programa de estudo: **Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

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

Ano de início: **2012**

Ano da defesa: **2016**

Período Sanduíche: **Março-Dezembro/2014 - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), (Processo. nº BEX 11744/13-8).**

Local: **Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Alemanha. Institut für Humangenetik**

Supervisor: **Dr. Thomas Liehr**

Palavras-chave: **cromossomos sexuais, pintura cromossômica, microdissecção, DNAs repetitivos, hibridização genômica comparativa.**

Keywords: **sex chromosomes, chromosome painting, microdissection, repetitive DNAs, comparative genomic hybridization.**

*Dedico este trabalho especialmente a todos os
professores que acreditaram em meu potencial e me
incentivaram a chegar até aqui.*

*“Procure ser um homem de valor em vez de ser
um homem de sucesso. O sucesso é consequência..”*

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço todas as pessoas e as 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 Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pelo suporte e pela infra-estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, meu orientador. Um professor e pesquisador de excelência e ética, e tem sido e sempre será uma fonte de inspiração para minha trajetória acadêmica. Agradeço pelo imenso aprendizado adquirido ao desenvolver este trabalho, pela confiança em mim depositada, e pelas oportunidades que tive, as quais foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Gostaria de salientar que o Sr. foi um excelente orientador e por isso muitíssimo obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi, meu coorientador. Um professor e pesquisador extremamente competente e sempre disposto a incentivar e a proporcionar as melhores oportunidades aos seus alunos. Agradeço pelo imenso aprendizado durante esses anos, pelo meu crescimento profissional, por sempre confiar em meu potencial e por proporcionar valiosas oportunidades para que eu pudesse realizar este trabalho da melhor maneira possível.

Ao Prof. Orlando Moreira-Filho pelo convite feito em minha defesa de mestrado para iniciar o doutorado na UFSCar, o que traduziu depois em várias oportunidades para que eu pudesse crescer profissionalmente. Agradeço pelos conselhos em relação à minha vida profissional e pelas várias conversas descontraídas. Saiba que o admiro muito como pesquisador atuante que é, pelo professor dedicado e por enxergar sempre o melhor em seus alunos.

Ao Dr. Thomas Liehr (Universität Jena, Alemanha), por ter aberto as portas de seu laboratório em Jena para que eu realizasse meu doutorado sanduíche e adquirisse valiosa experiência em diversas técnicas moleculares e contato com diversos pesquisadores renomados. Igualmente agradeço aos Drs. Pétr Ráb (Academy of the Sciences of the Czech Republic), Laureana Rebordinos González (Universidad de Cádiz, Puerto Real, Espanha), por terem me recebido em seus laboratórios, pelas discussões, esclarecimentos e avanços que proporcionaram na minha formação científica.

Aos pesquisadores Drs. Nadezda Kosyakova (Universität Jena, Alemanha), Alexandr Sember (Academy of the Sciences of the Czech Republic), Silvia Portela-Bens e Manuel Alejandro Merlo

(Universidad de Cádiz, Puerto Real, Espanha), pela amizade, pelo imenso aprendizado e pelo auxílio nos experimentos realizados em conjunto. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira (UNESP), que sempre esteve à disposição de contribuir com este trabalho. Igualmente agradeço aos Profs. Drs. Paulo Venere (UFMT), Waldo Pinheiro Troy (Unemat), pelas contribuições nas coletas, as quais foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos meus queridos pais Santos e Sueli, por serem os exemplos que são em minha vida, por terem me educado da melhor forma possível e por exigirem sempre o melhor de mim. A vocês, minha eterna gratidão. À minha irmã Carina, por ser uma pessoa muito especial em minha vida, por todos os momentos divertidos, da cumplicidade de irmãs, pelo carinho e atenção que sempre tive em sua agradável companhia.

Ao meu namorado, pelo amor, carinho e compreensão nesta jornada. Obrigada por fazer parte da minha vida, pelo companheirismo sem igual e por sempre alimentar nosso amor pela Ciência.

Aos grandes amigos que fiz durante estadia no exterior, Eyad, Xiaobo, Sudeshna e Katharina. Obrigada pelo carinho, pelo apoio e ajuda em todos os momentos. A vocês, minha eterna gratidão!

À Vanessa, Terumi, Suély, Eidi e Aline pela inestimável amizade e por me apoiarem sempre. Amizade assim é o melhor tesouro que podemos ter.

Aos amigos que continuam ou passaram pelo Laboratório de Citogenética de Peixes da UFSCar, Terumi, Felipe, Ezequiel, Renata, Natália, TaaPu, Nuntiya, Josiani, Juliana, Nicolás, Marcelo e Geovana, agradeço pelos diversos auxílios e pela troca de experiências nestes anos.

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 auxílios na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida e pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), (Processo. nº BEX 11744/13-8), por todos os auxílios financeiros destinados a minha estadia no exterior.

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

RESUMO

1 O gênero *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae) apresenta um cenário incomum entre os
2 peixes, com a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW para todas as espécies já
3 investigadas. O cromossomo Z é metacêntrico e o maior do cariótipo, permanecendo
4 morfologicamente conservado em todas as espécies. Contrariamente, o cromossomo W apresenta
5 formas variáveis e tamanhos distintos entre as espécies, podendo apresentar tamanho quase idêntico
6 ao do cromossomo Z até acentuadamente reduzido em relação a ele, com um nítido acúmulo de
7 heterocromatina associado ao processo de diferenciação desse cromossomo. Este cenário em
8 *Triportheus*, juntamente com a filogenia já bem definida para este grupo, possibilitou uma
9 oportunidade excelente para a investigação de eventos evolutivos associados aos cromossomos
10 sexuais, aspecto este que vem despertando interesse crescente na biologia evolutiva nos últimos
11 anos. Assim sendo, a proposta deste estudo foi investigar a origem e a diferenciação dos
12 cromossomos sexuais em oito espécies de *Triportheus*, usando ferramentas diversificadas da
13 citogenética convencional e molecular, como o bandamento-C, mapeamento cromossômico de
14 DNAr e diversas outras classes de DNAs repetitivos, hibridização genômica comparativa (CGH),
15 microdissecção dos cromossomos Z e W e pintura cromossômica total (WCP). O acúmulo
16 preferencial de várias sequências de DNAs repetitivos no cromossomo W possibilitou destacar
17 a participação preponderante deste componente do genoma na diferenciação do cromossomo sexo-
18 específico. Notadamente, o acúmulo diferencial de microssatélites colocou em evidência processos
19 evolutivos específicos do cromossomo W entre as espécies, bem como um padrão acumulativo que
20 não apresenta correlação direta com a ancestralidade deste cromossomo. O mapeamento
21 cromossômico do DNAr 5S e 18S e do DNAsn U2 evidenciou um cenário bastante particular na
22 distribuição dessas famílias multigênicas em *Triportheus*. A variabilidade em relação ao número de
23 sítios de DNAr nos autossomos, assim como o “status” sintênico dessas três famílias, evidenciaram
24 o dinamismo evolutivo desses genes mesmo entre espécies proximamente relacionadas. Além
25 disso, a ocorrência de DNAsn U2 no cromossomo W de *T. albus* evidenciou uma novidade
26 evolutiva, enquanto a ocorrência de DNAr 18S na região Wq terminal confirmou uma condição
27 conservada no gênero, assim como uma peculiaridade do processo evolutivo do cromossomo W,
28 visto que todas as espécies analisadas até o momento são portadoras dessas sequências. O emprego
29 de WCP, e principalmente de CGH, possibilitou demonstrar a localização de sequências que são
30 compartilhadas pelos cromossomos Z e W, bem como de sequências que são exclusivas de cada um
31 deles. Assim, a região Wq terminal se destacou por apresentar uma grande concentração de
32 sequências específicas de fêmeas, em coincidência com a localização do cluster de DNAr 18S,
33 possibilitando inferências sobre a origem destes cístrons no cromossomo sexo-específico. Nossos
34 dados também demonstraram que o sistema ZZ/ZW teve, de fato, uma origem comum em
35 *Triportheus*, considerando as homologias encontradas nos mapeamentos cromossômicos com
36 sondas dos cromossomos sexuais Z e W. *Triportheus auritus* é a espécie representante direta da
37 primeira linhagem a se diferenciar no gênero e experimentos de WCP, utilizando a sonda do
38 cromossomo Z desta espécie, mostrou que este cromossomo se encontra notavelmente conservado
39 em todas as espécies investigadas. Por outro lado, o cromossomo W apresentou padrões variáveis
40 de homologia entre as espécies, destacando divergências moleculares diferencialmente moldadas ao
41 longo da sua história evolutiva. Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo

- 1 possibilitaram atestar a origem comum do sistema ZZ/ZW em *Tripurtheus*, bem como avaliar
- 2 divergências e similaridades genômicas intra- e interespecíficas quanto ao par sexual, obtendo-se
- 3 avanços significativos no conhecimento da origem e diferenciação dos cromossomos sexuais entre
- 4 os vertebrados inferiores.

ABSTRACT

1 *Triportheus* genus (Characiformes, Triportheidae) presents a particular scenario in fishes, with a
2 ZZ/ZW sex chromosomes system for all species until now investigated. The Z chromosome is
3 metacentric and the largest one of the karyotype, remaining morphologically conserved in all
4 species. In contrast, the W chromosome differs in shape and size among species, from almost
5 identical to markedly reduced in size in relation to the Z, with a clear heterochromatin accumulation
6 associated with its differentiation process. This scenario in *Triportheus*, along with a well defined
7 phylogeny for this group, provided an excellent opportunity to investigate the evolutionary events
8 associated with the sex chromosomes differentiation, a matter of increasing interest to evolutionary
9 biology in recent years. Therefore, the purpose of this study was to investigate the origin and
10 differentiation of sex chromosomes in eight *Triportheus* species, using diverse conventional and
11 molecular cytogenetics tools, such as C-banding, chromosomal mapping of rDNAs and several
12 other repetitive DNA sequences, comparative genomic hybridization (CGH), microdissection of Z
13 and W chromosomes and whole chromosome painting (WCP). The preferential accumulation of
14 repetitive DNAs on the W chromosome highlighted the predominant participation of these
15 sequences in the differentiation of this chromosome. Notably, the differential accumulation of
16 microsatellites, and a hybridization pattern with no direct correlation to the ancestry of the W
17 chromosome, put in evidence the particular evolutionary processes that shaped the sex-specific
18 chromosome among species. The chromosomal mapping of 5S and 18S rDNAs and U2 DNAsn
19 highlighted a very particular scenario in the distribution of these multigene families in *Triportheus*.
20 Indeed, the variability in number of the rDNA sites on the autosomes, as well as the syntenic
21 "status" of these three multigene families, showed their intense dynamism in the karyotype
22 evolution, revealing a much more complex organization of these genes than previously supposed for
23 closely related species. In addition, the occurrence of U2 DNAsn on the W chromosome of *T. albus*
24 appears as an evolutionary novelty, while the occurrence of 18S rDNA in the Wq terminal region of
25 all species pointed to a conserved condition for the genus, as well as a peculiarity in the
26 evolutionary process of the W chromosome. Noteworthy, the use of WCP, and especially CGH
27 experiments, put in evidence sequences which are shared by both Z and W chromosomes and
28 sequences that are unique to each one. Thus, the Wq terminal region stood out with a high
29 concentration of female specific sequences, in coincidence with the location of the 18S rDNA
30 genes, allowing inferences about the origin of these cistrons on the sex-specific chromosome. Our
31 data also showed that the ZZ/ZW system had, in fact, a common origin in *Triportheus*, considering
32 the homologies found in chromosomal paintings using the Z and W probes. *Triportheus auritus* is
33 the direct representative of the first lineage to differentiate in the genus and WCP experiments,
34 using the Z chromosome probe of this species, have showed how this chromosome is notably
35 conserved in all investigated species. On the other hand, the W chromosome showed variable
36 patterns of homology among species, highlighting the molecular divergence emerged along its
37 evolutionary history. In conclusion, the results obtained in this study allowed to certify the common
38 origin of the ZZ/ZW sex system in *Triportheus* and to evaluate the intra- and inter-specific genomic
39 homologies and differences between the sex pair, resulting in significant advances in the knowledge
40 of the origin and differentiation of the sex chromosomes among lower vertebrates.

LISTA DE FIGURAS

Materiais e Métodos

- Figura 1.** Mapa do Brasil evidenciando a procedência dos espécimes de oito espécies de *Triportheus* utilizados no presente estudo. (A) Rio Araguaia, MT, Bacia Araguaia-Tocantins (S15° 53' 46.16" - W52° 15' 20.58"); (B) Lago Inhumas, MG, Bacia Rio São Francisco (S20°12'10,5"- W 45°52'25.07"); (C) Rio Paraguai, MT, Bacia do rio Paraguai *T. nematurus* e *T. aff. rotundatus* (S15°05'45.53" - W 57°11'02.53") / *T. pantanensis* (S16°04'30.78" - W 57°42'09.63"); (D) Rio Piracicaba, SP, Bacia do Rio Tietê (S22°37'08.6" - W 48°08'57.1")..... 33

CAPÍTULO 1

- Figure 1.** Karyotypes of *Triportheus trifurcatus* female arranged from Giemsa-stained (above) and C-banded chromosomes (below). The ZW sex chromosomes are boxed. Note the conspicuous C-positive heterochromatin accumulated on the W chromosome. Bar=5 μ m..... 64
- Figure 2.** Mitotic metaphase chromosomes of *Triportheus trifurcatus* female 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). Letters mark the Z and W chromosomes. Bar=5 μ m..... 65
- Figure 3.** Mitotic metaphase chromosomes of *Triportheus trifurcatus* male 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). Letters mark the Z chromosomes. Bar=5 μ m..... 66
- Figure 4.** Metaphase plates of *Triportheus trifurcatus* probed with *Rex1*, *Rex3*, *Rex6*, and telomeric (TTAGGG)_n sequences. These sequences show the general distribution pattern of these repeats on the chromosomes. Letters mark the Z and W chromosomes. Bar=5 μ m..... 67
- Figure 5.** C-banding and the repetitive DNA distribution between the Z and W chromosomes of *Triportheus trifurcatus*. Note the preferential accumulation of heterochromatin and some repeats on the W chromosomes..... 68

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Figure 1. Female karyotypes of <i>Triporthesus</i> aff. <i>rotundatus</i> and <i>T. pantanensis</i> arranged from Giemsa-stained (above) and C-banded chromosomes (below). The ZW sex chromosomes are boxed. Note the conspicuous C positive heterochromatin accumulated on the W chromosomes. Bar = 5 μ m. | 83 |
| Figure 2. Distribution of microsatellites on the Z and W chromosomes of six <i>Triporthesus</i> species. Note the preferential accumulation of some repeats on the W chromosomes. | 84 |
| Figure 3. C-banding and distribution of repetitive DNA sequences on the Z and W chromosomes of six <i>Triporthesus</i> species. Note the occurrence of 18S rDNA gene and the preferential accumulation of heterochromatin on the W chromosomes. | 85 |
| Supplementary 1. Microsatellite distribution in <i>T. albus</i> metaphases. | 86 |
| Supplementary 2. Microsatellite distribution in <i>T. guentheri</i> metaphases. | 86 |
| Supplementary 3. Microsatellite distribution in <i>T. nematurus</i> metaphases. | 87 |
| Supplementary 4. Microsatellite distribution in <i>T. pantanensis</i> metaphases. | 87 |
| Supplementary 5. Microsatellite distribution in <i>T. aff. rotundatus</i> metaphases. | 88 |
| Supplementary 6. Microsatellite distribution in <i>T. signatus</i> metaphases. | 88 |
| Supplementary 7. Metaphase plates of all <i>Triporthesus</i> species analyzed with <i>Rex1</i> and <i>Rex6</i> probes. | 89 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Karyotypes of eight <i>Triporthesus</i> species arranged from chromosomes after three color FISH experiment. FISH showing the distribution of 18S rDNA (yellow), 5S rDNA (green) and U2 snDNA (red) sequences on the chromosomes. The chromosomes bearing syntenic sites are boxed and each probe is displayed separately. The Z and W chromosomes are highlighted. Bar = 5 μ m. | 109 |
| Figure 2. Partial schematic idiograms showing the chromosomal pairs bearing the multigene families analyzed in eight <i>Triporthesus</i> species analyzed. 18S rDNA (yellow), 5S rDNA (green) and U2 snDNAs (red). Note the number of loci and the variable syntenic organization among them. The sex chromosomes are boxed. | 110 |

Figure 3. Analysis of the syntenic configuration of the multigene families on the chromosome-pair No. 3 of *Triporthesus signatus*. Metaphase plate of *T. signatus* and the pair No. 3 in detail; note the longitudinal distribution of the 5S, 18S rDNAs and the U2 snDNA along this chromosome pair (a). Bar = 5 µm. 111

CAPÍTULO 4

Figure 1. Adapted phylogenetic tree for the *Triporthesus* genus, based on the phylogenetic data generated by Mariguela et al. (2016), with the respective C-banded Z and W chromosomes evidencing the divergence in size of the later. Besides the species analyzed in this study, *T. venezuelensis* and *T. angulatus* (indicated in asterisks) were also included. Note that *T. auritus*, which corresponds to a sister group to all *Triporthesus* species, carries the larger W chromosome, while *T. albus* has the smaller one compared with its congeneric species..... 128

Figure 2. CGH on female metaphase of *T. signatus*, with emphasis on the Z and W chromosomes. The superposition of male and female gDNA probes highlights chromosomal regions sharing male and female sequences and the prevalence of female or male specific sequences. DAPI staining (a). Hybridization with gDNA female probe (b). Hybridization with gDNA male probe (c). Superposition of female and male gDNA probes (d). In (e) the sex chromosomes after the superposition of female and male gDNA probes are highlighted in enlarged forms, together with schematic diagrams summarizing the results, evidencing the accumulation of female-specific sequences in the terminal region of the Wq. The chromosome pair 3 and the W chromosome harboring 18S and 5S rDNA are boxed. Bar = 5 µm 129

Figure 3. Cross species chromosome painting using W-chromosome (green), Z-chromosome (red) probes, both obtained from *T. auritus*, together with an 18S rDNA probe (yellow) in a three color FISH experiment. The sex chromosomes are highlighted in boxes. Note the location of 18S rDNA sequences on the telomeric Wq. The additional 18S rDNA sites located on autosomes are not shown. Bar = 5 µm..... 130

Figure 4. Hybridization patterns on the sex chromosomes of *Triporthesus* species using Z and W chromosome probes (a). Note that the sex chromosomes showed evident FISH signals with both Z and W probes, although with a variable pattern among species. In (b), the diagrams explaining the observed hybridization patterns, taking account the use of Cot11-DNA from a female of *T. auritus* as a competitor. The W-

specific regions (terminal part of the q arm) were thus blocked and did not hybridize. Accordingly, on the euchromatic Z chromosome, only the centromeric highly repetitive region and the ancestral homologous region (terminal part of the p arm) were painted with the W probe. In (c) ZW chromosomes after CGH experiments performed in *T. signatus* are highlighted. 131

Figure 5. Schematic diagram summarizing the proposed chromosome rearrangements leading to the evolution of sex chromosomes in *Triportheus* species. Fission and translocation event involving the p arm of an ancestral chromosome 3 occurred within an 18S rDNA cluster onto the W chromosome, or vice versa, in a common ancestor (a). Subsequently, such 18S rDNA cistron was amplified in W chromosome (b). Finally, while the Z kept morphologically conserved, the W had extensive morphological and size variations, due to rDNA expansion, heterochromatinization and repetitive DNA accumulation, in which the degree of degeneration and the differentiation later evolved independently in each *Triportheus* species (c). W₁ = *T. auritus*; W₂ = *T. guentheri*; W₃ = *T. signatus*; W₄ = *T. rotundatus*; W₅ = *T. nematurus*; 6 = *T. pantanensis*; W₇ = *T. trifurcatus*; W₈ = *T. venezuelensis* (data from Nirchio et al. 2007); W₉ = *T. angulatus* (data from Diniz et al. 2009); W₁₀ = *T. albus*. 132

LISTA DE TABELAS

Introdução

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Espécies de <i>Triportheus</i> investigadas, com as respectivas bacias hidrográficas onde foram coletadas, número dos indivíduos amostrados e registro de depósito em museu..... | 32 |
|---|----|

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Table 1. Brazilian collection sites of the <i>Triportheus</i> species analyzed, with the sample sizes..... | 82 |
|---|----|

Capítulo 3

| | |
|---|-----|
| Table 1. Brazilian collection sites of the <i>Triportheus</i> species and number of individuals in this study..... | 105 |
| Table 2. Cytogenetic data of U2 snRNA genes in fish chromosomes..... | 106 |

Capítulo 4

| | |
|---|-----|
| Table 1. Brazilian collection sites of the <i>Triportheus</i> species and number of individuals in this study..... | 127 |
|---|-----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| Resumo | i |
| Abstract | iii |
| Lista de Figuras | iv |
| Lista de Tabelas | viii |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1. Considerações sobre os cromossomos sexuais em vertebrados | 2 |
| 1.2. Diversidade dos cromossomos sexuais em peixes | 5 |
| 1.3. Os DNAs repetitivos e os cromossomos sexuais. As famílias multigênicas. | 9 |
| 1.4. Os DNAs repetitivos e os cromossomos sexuais. Os microssatélites e os elementos transponíveis. | 13 |
| 1.5. Pintura cromossômica, hibridização genômica comparativa e a investigação de cromossomos sexuais. | 17 |
| 1.6. O gênero <i>Triportheus</i> e suas relações filogenéticas. | 21 |
| 1.7. <i>Triportheus</i> como modelo para a investigação evolutiva dos cromossomos sexuais entre os vertebrados inferiores | 22 |
| 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS | 27 |
| Objetivos específicos | 28 |
| A) <i>Investigação da origem comum do sistema ZZ/ZW em Triportheus</i> | 28 |
| B) <i>Investigação da conservação x diferenciação genômica dos cromossomos Z e W de Triportheus</i> | 29 |
| C) <i>Prospecção de regiões sexo-específicas e/ou compartilhadas entre os cromossomos Z e W de Triportheus</i> | 29 |
| D) <i>Investigação do padrão de distribuição de famílias multigênicas em Triportheus</i> | 30 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 Amostragem do material biológico | 32 |
| 3.2 Preparação dos cromossomos mitóticos | 34 |
| 3.3 Preparação das lâminas | 35 |
| 3.4 Detecção da heterocromatina C-positiva (bandamento C) | 35 |
| 3.5 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH). Obtenção das sondas. | 36 |
| 3.5.1 <i>Família multigênica de DNAr 18S</i> | 36 |
| 3.5.2 <i>Famílias multigênicas de DNAsn U2 e DNAr 5S</i> | 36 |
| 3.5.3 <i>Retroelementos Rex</i> | 39 |
| 3.5.4 <i>Oligonucleotídeos enriquecidos com microssatélites</i> | 39 |
| 3.5.5 <i>Microdissecção cromossômica total</i> | 40 |
| 3.5.6 <i>Fração Cot-1 DNA</i> | 42 |
| 3.6 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH). Marcação das sondas. | 43 |
| 3.6.1 <i>Sondas de DNAs repetitivos</i> | 43 |
| 3.6.2 <i>Sondas para os experimentos de CGH</i> | 43 |

| | |
|--|------------|
| 3.6.3 Sondas de cromossomos totais | 44 |
| 3.7 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH). Preparação das lâminas, hibridização e detecção do sinal | 45 |
| 3.7.1 Three-color-FISH (DNAr 5S, 18S e DNAsn U2) / Microsatélites / Rex | 45 |
| 3.7.2 Three-color-FISH para experimentos de pintura cromossômica total (WCP)..... | 46 |
| 3.7.3 FISH para CGH | 47 |
| 3.8 Análises cariotípicas | 48 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 50 |
| Capítulo 1 | 51 |
| Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in <i>Triportheus trifurcatus</i> (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes | 51 |
| Capítulo 2 | 69 |
| W chromosome dynamics in <i>Triportheus</i> species (Characiformes, Triportheidae) - an ongoing process narrated by repetitive sequences | 69 |
| Capítulo 3 | 90 |
| Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 snDNAs in <i>Triportheus</i> (Characiformes, Triportheidae): high variability and particular syntenic organization..... | 90 |
| Capítulo 4 | 112 |
| Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus <i>Triportheus</i> (Characiformes, Triportheidae)..... | 112 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 134 |
| 6. REFERÊNCIAS | 139 |



Introdução

1 1. INTRODUÇÃO

2 1.1. Considerações sobre os cromossomos sexuais em vertebrados

3 Os cromossomos sexuais representam um dos constituintes mais dinâmicos do genoma,
4 compreendendo particularidades tanto em morfologia, conteúdo gênico e mecanismos
5 evolutivos (Ohno, 1967; Charlesworth, 1991). Cromossomos sexuais morfologicamente
6 diferenciados estão presentes em muitas espécies de eucariotos, podendo constituir excelentes
7 modelos para estudos evolutivos. Em diversos grupos taxonômicos, a evolução dos
8 cromossomos sexuais deu-se de forma independente, sendo evidenciada tanto a heterogametia
9 masculina - XX/XY- como a feminina - ZZ/ZW, e abrangendo sistemas sexuais variados, desde
10 simples até múltiplos (Graves, 2006).

11 O processo de diferenciação dos cromossomos sexuais inicia-se a partir de um par
12 autossômico, quando um locus de determinação do sexo (LDS) é adquirido por um dos
13 homólogos (Bull, 1983; Charlesworth, 1991). Em geral, a interação do LDS com outros genes
14 sexualmente antagonistas favorece que a supressão da recombinação seja facilitada entre
15 cromossomas sexuais nascentes (Bachtrog, 2006). Estudos em mamíferos sugerem que a
16 redução da recombinação é favorecida por rearranjos cromossômicos, como inversões nas
17 regiões sexo-determinantes (Lahn & Page, 1999; Ross et al. 2005). Uma inversão
18 corresponderia a um “estrato”, ou seja, uma região dos cromossomos sexuais em que a
19 recombinação foi suprimida em algum momento do seu processo evolutivo. Estes “estratos”
20 foram também encontrados no cromossomo Z das aves (Handley et al. 2004) e no cromossomo
21 X do vegetal *Silene latifolia* (Bergero et al. 2007). Conseqüentemente, a perda parcial da
22 recombinação em regiões específicas do cromossomo sexo-específico pode suportar a aquisição

1 de mutações adicionais, a amplificação de sequências de DNA repetitivo e o acúmulo de
2 heterocromatina no cromossomo, favorecendo assim a sua contínua diferenciação morfológica
3 (Charlesworth et al. 2005; Bachtrog, 2006). Assim sendo, tais processos, incluindo o acúmulo
4 de mutações deletérias, têm sido associados à degeneração do cromossomo Y, enquanto que o
5 cromossomo X mantém a maioria de seus genes originais (Charlesworth & Charlesworth,
6 1997; Bachtrog, 2006).

7 Em um contexto geral, a exemplo do que ocorre em humanos, em outros mamíferos e em
8 *Drosophila*, o cromossomo Y é frequentemente heterocromático, notavelmente menor do que o
9 cromossomo X, tendo perdido a maior parte de seus genes ancestrais, mas mantendo genes com
10 funções específicas do sexo (Bachtrog, 2013). Apesar de maior parte do cromossomo Y perder
11 a homologia com o X, algumas regiões de recombinação têm sido identificadas entre esses dois
12 cromossomos em humanos, denominadas regiões pseudoautossômicas (PARs) (Mangs &
13 Morris, 2007). Atualmente são descritas três regiões pequenas de homologia (PAR1, PAR2 e
14 PAR3), permitindo assim o emparelhamento dos cromossomos X e Y durante a meiose
15 masculina (Mangs & Morris, 2007; Veerappa et al. 2013).

16 A heterogametia feminina é relativamente comum em vertebrados inferiores, sendo
17 conservada em aves (Ellegren, 2000) e serpentes (Ferguson-Smith, 2007), e também presente
18 em outros répteis, anfíbios e peixes (Artoni et al. 2001; Devlin & Nagahama, 2002; Kawai et al.
19 2007; Abramyan et al. 2009; Ezaz et al. 2009; Cioffi et al. 2012a). Assim como o Y, o
20 cromossomo W pode perder muitos dos seus genes funcionais devido à redução da
21 recombinação, com exceção de poucos loci contendo genes sexo-específicos (Zhou et al. 2014).
22 Este cromossomo também é geralmente heterocromático e majoritariamente composto de
23 sequências repetitivas (Itoh et al. 2008). Contudo, apesar dessas características em comum com

1 o cromossomo Y, o cromossomo W pode apresentar graus variáveis de diferenciação, desde
2 quase homomórficos até altamente heteromórficos em relação ao Z (Ohno, 1967; Shetty et al.
3 1999). Em aves carinatas, por exemplo, ele é altamente diferenciado e bem menor do que o
4 cromossomo Z, enquanto que nas aves primitivas ratitas os cromossomos Z e W são
5 praticamente indistinguíveis (Ansari et al. 1988; Shetty et al. 1999). Além disso, foi
6 demonstrado em algumas famílias de aves que o tamanho do cromossomo W pode mudar
7 rapidamente em uma curta escala de tempo, mesmo entre espécies proximamente relacionadas,
8 refletindo mecanismos evolutivos agindo em regiões codificantes e não codificantes deste
9 cromossomo (Rutkowska et al. 2012). Contrariamente, em relação ao cromossomo Z, vários
10 estudos têm evidenciado sua natureza notavelmente conservada entre diferentes táxons (Stiglec
11 et al. 2007), exibindo tamanho relativamente estável, como a exemplo das aves *Gallus gallus*
12 (75 Mbp) e *Taeniopygia guttata* (73 Mbp) (Rutkowska et al. 2012). Experimentos de
13 hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitiram evidenciar que o conteúdo gênico desse
14 cromossomo também é bastante conservado, mesmo entre aves de ordens diferentes (Itoh et al.
15 2006).

16 Em contraste com mamíferos e aves, alguns grupos de vertebrados apresentam maior
17 variabilidade quanto aos sistemas sexuais, como répteis e peixes. Em serpentes, apenas o
18 sistema ZZ/ZW se encontra presente e, em geral, assim como nas aves, o cromossomo Z é
19 conservado e o cromossomo W é variável entre os grupos, tanto em relação ao tamanho quanto
20 à posição do centrômero e padrão de heterocromatina (O'Meally et al. 2010). Por outro lado,
21 em lagartos, há uma alta diversidade de mecanismos de determinação sexual, incluindo
22 interações genético-ambientais, bem como diferentes sistemas de cromossomos sexuais (XY,
23 XXY, ZW, ZZW), demonstrando a labilidade deste processo neste grupo (Ezaz et al. 2009).

1 Além da diversidade de sistemas, a diferenciação dos cromossomos sexo-específicos também é
2 altamente variável, incluindo desde formas homomórficas até notavelmente menor em relação
3 ao cromossomo não sexo-específico, como alguns microcromossomos (Odierna et al. 2001;
4 Ezaz et al. 2009).

5 Considerando o grupo dos peixes, um cenário ainda mais diversificado tem sido verificado,
6 com cromossomos sexuais não diferenciados, em estágios iniciais de diferenciação ou
7 altamente diferenciados, incluindo diversos sistemas simples ou múltiplos, heterogametia
8 masculina e feminina (Thorgaard, 1983; Moreira-Filho et al. 1993; Bertollo et al. 2000; Phillips
9 & Ráb, 2001; Kondo et al. 2004; Vicari et al. 2008; Silva et al. 2009; Cioffi & Bertollo, 2010;
10 Yano et al. 2016).

11 **1.2. Diversidade dos cromossomos sexuais em peixes**

12 Os peixes representam um grupo bastante diversificado de espécies, oferecendo
13 modelos ímpares para estudos genéticos, taxonômicos e evolutivos, incluindo 64 ordens e
14 aproximadamente 33.900 espécies, das quais 4.000 foram descritas nos últimos dez anos
15 (Eschmeyer & Fong, 2016). Particularmente, a ictiofauna Neotropical de água doce é a mais
16 diversificada e rica em número de espécies do mundo, havendo mais de 5.700 espécies
17 descritas, representando aproximadamente 10% das espécies de vertebrados conhecidos (Lowe-
18 MacConnell, 1987; Vari & Malabarba, 1998; Albert et al. 2011a). Esta região estende-se por
19 mais de 17 milhões de quilômetros de florestas tropicais úmidas, pantanais e savanas (Albert et
20 al. 2011b), ao longo das águas continentais da América do Sul e Central, desde o Planalto
21 Central, no sul do México, até à Patagônia, no norte da Argentina (Albert et al. 2011b). Sua
22 pronunciada diversidade se deve a uma combinação de processos climatológicos, geológicos e

1 biogeográficos que vem se mantendo ao longo de um período de 10 milhões de anos,
2 principalmente através de uma longa história de isolamento biótico e geológico (Lundberg,
3 1998; Ribeiro, 2006; Albert et al. 2011b).

4 Concomitantemente com a diversidade de espécies, uma grande diversidade
5 cromossômica tem sido também constatada entre os peixes, como a presença de polimorfismos,
6 poliploidia, cromossomos supranumerários e diferentes sistemas de cromossomos sexuais,
7 (Oliveira et al. 2009). A determinação do sexo é bastante flexível, podendo ser dependente de
8 diferentes fatores, ambientais, comportamentais e genéticos, onde genes sexo-determinantes
9 podem estar localizados tanto em autossomos como em cromossomos sexuais heteromórficos
10 (Devlin & Nagahama, 2002). Embora a maioria das espécies de peixes não apresente
11 cromossomos sexuais diferenciados, tanto a heterogametia feminina (ZW) quanto
12 heterogametia masculina (XY) pode ocorrer, juntamente com uma ampla variedade de
13 sistemas, desde simples até múltiplos (Devlin & Nagahama, 2002; Cioffi et al. 2012a).

14 Contrastando com os mamíferos, a maioria dos cromossomos sexuais em peixes teve
15 origem de forma independente em diferentes linhagens (Volff et al. 2007; Cioffi et al. 2013).
16 Contudo, a redução em tamanho do cromossomo sexo-específico não é sempre observada entre
17 os peixes, considerando que, em certos casos, o cromossomo W pode apresentar tamanho maior
18 do que aquele apresentado pelo cromossomo Z (Koehler et al. 1997). Paralelamente, alguns
19 padrões característicos da diferenciação do cromossomo sexo-específico são conhecidos em
20 sistemas simples (Volff et al. 2007), o qual é frequentemente rico em heterocromatina (Koehler
21 et al. 1997; Artoni et al. 2001; Volff et al. 2007; Vicari et al. 2008) e em diferentes classes de
22 DNAs repetitivos (Nanda et al. 1990; Cioffi et al. 2011a; Splendore de Borba et al. 2013; Yano
23 et al. 2014a).

1 Entre as espécies de peixes Neotropicais já estudadas, aproximadamente 6% possui
2 cromossomos sexuais diferenciados (Oliveira et al. 2009). Em grande parte das famílias, casos
3 esporádicos de cromossomos sexuais foram evidenciados, como acontece em Heptapteridae
4 (Siluriformes), como os relatos em *Pimelodela boschmai* (Garcia & Almeida-Toledo, 2010).
5 Por outro lado, encontram-se também famílias onde a ocorrência de cromossomos sexuais é
6 frequente entre espécies de um mesmo ou de diferentes gêneros. Assim, por exemplo, na
7 família Anostomidae (Characiformes), várias espécies do gênero *Leporinus* apresentam o
8 sistema ZZ/ZW bem diferenciado. Contrastando com o padrão geralmente encontrado para o
9 cromossomo sexo-específico, em sete destas espécies o cromossomo W é notavelmente maior
10 do que o cromossomo Z, enquanto que em *Leporinus geminis*, os cromossomos sexuais
11 apresentam tamanhos similares (Venere et al. 2004; Poltronieri et al. 2014). Igualmente entre os
12 peixes Parodontidae (Characiformes), cinco espécies de Parodontidae apresentam o sistema
13 simples ZZ/ZW, com o cromossomo W também maior do que o Z, enquanto que *Apareiodon*
14 *affinis* apresenta o sistema múltiplo ZZ/ZW₁W₂, onde os dois cromossomos W são menores do
15 que o cromossomo Z (revisado em Bellafronte et al. 2011). A ocorrência frequente de
16 cromossomos sexuais ZZ/ZW também se verifica no gênero *Characidium* (Chrenuchidae,
17 Characiformes). Em 10 das espécies analisadas (*Characidium* cf. *gomesi*, *Characidium lauroi*,
18 *Characidium oiticicai*, *Characidium lanei*, *Characidium pterostictum*, *Characidium schubarti*,
19 *Characidium alipioi*, *Characidium* sp1, *Characidium* sp2 e *Characidium* sp3) se constata o
20 sistema ZZ/ZW, com exceção da espécie *Characidium* cf. *zebra*, que não apresenta
21 cromossomos sexuais diferenciados (Pansonato-Alves, 2010).

22 Além do fato de que, para um mesmo gênero, existirem espécies portando ou não
23 sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, como é o caso de *Leporinus*, *Apareiodon*,

1 *Parodon* e *Characidium*, um cenário ainda mais variável pode ser encontrado em outros
2 grupos. De fato, formas diversificadas de cromossomos sexuais podem ocorrer dentro de uma
3 mesma família, entre espécies intimamente relacionadas ou ainda entre populações de uma
4 mesma espécie, atestando o dinamismo evolutivo associado a estes cromossomos (Cioffi et al.
5 2012a). Tal labilidade confere excelentes condições para estudar os processos que regem a
6 evolução dos cromossomos sexuais entre os peixes. É o que se verifica, por exemplo, na família
7 Erythrinidae (Characiformes), a qual se caracteriza por uma ampla variação nos sistemas de
8 cromossomos sexuais, especificamente nos gêneros *Hoplias* e *Erythrinus* (Bertollo et al. 1983;
9 Bertollo et al. 2000; Born & Bertollo, 2000; Bertollo et al. 2004; Cioffi et al. 2011b; Cioffi et
10 al. 2013). Particularmente, *Hoplias malabaricus* se destaca por caracterizar um complexo de
11 espécies, composto por sete cariomorfos (Bertollo et al. 2000). Neste grupo são identificados
12 cariomorfos sem cromossomos sexuais diferenciados, com sistemas de cromossomos sexuais
13 simples e múltiplos já bem diferenciados, além de sistemas em fase inicial de diferenciação
14 (Bertollo et al. 1986; Bertollo et al. 2000; Santos et al. 2009; Cioffi & Bertollo, 2010).
15 Enquanto que os cariomorfos A e E não apresentam cromossomos sexuais diferenciados
16 (Bertollo et al. 2000), o cariomorfo B apresenta um evidente sistema de cromossomos sexuais
17 XX/XY (Born & Bertollo, 2000) e os cariomorfos C e F um sistema XX/XY em estágios
18 iniciais de diferenciação (Santos et al. 2009; Cioffi & Bertollo, 2010). Por sua vez, os
19 cariomorfos D e G caracterizam-se por diferentes sistemas de cromossomos sexuais múltiplos,
20 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e XX/XY_1Y_2 , respectivamente (Bertollo et al. 2000).

21 Casos similares também ocorrem na família Sternopygidae (Gymnotiformes), onde
22 *Eigenmannia virescens* apresenta tanto heterogametia feminina quanto masculina (Almeida-
23 Toledo et al. 2002). Assim, em populações do rio São Francisco, Ilha do Marajó e rio

1 Amazonas, ocorre o sistema ZZ/ZW, enquanto que em populações da bacia do alto Paraná,
2 verifica-se o sistema XX/XY (Almeida-Toledo et al. 2002) ou a ausência do mesmo (Sene,
3 2011). Além disso, um sistema de cromossomos sexuais múltiplos foi também descrito para os
4 espécimes de *Eigenmannia* sp. 2 ocorrentes no rio Tietê, tributário do alto rio Paraná (Almeida-
5 Toledo et al. 2000).

6 Esta diversidade dos sistemas de cromossomos sexuais em peixes neotropicais tem sido
7 associada com a distribuição geográfica das espécies, bem como eventos geológicos na
8 América do Sul (Moreira-Filho et al. 1980; Almeida-Toledo et al. 2000). A ocorrência de
9 distintos sistemas, mesmo entre espécies relacionadas, põe em evidência a origem independente
10 desses sistemas, conforme demonstrado por estudos de citogenética molecular (Henning et al.
11 2008; Cioffi et al. 2013). A maior probabilidade de fixação de rearranjos cromossômicos em
12 pequenas populações isoladas, e em espécies com pouca mobilidade (Rieseberg, 2001; Faria &
13 Navarro, 2010), também pode explicar a diversidade de sistemas sexuais em alguns grupos. De
14 fato, tal associação tem sido feita para *H. malabaricus*, considerando os vários cariomorfos e os
15 distintos estágios e sistemas de cromossomos sexuais presentes nesta espécie (Bertollo et al.
16 2000; Cioffi et al. 2012b; Oliveira et al. 2015).

17

18 **1.3. Os DNAs repetitivos e os cromossomos sexuais. As famílias multigênicas.**

19 As sequências de DNAs repetitivos têm sido amplamente investigadas em diferentes
20 táxons, contribuindo para uma melhor compreensão da complexidade do genoma, assim como
21 da genética evolutiva, especialmente no tocante à origem e diferenciação dos cromossomos
22 sexuais (Itoh et al. 2008; Cioffi et al. 2011a; Kejnovský et al. 2013). As diferentes classes de

1 DNAs repetitivos podem estar dispostas *in tandem* ou dispersas no genoma, com diferentes
2 níveis de repetitividade (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012).

3 As repetições *in tandem* incluem algumas famílias multigênicas tais como os DNAs
4 ribossomais (DNAr), os genes que codificam os pequenos RNAs (DNAsn) e as histonas (Walsh
5 & Stephan, 2001), bem como as sequências denominadas satélites, minissatélites e
6 microssatélites, que são classificadas conforme o número de repetições de pares de bases que
7 apresentam (Jurka et al. 2003). As sequências satélites são constituídas de unidades de
8 aproximadamente 200 pb, enquanto que as sequências minissatélites geralmente possuem
9 número igual ou maior a 9 pb (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012) e os microssatélites 1-6
10 pb (Tóth et al. 2000). No que se refere às sequências de DNAs repetitivos dispersas no genoma,
11 os elementos transponíveis (TEs) apresentam aproximadamente 20-30 kb em tamanho, estando
12 inseridas aleatoriamente no genoma (Jurka et al. 2007). Os TEs podem ser agrupados em duas
13 classes principais, considerando os mecanismos de transposição que apresentam: os
14 retrotransposons, que são movidos via RNAs intermediários utilizando a enzima transcriptase
15 reversa, e os transposons, que se deslocam utilizando o mecanismo “corta e cola”, catalizado
16 pelas enzimas transposases (Jurka et al. 2007).

17 As famílias multigênicas compreendem um grupo de genes que estão repetidos *in*
18 *tandem*, exibindo uma grande diversidade em número de unidades bem como na organização
19 genômica nos diferentes táxons (Walsh & Stephan, 2001). Estas sequências são produzidas
20 quando um único gene é copiado várias vezes por eventos de duplicação (López-Flores &
21 Garrido-Ramos, 2012). Entre elas, os genes que codificam os RNAr tem sido amplamente
22 utilizados como marcadores cromossômicos em várias espécies de peixes (Hatanaka & Galetti,
23 2004; Cioffi et al. 2010a; Merlo et al. 2010; Gornung, 2013; García-Souto et al. 2015). O

1 DNAr desempenha um importante papel na síntese de proteínas, considerando que o DNAr 45S
2 compreende os genes que codificam os RNAr 18S, 5.8S e 28S, bem como dois espaçadores
3 transcritos externos (ETS), dois espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e um espaçador
4 não-transcrito (NTS) (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Os RNAs 18S, 5.8S e 28S são
5 processados e parcialmente organizados no nucléolo para formar as subunidades do ribossomo.
6 Por sua vez, o DNAr 5S é composto de unidades de aproximadamente 120 pares de bases,
7 intercaladas por um NTS (Martins & Galetti Jr, 1999) e codifica o RNAr 5S que migra para o
8 nucléolo e se junta ao RNAr 5,8S e 28S.

9 Os DNAs ribossomais têm se caracterizado como ferramentas úteis para elucidar os
10 processos envolvidos na evolução cromossômica de diferentes grupos de peixes (Gornung,
11 2013; Rebordinos et al. 2013). Dados de revisão sobre a distribuição do DNAr 45S
12 evidenciaram que aproximadamente 72% de 330 espécies de peixes já analisadas,
13 compreendendo 22 ordens, apresentam apenas um par cromossômico portador desses sítios,
14 localizados na região terminal em 87% dos casos (Gornung, 2013). Contrariamente, o DNAr 5S
15 tem sido mapeado em posição intersticial na maioria das espécies estudadas (Martins & Wasko,
16 2004), e o cenário mais comum tem sido a ocorrência de ambos os genes ribossomais em pares
17 cromossômicos diferentes (Martins & Galetti, 2001). Contudo, apesar deste padrão frequente,
18 um número crescente de estudos tem revelado que tanto o número quanto a localização dos
19 sítios de DNAr 18S e 5S podem ser variáveis, apresentando-se também em configuração
20 sintênica em diversas espécies (Diniz et al. 2009; Calado et al. 2014; Cioffi et al. 2015; Barros
21 et al. 2016; Getlekha et al. 2016; Maneechot et al. 2016).

22 Adicionalmente, a ocorrência de RONS ativas (Ag-RONS), bem como de sítios DNAr
23 18S, tem sido verificada nos cromossomos sexuais em diferentes táxons e, na maioria dos

1 casos, em ambos os cromossomos como no caso de algumas espécies de peixes *Characidium*
2 (Scacchetti et al. 2015), no sapo-cururu *Bufo marinus* (Abramyan et al. 2009), na tartaruga
3 *Pelodiscus sinensis* (Kawai et al. 2007) e na serpente *Notechis scutatus* (O’Meally et al. 2010).
4 Em cangurus e “wallabies” da família Macropodidae, Ag-NORs têm sido descritas no
5 cromossomo X e em algumas espécies também no cromossomo Y (Hayman & Martin, 1974).
6 Contudo, em experimentos de FISH, sequências de DNAs ribossomais foram mapeadas apenas
7 no cromossomo X em uma espécie de wallaby (Toder et al. 1997).

8 Tem sido demonstrado que o crossing-over desigual tem uma ocorrência mais frequente
9 nos sítios de DNAs ribossomais comparado com outros loci, como demonstrado em *Salmonella*
10 *typhimurium* (Anderson & Roth, 1981). Além disso, tem sido verificado que a natureza
11 repetitiva das RONS tem levado a uma massiva amplificação dessas sequências no cromossomo
12 W da tartaruga *P. sinensis*, contribuindo igualmente para a diferenciação deste cromossomo
13 (Kawai et al. 2007). Paralelamente, têm sido também atribuído um possível significado
14 funcional para a ocorrência de RONS ativas em cromossomos sexuais (O’Meally et al. 2010),
15 ou seja, sequências de DNAr 18S beneficiariam as fêmeas, como demonstrado em rãs do
16 gênero *Xenopus*, já que a taxa de produção de RNAs ribossomais é altamente elevada durante a
17 oogênese, considerando que um grande número de ribossomos são necessários nos períodos
18 iniciais do desenvolvimento do zigoto (Gilbert, 2000).

19 Diferentemente dos DNAs ribossomais, os genes de RNAsn têm sido pouco
20 investigados na citogenética de peixes (Merlo et al. 2012a). Os RNAsn são um subconjunto de
21 pequenos RNAs que estão envolvidos no processamento do RNAm, uma vez que são
22 componentes de um complexo RNA-pequenas proteínas que formam o “spliceossomo”
23 (Murray et al. 2006). Dos diversos RNAsn, U1, U2, U4, U5 e U6 têm um papel importante na

1 remoção dos íntrons do pré RNAm no processo de “splicing” (Manchado et al. 2006; Murray et
2 al. 2006). Em relação ao DNAsn U2, apesar da natureza conservada dessas sequências nos
3 eucariotos, o número e a organização desta família multigênica pode variar bastante entre as
4 espécies (Busch et al. 1982; Dahlberg & Lund, 1988). O mapeamento cromossômico dos genes
5 de RNAsn U2 evidencia um cenário variável, com sequências acumuladas em um ou mais
6 pares cromossômicos, além de também serem verificadas de forma dispersa (Úbeda-Manzanaro et
7 al. 2010; Merlo et al. 2012b; Merlo et al. 2013a; Utsunomia et al. 2014). Na maior parte dos
8 estudos, os DNAsn U2 e DNAr estão localizados em cromossomos separados, e apenas dois
9 estudos evidenciaram organização sintênica dessas famílias multigênicas (Manchado et al.
10 2006; Úbeda-Manzanaro et al. 2010). Quanto à presença em cromossomos sexuais, genes de
11 RNAsn U2 foram mapeados apenas em *Gymnotus pantanal*, no cromossomo X₁ (Utsunomia et
12 al. 2014). Contudo, é importante considerar que muito poucos estudos foram até agora
13 realizados com estes genes, o que impossibilita uma análise mais realista sobre a distribuição
14 dos DNAsn, principalmente entre as espécies com cromossomos sexuais diferenciados.

15

16 **1.4. Os DNAs repetitivos e os cromossomos sexuais. Os microssatélites e os elementos** 17 **transponíveis.**

18 Os microssatélites são considerados marcadores informativos e versáteis, que podem ser
19 encontradas por todo o genoma (Tóth et al. 2000; MacDonald et al. 2014), cuja abundância
20 pode variar de acordo com a região genômica, bem como em relação ao grupo taxonômico
21 analisado. Devido às altas taxas de mutação, os microssatélites desempenham um papel
22 significativo na evolução genômica (Tautz et al. 1986).

1 Como consequência dos diferentes modos de herança e dos distintos processos que
2 envolvem a diferenciação dos cromossomos sexuais, distintos padrões de acúmulo são
3 esperados para alguns marcadores quando se compara estes cromossomos com os autossomos
4 (Ellegren, 2010). A expansão inicial dos microssatélites tem sido frequentemente associada
5 com o deslizamento (“slippage”) da DNA polimerase durante a replicação do DNA (Kejnovský
6 et al. 2013). Os erros de “slippage” podem ser corrigidos durante a recombinação, mas se
7 ocorrer a supressão deste processo, como acontece na diferenciação e evolução dos
8 cromossomos sexuais, a expansão dos microssatélites pode ocorrer mais rapidamente
9 (Charlesworth et al. 1994; Kejnovský et al. 2013). Entre os microssatélites, os dinucleotídeos
10 são as sequências mais frequentes e, entre eles, $(CA)_n$ prevalece em todos vertebrados e
11 artrópodes (Tóth et al. 2000), seguidos de $(GA)_n$ e $(TA)_n$ (Ellegren, 2004).

12 A habilidade de expansão dos microssatélites em regiões não recombinantes tem sido
13 demonstrada em vários estudos. Na planta *Silene latifolia* que possui o cromossomo Y
14 evolutivamente jovem, a maior parte dos microssatélites analisados está acumulada no braço q
15 deste cromossomo, exatamente na região onde a recombinação cessou mais recentemente,
16 demonstrando a expansão dessas sequências nas etapas iniciais de diferenciação (Kubat et al.
17 2008). Também na planta *Rumex acetosa*, o acentuado acúmulo de $(CA)_n$, $(CAA)_n$, $(GAA)_n$,
18 $(TAC)_n$ e $(GA)_n$ encontra-se igualmente associado com o processo de diferenciação do
19 cromossomo Y (Kejnovský et al. 2013). Em peixes, o acúmulo diferencial de algumas classes
20 de microssatélites tem sido também evidenciado nos cromossomos sexuais, como em
21 *Leporinus reinhardti*. Neste caso, um acúmulo significativamente maior de algumas classes de
22 microssatélites ocorre no cromossomo W desta espécie, incluindo trinucleotídeos (Cioffi et al.
23 2012c). Em *Characidium*, um padrão distinto de distribuição de diferentes classes de

1 microssatélites foi observado nos cromossomo Z e W de cinco espécies, incluindo regiões
2 eucromáticas e heterocromáticas (Scacchetti et al. 2015). Em *Hoplias malabaricus*, uma
3 expansão diferencial de microssatélites também foi verificada entre os dois cromossomos do
4 par sexual, sendo neste caso bem mais pronunciada no cromossomo X, o qual se diferencia do
5 Y por um longo segmento heterocromático (Cioffi et al. 2011c).

6 Entre os TEs, àqueles pertencentes à família *Rex* têm sido amplamente investigados em
7 diferentes espécies de peixes. Devido a sua ampla distribuição, esses marcadores têm
8 permitindo análises comparativas entre os diferentes grupos, variando desde um padrão
9 disperso até um acúmulo diferencial em determinadas regiões do genoma (Ferreira et al. 2011;
10 Splendore de Borba et al. 2013). *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* estão entre os retrotransposons melhor
11 caracterizados, os quais foram isolados pela primeira vez de uma espécie de peixe do gênero
12 *Xiphophorus* (Volf et al. 1999; 2000; 2001). *Rex1* e *Rex3* codificam uma transcriptase reversa
13 e uma endonuclease apurínica-apirimidínica (Volf et al. 1999; 2000) e *Rex6*, além de também
14 codificar uma transcriptase reversa, codifica uma endonuclease putativa similar à de uma
15 enzima de restrição (REL) (Volf et al. 2001).

16 Em algumas espécies, o acúmulo preferencial de *Rex* tem sido evidenciado
17 principalmente em regiões com baixa taxa de recombinação (Valente et al. 2011). Apesar de
18 em alguns casos estes retrotransposons serem mapeados em regiões cromossômicas
19 heterocromáticas, eles exibem uma distribuição dispersa por todo o genoma em 60% das
20 famílias de peixes (revisado em Ferreira et al. 2011). *Rex1* apresentou acúmulo diferencial no
21 cromossomo W de *Leporinus obtusidens* e *L. macrocephalus*, assim como no cromossomo W₁
22 de *L. elongatus* (Splendore de Borba et al. 2013). Em *Chionodraco hamatus* (Perciformes,
23 Channichthyidae), o acúmulo preferencial de *Rex3* no braço q do cromossomo Y evidenciou o

1 seu envolvimento no processo de fusão e diferenciação molecular deste cromossomo (Ozouf-
2 Costaz et al. 2004).

3 Adicionalmente, sequências repetitivas sexo-específicas também têm sido isoladas e
4 mapeadas nos cromossomos de algumas espécies, permitindo inferir sobre a origem dos
5 sistemas sexuais. Neste sentido, um fragmento de DNA de uma região heterocromática do
6 cromossomo W de *Apareiodon ibitiensis* foi microdissectada e usada como sonda (WAp) em
7 nove espécies de Parodontidae, permitindo inferir a origem comum dos cromossomos sexuais
8 nas espécies deste grupo portadoras desses cromossomos (Schemberger et al. 2011). Além
9 disso, algumas sequências repetitivas podem ser compartilhadas tanto pelos cromossomos
10 sexuais como pelos autossomos, como é o caso da família de DNA satélite pPh2004, isolada do
11 DNA genômico de *Parodon hilarii* (Vicente et al. 2003). Por sua vez, em roedores do gênero
12 *Microtus*, uma família de DNA satélite apresentou um padrão de hibridização espécie-
13 específico para os cromossomos sexuais (Fernández et al. 2001). Em *M. cabreræ*, por
14 exemplo, tais sequências hibridizaram intensamente por toda a região heterocromática do
15 cromossomo X, enquanto que no cromossomo Y poucas bandas foram evidenciadas na região
16 heterocromática, dando suporte à hipótese de que blocos heterocromátidos dos cromossomos
17 sexuais dessa espécie estão evoluindo independentemente, com diferenças na capacidade de
18 amplificação e retenção das classes de DNAs satélites (Fernández et al. 2001).

1 **1.5. Pintura cromossômica, hibridização genômica comparativa e a investigação de**
2 **cromossomos sexuais.**

3 Procedimentos de citogenética molecular, tais como a hibridização genômica
4 comparativa (CGH – *comparative genomic hybridization*) e a pintura cromossômica total
5 (WCP - *whole chromosome painting*), têm permitido um avanço significativo no conhecimento
6 da composição e diferenciação molecular dos cromossomos. Em experimentos de CGH, o
7 DNA genômico total (DNAg) é usado como sonda para comparar genomas intra-específicos ou
8 interespecíficos, possibilitando uma visão ampla das diferenças moleculares entre os
9 cromossomos sexuais, quando o DNAg das fêmeas e dos machos são comparados entre si
10 (Traut et al. 1999; Symonová et al. 2015). Por sua vez, a microdissecção cromossômica
11 também tem sido utilizada com bastante êxito na citogenética evolutiva e comparativa, isolando
12 cromossomos inteiros ou parte dos mesmos para serem utilizados como sonda em experimentos
13 de hibridização total (WCP) ou parcial (PCP) do cromossomo. Dados relevantes de
14 procedimentos WCP e CGH têm sido obtidos na citogenética de diferentes grupos
15 taxonômicos, contribuindo significativamente para a compreensão do processo envolvido na
16 diferenciação dos cromossomos sexuais (Traut et al. 1999; Phillips et al. 2001; Fuková et al.
17 2007; Vítková et al. 2007; Henning et al. 2008; Ráb et al. 2008; O’Meally et al. 2010; Pazian et
18 al. 2013).

19 Entre várias espécies de diferentes táxons, portadoras de diferentes sistemas de
20 cromossomos sexuais, procedimentos de CGH permitiram a identificação de regiões com maior
21 diferenciação molecular entre o par sexual. Assim, os cromossomos X e Y do camundongo
22 *Mus musculus* e de *Drosophila melanogaster*, puderam ser mais bem caracterizados, bem como
23 os cromossomos Z e W de três espécies de insetos, *Bombyx mori*, *Ephestia kuehniella* e

1 *Galleria mellonella*. Além disso, um alto nível de diferenciação foi evidenciado entre os
2 cromossomos Z e W nestas espécies, demonstrando a presença de sequências de DNA W-
3 específicas (Traut et al. 1999).

4 Em serpentes, o emprego de CGH também possibilitou a visualização das regiões do
5 cromossomo W onde estão presentes as sequências específicas das fêmeas, permitindo
6 identificar as regiões cromossômicas mais diferenciadas e com menor taxa de recombinação
7 com o cromossomo Z (O'Meally et al. 2010). Microcromossomos heterocromáticos específicos
8 das fêmeas foram identificados em lagartos da espécie *Pogona vitticeps*, com a utilização de
9 diversos procedimentos citogenéticos, incluindo CGH, permitindo inferir que os mesmos
10 podem estar relacionados com a determinação do sexo (Ezaz et al. 2005), provavelmente
11 derivados da degradação e deleção de macrocromossomos (Olmo et al. 1987). Também entre
12 os peixes, grandes avanços têm sido alcançados no entendimento do processo de diferenciação
13 dos cromossomos sexuais com o uso da citogenética molecular, a exemplo de *Danio rerio*,
14 *Xiphophorus maculatus* e *Poecilia reticulata*. De fato, análises de CGH possibilitaram
15 identificar estágios iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais nestas espécies, bem
16 como localizar as regiões cromossômicas sexo-específicas (Traut & Winking, 2001).

17 Por sua vez, o uso da pintura cromossômica tem fornecido um grande volume de
18 informações a respeito da origem dos sistemas sexuais. Além de poder demonstrar origens
19 comuns ou independentes dos sistemas sexuais entre espécies proximalmente relacionadas, essa
20 metodologia tem permitido verificar sequências compartilhadas entre grupos taxonômicos que
21 divergiram há milhões de anos. Entre as aves, por exemplo, *Dromais novaehollandiae* (emu) e
22 *Gallus domesticus*, pertencem a duas subclasses (Ratitas e Carinatas) que divergiram há
23 aproximadamente 80 milhões de anos (Shetty et al. 1999). Sonda obtida do cromossomo Z de

1 *G. domesticus* pintou quase toda a extensão do cromossomo Z e grande parte do cromossomo
2 W de *D. novaehollandiae*, exceto a região centromérica deste cromossomo que se apresenta
3 mais fracamente hibridizada, possivelmente representando a localização dos genes
4 determinantes do sexo (Shetty et al. 1999). Além disso, este experimento indicou o grau de
5 conservação do sistema de cromossomos sexuais nas aves, mostrando que apesar das diferenças
6 em relação ao tamanho do cromossomo W, o cromossomo Z se mantém bastante conservado
7 entre as espécies (Shetty et al. 1999).

8 Assim como nas aves, o cromossomo Z nas serpentes é também altamente conservado.
9 Por outro lado, o cromossomo W é o elemento mais variável no genoma das serpentes, mesmo
10 em espécies intimamente relacionadas, sugerindo que este cromossomo passou por processos
11 de diferenciação de forma independente e repetidamente depois da especiação (Lahn & Page,
12 1999; O'Meally et al. 2010). Notavelmente, a pintura cromossômica na serpente *Stegonotus*
13 *cucullatus*, utilizando sonda do cromossomo W de *G. domesticus*, destacou notáveis sinais de
14 hibridização no cromossomo W de *S. cucullatus*, evidenciando que apesar de 275 milhões de
15 anos de evolução independente, o cromossomo W de aves e serpentes ainda compartilham
16 sequências repetitivas (O'Meally et al. 2010).

17 Entre os invertebrados, a correspondência dos cromossomos sexuais entre espécies
18 distintas também tem sido comprovada através de pintura cromossômica (Fuková et al. 2007;
19 Vítiková et al. 2007). A sonda do cromossomo W da mariposa *E. kuehniella* evidenciou
20 homologia parcial com regiões do cromossomo W de outras espécies de mariposas, *Cadra*
21 *cautella* e *Plodia interpunctella*, mas quase nenhuma homologia com a espécie *G. mellonella*, a
22 qual é filogeneticamente mais distante de *E. kuehniella* (Vítiková et al. 2007). Os resultados
23 deram suporte à hipótese de uma divergência molecular acelerada do cromossomo W em

1 Lepidoptera e demonstraram que a redução de homologia deste cromossomo entre as espécies é
2 positivamente correlacionada com as distâncias filogenéticas entre elas (Vítiková et al. 2007).

3 Em contraste com a estabilidade na determinação do sexo de grupos como mamíferos e
4 aves, bem como com a origem comum dos sistemas sexuais nestes grupos, os peixes
5 apresentam diferenciações e origens independentes dos cromossomos sexuais. Em
6 *Eigenmannia*, experimentos de pintura cromossômica cruzada, utilizando sondas dos
7 cromossomos Y de *Eigenmannia* sp.2 e X de *E. virescens*, mostraram ausência de hibridização
8 nos cromossomos sexuais de ambas espécies, indicando a origem independente entre eles,
9 apesar de se tratarem de espécies do mesmo gênero (Henning et al. 2008). Em alguns outros
10 grupos de peixes este cenário pode ser ainda mais variável, como é o caso apresentado por
11 *Hoplias malabaricus*, que exibe diferentes cariomórfos e, entre eles, a ocorrência de sistemas
12 sexuais simples e múltiplos. O cromossomo X do cariomórfo B (XX/XY) e X₁ do cariomorfo D
13 (X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y) foram microdissectados e aplicados como sonda em pintura cromossômica
14 cruzada, não sendo também evidenciado nenhum sinal de hibridização recíproca nos
15 cromossomos sexuais dos dois cariomorfos (Cioffi et al. 2011b). Por outro lado, o gênero
16 *Characidium* possui espécies com ou sem cromossomos sexuais diferenciados. Sonda do
17 cromossomo W de *C. cf. fasciatum* destacou expressivos sinais de hibridização tanto no
18 cromossomo W quanto no cromossomo Z de *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp., as quais são
19 também espécies portadoras de cromossomos sexuais (Pazian et al. 2013).

20 O conjunto dos dados acima relatados exemplifica os avanços que vêm sendo obtidos
21 na citogenética de diferentes grupos animais, tanto em vertebrados como em invertebrados com
22 a utilização da pintura cromossômica e a hibridização genômica comparativa, notadamente no

1 que se refere à investigação dos processos de diferenciação e evolução dos cromossomos
2 sexuais.

3 **1.6. O gênero *Triportheus* e suas relações filogenéticas.**

4 O gênero *Triportheus*, anteriormente considerado na família Characidae - subfamília
5 Triporthinae (Reis et al. 2003) – é atualmente incluído na família Triporthidae
6 (Characiformes), com base nos estudos de Oliveira et al. (2011). Triporthidae é um grupo
7 monofilético que, além de *Triportheus*, engloba mais quatro gêneros, ou seja, *Lignobrycon*,
8 *Engraulisoma*, *Clupeacharax* e *Agoniates* (Oliveira et al. 2011), tendo como grupos irmãos as
9 famílias Bryconidae e Gasteropelecidae (Mariguela et al. 2016). As relações filogenéticas para
10 as espécies de Triporthidae foram recentemente estabelecidas com base em dados obtidos a
11 partir de genes mitocondriais (16S RNAr e Citocromo b *CytB*) e nucleares ativadores de
12 recombinação (*RAG1- RAG2*) e da alfa-miosina de cadeia pesada (*Myh6*), onde *Lignobrycon*
13 *myersi* corresponde à espécie irmã de todas as demais espécies de Triporthidae (Mariguela et
14 al. 2016). Essa família foi originada há 38.9 ± 10.2 milhões de anos, sendo que o ancestral de
15 todos os gêneros da família estava presente nas drenagens costeiras do leste, nas bacias do rio
16 Paraguai, do baixo Paraná e na bacia Amazônica; atualmente, apenas a linhagem de
17 *Lignobrycon* ainda permanece nas drenagens costeiras do leste (Mariguela et al. 2016).

18 O gênero *Triportheus* é constituído por peixes de pequeno porte, com algumas espécies
19 alcançando 20-24 cm de comprimento, com grandes nadadeiras peitorais (Malabarba, 2004), e
20 é conhecido popularmente como sardinha de água doce, destacando-se na produção total do
21 mercado pesqueiro, principalmente na bacia Amazônica (Malabarba, 2004; Ruffino et al. 2006,
22 Gonçalves & Batista, 2008). É um grupo monofilético, que se originou há $26,2 \pm 6,5$ milhões

1 de anos, entre o início do Oligoceno e do Mioceno (Mariguela et al. 2016), com 18 espécies
2 válidas (Froese & Pauly, 2016). Diversos eventos geológicos, hidrogeográficos e biológicos
3 que aconteceram durante este período influenciaram a distribuição da ictiofauna neotropical na
4 América do Sul (López-Fernández & Albert, 2011) o que, provavelmente, também permitiu a
5 expansão de Triportheidae (Mariguela et al. 2016). A morfologia externa destes peixes é
6 bastante conservada, sendo difícil encontrar caracteres que possam facilmente identificar todas
7 as espécies, mas dois grandes grupos podem ser facilmente diferenciados em *Triportheus*, ou
8 seja, espécies que possuem o corpo alongado e espécies que possuem o peito expandido e
9 comprimido, formando uma quilha (Malabarba, 2004). Suas distintas espécies são capazes de
10 explorar vários biótipos, com abrangência desde a bacia do rio da Prata até o Orinoco, com alta
11 representatividade nos rios da Amazônia (Goulding, 1980). Entre as espécies de *Triportheus*, *T.*
12 *auritus* é um representante direto da primeira linhagem a se diferenciar no gênero, há 20.7 ± 6.5
13 milhões de anos na Bacia Amazônica, e corresponde a espécie irmã de todas as outras do grupo
14 (Mariguela et al. 2016). Além disso, *T. auritus* apresenta também a maior distribuição
15 geográfica, sendo encontrada em quatro grandes bacias hidrográficas brasileiras (Malabarba,
16 2004).

17 **1.7. *Triportheus* como modelo para a investigação evolutiva dos cromossomos sexuais** 18 **entre os vertebrados inferiores**

19 Ao contrário do cenário constatado em vários outros gêneros de peixes Neotropicais,
20 *Triportheus* exibe um cariótipo bastante conservado, e todas as espécies estudadas até o
21 momento apresentam $2n=52$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW
22 (Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni et al. 2001; Artoni & Bertollo, 2002; Nirchio et al. 2007;

1 Diniz et al. 2009), constituindo um excelente modelo para compreender a evolução dos
2 cromossomos sexuais entre os vertebrados inferiores. Até o momento, as seguintes espécies
3 deste gênero já foram investigadas, *T. albus*, *T. angulatus* (citado como *T. flabus*), *T. auritus*
4 (citado como *T. elongatus/T. cf. elongatus*), *T. culter*, *T. cf. signatus*, *T. guentheri*, *T.*
5 *nematurus* (citado como *T. paranensis*), *T. trifurcatus* e *T. venezuelensis*, todas elas também
6 compartilhando o mesmo número de cromossomos e uma macroestrutura cariotípica
7 conservada, composta principalmente de cromossomos meta- e submetacêntricos (Falcão,
8 1988; Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al. 2001; Artoni &
9 Bertollo, 2002; Nirchio et al. 2007; Diniz et al. 2008a; 2008b; 2009; Cioffi et al. 2012c;
10 Marquioni et al. 2013).

11 Em relação aos cromossomos sexuais, o cromossomo Z é conservado e metacêntrico,
12 correspondendo ao maior do cariótipo, enquanto que o W é sempre menor do que o Z,
13 apresentando variações no tamanho e na morfologia entre as espécies (Bertollo & Cavallaro
14 1992; Artoni et al. 2001; Diniz et al. 2008a). Os diferentes graus de redução do cromossomo W
15 são bem evidenciados, principalmente pelos extremos verificados em *T. auritus*, portando um
16 cromossomo W de tamanho grande, próximo ao do Z, e em *T. albus*, que possui o cromossomo
17 W bem pequeno, o de menor tamanho entre as espécies investigadas (Artoni et al. 2001).

18 Em relação ao padrão de heterocromatina, o cromossomo Z também é bastante
19 conservado, uma vez que as regiões terminais de ambos os braços e a região centromérica
20 sempre se apresentam C-positivas (Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1992; Artoni
21 et al. 2001; Nirchio et al. 2007; Diniz et al. 2008a). Contrariamente, o cromossomo W é sempre
22 mais rico em heterocromatina, compreendendo quase toda a extensão dos braços longos (Wq),
23 mas com um padrão de acúmulo variável entre as espécies (Artoni et al. 2001).

1 Regiões organizadoras de nucléolos evidenciadas pelo nitrato de Prata (Ag-RONs)
2 foram também identificadas terminalmente em Wq de *T. auritus*, *T. nematurus* e *T. guentheri*
3 (Artoni & Bertollo, 2002). Adicionalmente, Ag-RONs foram também verificadas na região
4 telomérica do cromossomo Z de *T. guentheri* (Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni & Bertollo,
5 2002). Experimentos de FISH utilizando sondas de sequências ribossomais (DNAr 5S e 18S)
6 demonstraram que, de fato, sítios 18S estão presentes em Wq de todas as espécies analisadas
7 (Artoni & Bertollo, 2002; Diniz et al. 2008a; 2009; Marquioni et al. 2013), assim como
8 terminalmente no cromossomo Z de *T. venezuelensis* e *T. angulatus* (Nirchio et al. 2007;
9 Marquioni et al. 2013).

10 Em relação aos autossomos, Ag-RONs têm sido usualmente localizadas no braço curto
11 de um par cromossômico característico, portador de constrição secundária no braço curto, o que
12 evidencia uma condição de homologia para as espécies de *Tripurtheus* (Artoni & Bertollo,
13 2002). Contudo, cromossomos adicionais também podem ser evidenciados pela coloração com
14 nitrato de Prata, e um número variado de marcações intraespecíficas e interespecíficas foi
15 verificado nas espécies estudadas (Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni & Bertollo, 2002;
16 Nirchio et al. 2007). Análises de “double-FISH” utilizando ambas sequências ribossomais,
17 também evidenciaram um número variável de sítios de DNAr 18S entre as espécies e um único
18 par cromossômico portando de sequências de DNAr 5S (Diniz et al. 2009; Marquioni et al.
19 2013), com exceção de *T. auritus* que apresentou 10 cromossomos com sítios 5S (Marquioni et
20 al. 2013). Adicionalmente, a localização adjacente de sequências 18S e 5S sobre um mesmo par
21 autossômico também foi observada em algumas espécies, contrastando com o cenário mais
22 comum entre os peixes, onde tais sequências geralmente se encontram localizadas em pares
23 cromossômicos distintos (Marquioni et al. 2013).

1 Em *T. auritus* foram também mapeadas várias sequências de DNAs repetitivos, com
2 enfoque na sua distribuição no cromossomo W. Além do DNAr 18S, um notável acúmulo de
3 mais oito classes de microssatélites foi observado no cromossomo W em relação aos
4 autossomos. Estes dados reforçaram a participação dos DNAs repetitivos no processo evolutivo
5 dos cromossomos sexuais e indicam que os microssatélites podem desempenhar um papel de
6 destaque na diferenciação do cromossomo sexo-específico, podendo representar “colonizadores
7 iniciais” dos cromossomas sexuais (Cioffi et al. 2012c).

8 Experimentos de pintura cromossômica, utilizando sonda do cromossomo Z de *T.*
9 *nematurus* obtida por microdissecção, mostraram a homologia completa entre os cromossomos
10 Z de todas as espécies analisadas, reforçando a natureza conservativa deste cromossomo e a
11 provável sinapomorfia do sistema ZW no gênero. Por outro lado, o cromossomo W apresentou
12 apenas pequenos sinais de hibridização com a sonda do cromossomo Z, correspondendo à
13 região Wp de *T. nematurus* (população do rio Piracicaba, SP), *T. albus* e *T. cf. signatus* e à
14 região Wq de *T. nematurus* (população da Argentina) (Diniz et al. 2008b).

15 Assim, considerando os avanços citogenéticos que vêm sendo obtidos em diferentes
16 grupos de organismos com o emprego das modernas metodologias da citogenética molecular, a
17 presente tese procurou aprofundar a investigação dos processos de diferenciação do par sexual
18 em *Triportheus*, tendo em vista a oportunidade ímpar que este grupo oferece pelo
19 compartilhamento de um mesmo sistema de cromossomos sexuais pelas suas diferentes
20 espécies.



Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A diversidade dos mecanismos determinantes do sexo entre os peixes, juntamente com a ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na maioria das espécies, tornam este grupo propício para investigações evolutivas. Particularmente, a possibilidade de caracterizar passos iniciais na diferenciação dos cromossomos sexuais diferencia os peixes dos vertebrados superiores, onde a estabilidade dos sistemas de cromossomos sexuais já se encontra fixada na maioria das espécies. Por sua vez, o gênero *Triportheus* apresenta um cenário incomum entre os peixes, com a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW para todas as espécies já investigadas. Enquanto que o cromossomo Z permanece morfologicamente conservado em todas as espécies, o cromossomo W apresenta tamanho e forma variável entre elas, desde quase do mesmo tamanho até claramente muito reduzido em relação ao cromossomo Z. Adicionalmente, ocorre uma estreita relação entre a diferenciação do cromossomo W e o acúmulo de heterocromatina e, conseqüentemente, o provável envolvimento de diferentes tipos de DNAs repetitivos neste processo.

Este cenário em *Triportheus*, juntamente com a filogenia já bem definida para este grupo, oferece uma oportunidade excelente para a análise dos eventos evolutivos no tocante à diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais, aspecto este que vem despertando interesse crescente na biologia evolutiva nos últimos anos. Neste contexto, os recentes avanços metodológicos da citogenética molecular tornam-se promissores para a exploração mais ampla e resolutiva de eventos evolutivos, notadamente direcionados aos cromossomos sexuais. De fato, experimentos de pintura cromossômica, CGH e mapeamento de sequências de DNA repetitivo têm possibilitado investigar, de forma eficiente, o processo de diferenciação desses

1 cromossomos em vários grupos, identificando regiões cromossômicas sexo-específicas bem
2 como a sua origem compartilhada ou independente entre as espécies.

3 Assim sendo, este projeto teve como objetivo a investigação dos cromossomos sexuais no
4 modelo *Triportheus*, utilizando o mapeamento de diferentes sequências repetitivas no genoma,
5 hibridização genômica comparativa, microdissecção e pintura cromossômica total, buscando
6 avanços no conhecimento da evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais entre os
7 vertebrados inferiores.

8 **Objetivos específicos**

9 ***A) Investigação da origem comum do sistema ZZ/ZW em Triportheus***

10 Esta proposta objetivou confirmar se o sistema ZZ/ZW, compartilhado pelas espécies de
11 *Triportheus*, apresenta de fato uma origem comum, pondo assim em evidência uma
12 característica particular entre peixes. *Triportheus auritus* é a espécie representativa da primeira
13 linhagem que se diferenciou no gênero há $20,7 \pm 6,5$ milhões de anos, sendo, portanto a espécie
14 mais basal dentre todas as outras espécies irmãs em *Triportheus*, de acordo com filogenia
15 apresentada por Mariguela et al. (2016). *T. auritus* se caracteriza por apresentar o cromossomo
16 W de maior tamanho entre as espécies analisadas. Assim sendo, os cromossomos Z e W desta
17 espécie foram microdissectados e empregados como sondas em experimento de pintura
18 cromossômica entre as diferentes espécies de *Triportheus*. O padrão de hibridização obtido foi
19 utilizado como critério indicador da origem comum ou independente do sistema ZW entre as
20 espécies.

1 ***B) Investigação da conservação x diferenciação genômica dos cromossomos Z e W de***
2 ***Triportheus***

3 O cromossomo Z se apresenta conservado entre as espécies de *Triportheus*, enquanto
4 que o cromossomo W diverge entre elas em relação ao tamanho, morfologia e distribuição da
5 heterocromatina. Nesta proposta procurou-se investigar a ocorrência de uma possível
6 diferenciação genômica do cromossomo Z, assim como do cromossomo W das diferentes
7 espécies de *Triportheus*, no tocante ao acúmulo diferencial de elementos repetitivos. Diferentes
8 classes de DNAs repetitivos, organizados *em tandem* ou dispersos no genoma, foram mapeadas
9 por FISH avaliando sua participação na diferenciação desses cromossomos e suas possíveis
10 dinâmicas de acúmulo. Adicionalmente, a pintura cromossômica total, utilizando sondas
11 obtidas da microdissecção dos cromossomos Z e W, também foi empregada para testar
12 possíveis diferenciações genômicas nos cromossomos Z e W das diferentes espécies.

13 ***C) Prospecção de regiões sexo-específicas e/ou compartilhadas entre os cromossomos Z e W***
14 ***de Triportheus***

15 Esta proposta procurou investigar a ocorrência de regiões cromossômicas sexo-
16 específicas e/ou compartilhadas entre os cromossomos sexuais de *Triportheus*, procurando
17 assim por evidência o grau de homologia ainda existente entre eles ao longo do processo
18 evolutivo. Para tanto, experimentos de hibridização genômica comparativa (CGH) foram
19 empregados para uma análise comparativa entre fêmeas e machos de *T. signatus*, elegida para
20 este fim por se tratar de uma espécie que apresenta o cromossomo W com tamanho bastante
21 reduzido comparativamente à espécie mais basal do grupo, *T. auritus*.

1 ***D) Investigação do padrão de distribuição de famílias multigênicas em *Triportheus****

2 As famílias multigênicas de DNAr 5S e 18S já foram previamente mapeadas por FISH
3 em algumas espécies de *Triportheus*, apresentando um padrão diferenciado quanto à posição
4 nos autossomos, assim como uma configuração sintênica variável dependendo da espécie.
5 Adicionalmente, sequências de DNAr 18S também ocorrem no cromossomo W de todas as
6 espécies analisadas até o momento. Neste estudo, procurou-se avançar no conhecimento da
7 organização desses genes nos cromossomos e seu dinamismo evolutivo em *Triportheus*. Para
8 tanto, espécies ainda não estudadas a este respeito foram investigadas, assim como o
9 mapeamento citogenético de genes da família RNAsn U2. Tais sequências foram mapeadas
10 pela primeira vez em *Triportheus*, concomitantemente com os genes DNAr 5S e 18S, em um
11 único experimento de hibridização (*Three-color-FISH*). O emprego do *software* “ISIS digital
12 FISH imaging”, foi utilizado para a análise da distribuição longitudinal das sequências
13 mapeadas ao longo dos cromossomos.



Material e Métodos

1 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

2

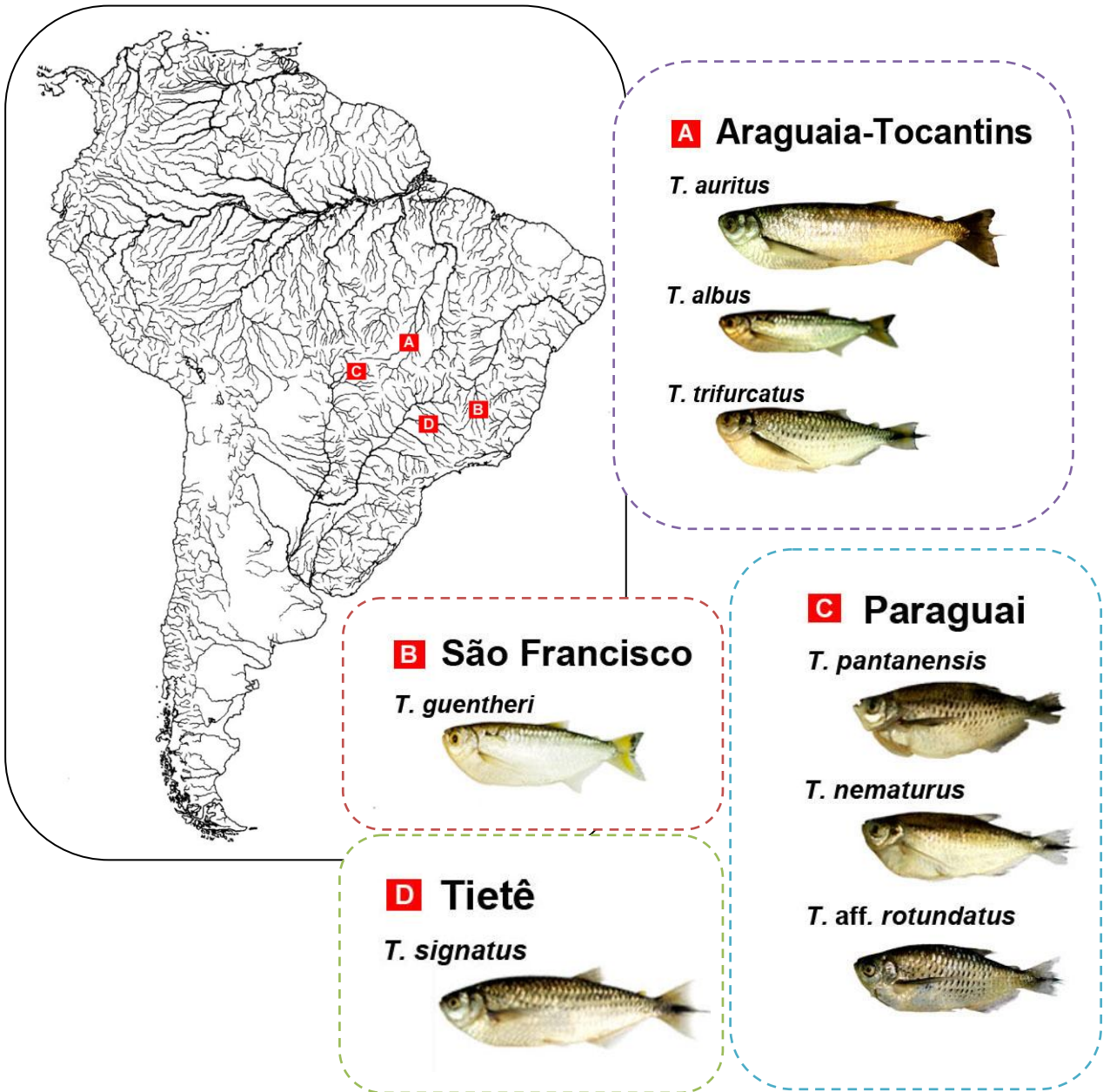
3 **3.1 Amostragem do material biológico**

4 Foram analisados fêmeas e machos de *Triportheus albus* Cope, 1872, *T. auritus*
 5 (Valenciennes, 1850), *T. guentheri* (Garman, 1890), *T. nematurus* (Kner, 1858), *T. pantanensis*
 6 Malabarba, 2004, *T. aff. rotundatus*, *T. signatus* (Garman, 1890) e *T. trifurcatus* (Castelnau,
 7 1855) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, conforme indicado na **Tabela 1** e **Figura 1**.
 8 As coletas tiveram autorização do órgão ambiental brasileiro (ICMBIO/SISBIO - licença n°
 9 48628-2). Todas as espécies foram devidamente identificadas e depositadas no Museu de
 10 Peixes, do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista
 11 (UNESP - Botucatu - SP), com os respectivos números de depósitos listados na Tabela 1.

12 **Tabela 1.** Espécies de *Triportheus* investigadas, com as respectivas bacias hidrográficas onde
 13 foram coletadas, número dos indivíduos amostrados e registro de depósito em museu.

| Espécies | Bacias hidrográficas | N | Número de depósito |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------|---------------------------|
| <i>Triportheus albus</i> | Araguaia-Tocantins, MT | (04 ♀ ; 04 ♂) | LBP18620 |
| <i>Triportheus auritus</i> | Araguaia-Tocantins, MT | (05 ♀ ; 04 ♂) | LBP18622 |
| <i>Triportheus guentheri</i> | São Francisco, MG | (12 ♀ ; 06 ♂) | LBP18628 |
| <i>Triportheus nematurus</i> | Paraguai, MT | (09 ♀ ; 07 ♂) | LBP18624 |
| <i>Triportheus pantanensis</i> | Paraguai, MT | (01 ♀ ; 01 ♂) | LBP18623 |
| <i>Triportheus aff. rotundatus</i> | Paraguai, MT | (19 ♀ ; 21 ♂) | LBP18625 |
| <i>Triportheus signatus</i> | Tietê, SP | (13 ♀ ; 24 ♂) | LBP18619 |
| <i>Triportheus trifurcatus</i> | Araguaia-Tocantins, MT | (04 ♀ ; 11 ♂) | LBP18621 |

14 MT = Estado do Mato Grosso; MG = Estado de Minas Gerais e SP = Estado de São Paulo



1 **Figura 1.** Mapa do Brasil evidenciando a procedência dos espécimes de oito espécies de
2 *Triportheus* utilizados no presente estudo. (A) Rio Araguaia, MT, Bacia Araguaia-Tocantins
3 (S15° 53' 46.16" - W52° 15' 20.58"); (B) Lago Inhumas, MG, Bacia Rio São Francisco
4 (S20°12'10,5"- W 45°52'25.07"); (C) Rio Paraguai, MT, Bacio do rio Paraguai *T. nematurus* e
5 *T. aff. rotundatus* (S15°05'45.53" - W 57°11'02.53") / *T. pantanensis* (S16°04'30.78" - W
6 57°42'09.63"); (D) Rio Piracicaba, SP, Bacia do Rio Tietê (S22°37'08.6" - W 48°08'57.1").

1 **3.2 Preparação dos cromossomos mitóticos**

2 Foi adotada a metodologia descrita por Bertollo et al. (2015) para preparações
3 cromossômicas *in vivo*. Os animais foram previamente colchicinizados (1 ml de solução de
4 colchicina a 0,005% / 100 g de peso do animal), por um período de 30 min. A seguir, após
5 procedimentos anestésicos, foram extraídos fragmentos do rim anterior. Este material foi
6 lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M) e transferido para pequenas cubas de vidro,
7 contendo cerca de 10 ml desta mesma solução. A fragmentação do material foi realizada com
8 uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, absorvendo e eliminando várias vezes os
9 fragmentos dos tecidos renais, facilitando assim a separação das células e a obtenção de uma
10 suspensão celular homogênea. A suspensão obtida foi incubada em estufa a 37 °C, durante 20
11 min, e então transferida com auxílio de uma pipeta Pasteur para um tubo de centrifuga,
12 adicionando-se algumas gotas (10) de fixador, recém-preparado (metanol + ácido acético
13 glacial 3:1). O material foi então bem misturado com uma pipeta Pasteur e centrifugado por 10
14 min a 500 – 800 rpm, descartando o sobrenadante. Adicionou-se ao sedimento celular 5-7 ml
15 de fixador, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo, novamente misturando bem o material
16 com uma pipeta Pasteur. Este procedimento de fixação foi repetido por mais duas vezes. Após
17 a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado aproximadamente 1 ml de
18 fixador ao sedimento celular, misturando-os bem. A suspensão celular foi então guardada em
19 freezer, acondicionada em tubos Eppendorf de 1,5 ml. Os experimentos para a obtenção de
20 material cromossômico seguiram condutas éticas, de acordo com o Comitê de Ética em
21 Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo no. CEUA
22 1853260315).

1 **3.3 Preparação das lâminas**

2 Entre 15-20 µl da suspensão celular foram adicionadas em pingados sobre uma lâmina
3 bem limpa, aquecida ao redor de 60 °C em chapa aquecedora e mantendo a umidade. As
4 preparações foram secadas diretamente ao ar e coradas com Giemsa a 5%, em tampão fosfato
5 (pH 6,8), durante 5 a 6 min. O excesso de corante foi retirado pela lavagem da lâmina com
6 água destilada e o material secado ao ar.

8 **3.4 Detecção da heterocromatina C-positiva (bandamento C)**

9 A detecção da heterocromatina C-positiva seguiu o protocolo descrito por Sumner (1972),
10 com algumas modificações. As preparações cromossômicas foram previamente tratadas com
11 uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 42 °C, durante 11 min e lavadas com água
12 destilada, procedendo-se então os seguintes passos: (a) tratamento da preparação em uma
13 solução de hidróxido de Bário ($Ba(OH)_2$) a 5%, recém preparada e filtrada, a 42 °C, durante 1 a
14 2 min; (b) submersão da lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavagem com água
15 destilada; (c) tratamento da preparação em solução salina 2 x SSC, a 60 °C, durante 40 min; (d)
16 lavagem em água destilada e secagem ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa
17 a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 min, lavadas em água corrente e secadas ao ar.

1 **3.5 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Obtenção das sondas.**

2 **3.5.1 Família multigênica de DNAr 18S**

3 Segmentos de DNAr 18S foram obtidos a partir do DNA nuclear de *T. nematurus*, a
4 partir de clonagem em vetores plasmidiais e propagação em células competentes de
5 *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), que já se encontravam disponíveis
6 em nosso laboratório. A sonda utilizada corresponde a um segmento de 1.400 pares de bases do
7 gene DNAr 18S, tendo sido obtida com a utilização dos primers 18Sf (5'-
8 CCGAGGACCTCACTAAACCA-3') e 18Sr (5'-CC-GCTTTGGTGACTCTTGAT-3'),
9 conforme Cioffi et al. (2009).

10 **3.5.2 Famílias multigênicas de DNAsn U2 e DNAr 5S**

11 O DNA genômico de *T. albus* foi extraído a partir do fígado, de acordo com o método de
12 fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001). A seguir, as sequências de DNAr 5S e DNAsn
13 U2 foram obtidas diretamente por PCR. A sonda da família multigênica DNAr 5S foi obtida
14 com os seguintes primers 5Sf (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sr (5'-
15 CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), conforme descrito por Martins et al. (2006). A sonda
16 de DNAsn U2 foi isolada usando os primers U2f (5'-
17 CAAAGTGTAGTATCTGTTCTTATCAGC-3') e U2r (3'-CTTAGCCAAAAGGCCGAGA-
18 5'), de acordo com Cross et al. (2005).

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

2 Os produtos de PCR de DNAsn U2 e DNAr 5S foram ligados ao vetor de clonagem
3 pGEM-T (Promega, Madison, WI, EUA). A reação, utilizando este vetor, foi realizada
4 acrescentando-se a um tubo 3 µl do fragmento de DNA de interesse (produto de PCR
5 purificado), 5 µl de tampão de ligação 2x, 1 µl da enzima T4 ligase (3U), 1 µl do vetor (50
6 ng/µl) e 3 µl de água estéril, totalizando um volume de 10 µl. A mistura foi agitada
7 cuidadosamente e incubada a 4 °C, por cerca de 12 h.

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

9 Foram colocados 50 µl de bactérias competentes (*Escherichia coli* DH5α) e 2 µl da reação
10 de ligação em tubos estéreis, os quais foram misturados cuidadosamente. Os tubos foram
11 mantidos no gelo por 20 min, submetidos a um choque térmico a 42 °C, por 45s e transferidos
12 novamente para o gelo, onde permaneceram por mais 2 min. Em seguida foram adicionados a
13 cada tubo 950 µl de meio líquido SOC (triptona 2% /NaCl 1M /KCl 0,25M /Mg²⁺ estéril
14 /glicose 2M /extrato de levedura 0,5%, pH 7,5), a temperatura ambiente e cuidadosamente
15 misturados. Os tubos foram incubados a 37 °C, por cerca de 1,5 h, sob agitação (200 rpm) e
16 depois centrifugados, por 20 s, a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o produto da
17 transformação foi misturado em 200 µl de meio líquido SOC e espalhado em placas de Petri
18 estéreis, contendo meio sólido LB (peptona 1% /NaCl 0,17M /extrato de levedura 0,5% /agar
19 1,5%, pH 7,5), ampicilina (50 mg/ml/ml de meio LB) e 50 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-
20 indol-β-D-galatoside, 50 mg/ml). As placas foram incubadas por 16 h em estufa a 37 °C e as
21 colônias de coloração branca, potencialmente portadoras do inserto de interesse nos plasmídios,
22 foram selecionadas.

1 *Mini-preparações para a purificação de plasmídios recombinantes (Kit NucleoSpin®*
2 *Plasmid, Macherey-Nagel)*

3 As bactérias, contendo os plasmídios recombinantes, permaneceram em crescimento
4 por 16 h em 3 ml de meio de cultura líquido LB (peptona 1% / NaCl 0,17M , extrato de
5 levedura 0,5%, pH 7,5), acrescido de ampicilina (50mg/ml de meio LB). A seguir foram
6 transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas por 60 s a 13.000 rpm. O sobrenadante foi
7 descartado e o pellet revolvido em 250 µl de solução tampão. Logo após, foram adicionados
8 250 µl da solução de lise celular e os tubos foram invertidos lentamente por 6 vezes, e mantidos
9 em temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 300 µl de solução de neutralização,
10 invertendo-se novamente os tubos por mais seis vezes. O lisado foi centrifugado por 5 min, a
11 10.000 rpm, e a porção líquida obtida foi transferida para uma minicoluna (acoplada a um tubo
12 de 2 ml), contendo 1 ml de resina de purificação. A coluna contendo a porção líquida com o
13 tubo acoplado foi centrifugada por 1 min a 10.000 rpm. O líquido no tubo coletor foi
14 descartado e a minicoluna foi acoplada novamente ao tubo. Foram adicionados 600 µl do
15 tampão de lavagem à minicoluna que foi centrifugada por 1 min, a 10.000 rpm. O líquido foi
16 descartado e a centrifugação foi repetida por mais 2 min a 10.000 rpm. A seguir, um novo tubo
17 foi acoplado a minicoluna, acrescentando-se 50 µl de água deionizada para eluir o DNA. Após
18 1 min de incubação em temperatura ambiente, foi realizada mais uma centrifugação por 1 min,
19 a 10.000 rpm, para a recuperação do DNA. A minicoluna foi descartada e o tubo com o DNA
20 purificado foi armazenado em freezer a -20 °C.

1 ***Sequenciamento e análise das sequências de DNA***

2 Os clones obtidos foram sequenciados em um sequenciador ABI 3100 Genetic
3 Analyzer, usando os primers T7 e SP6, com o kit de reação ABI BigDye Terminator 3.1 Cycle
4 Sequencing (Applied Biosystems, Madrid, Spain). As sequências nucleotídicas foram
5 submetidas ao software Blastn (Altschul et al. 1990) para análise de similaridade em relação às
6 sequências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information
7 (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A pesquisa no BlastN do NCBI
8 identificou similaridade entre as sequências DNAr 5S e DNAsn U2 de *T. albus* com sequências
9 encontradas entre peixes de outras ordens.

10 ***3.5.3 Retroelementos Rex***

11 As sondas dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram obtidas diretamente por PCR,
12 utilizando os seguintes primers: *Rex1f* (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3') e *Rex1r* (3'
13 TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC-5'); *Rex6f* (5'-TAAAGCATACATGGAGCGCCAC-
14 3') e *Rex6r* (3'GGTCCTCTACCAGAGGCCTGGG-5'), conforme Volff et al. (2001); *Rex3f*
15 (5'-AGG CGG TGA YAA GCC GCA CTG) e *Rex3r* (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG
16 GT-3'), conforme Volff et al. (1999).

17 ***3.5.4 Oligonucleotídeos enriquecidos com microsatélites***

18 Os seguintes oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microsatélites foram
19 utilizados como sondas: d(CA)₁₅, d(CAA)₁₀, d(CAC)₁₀, d(CAG)₁₀, d(CAT)₁₀, d(CGG)₁₀,
20 d(GA)₁₅, d(GC)₁₅, d(GAG)₁₀, e d(TA)₁₀. Essas sequências foram marcadas diretamente com
21 Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, por VBC-Biotech (Viena, Áustria), segundo Kubat et
22 al. (2008), com pequenas modificações.

1 **3.5.5 Microdissecção cromossômica total**

2 Os cromossomos Z e W de *T. auritus* foram microdissectados e utilizados como sondas
3 em análises de pintura cromossômica. Considerando que o cromossomo Z é o maior do
4 cariótipo em todas as espécies, sua identificação é segura para realizar a microdissecção.
5 Quanto ao cromossomo W, sua identificação nem sempre é possível sem o bandamento C.
6 Entretanto, em *T. auritus*, esse cromossomo pode ser identificado mesmo em preparações
7 convencionais em virtude do seu tamanho, razão pela qual esta espécie foi escolhida para esta
8 finalidade. Assim, 15 cópias do cromossomo Z e 20 cópias do cromossomo W de *T. auritus*
9 foram microdissectados a partir de metáfases de fêmeas, utilizando a metodologia descrita por
10 Yang et al. (2009), com pequenas modificações. Tais procedimentos foram viabilizados por
11 parceria estabelecida com o laboratório de Molekulare Zytogenetik (*Universitätsklinikum Jena*
12 - *Alemanha*), chefiado pelo Prof. Dr. Thomas Liehr.

13 **Preparação das agulhas de das micropipetas**

14 As microagulhas para a raspagem cromossômica foram preparadas em um *puller* modelo
15 PB-7 (Narishige, Japão), utilizando bastões de vidro de 2 mm (Schott Glas, Mainz, Alemanha),
16 sendo expostas à luz ultra-violeta, por 30 min, antes de sua utilização. As micropipetas foram
17 também preparadas no mesmo aparelho, utilizando pipetas Pasteur de 250 mm (Assistant,
18 Sondheim, Alemanha), as quais foram siliconizadas utilizando dimetildiclorosilano 1% em
19 tetracloreto de carbono, e incubadas a 100 °C, por 30 min.

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

2 Três a quatro gotas das suspensões cromossômicas foram adicionadas sobre diferentes
3 regiões de uma lamínula previamente tratada em solução 10 x SDS, e coradas com Giemsa 5%
4 por 3 min. Posteriormente, a microdissecção dos cromossomos Z e W foi realizada utilizando
5 um microscópio invertido Axiovert 135 (Zeiss, Jena, Alemanha), com a agulha estéril acoplada
6 a um micromanipulador mecânico (Zeiss, Jena, Alemanha). A agulha foi cuidadosamente
7 deslocada até uma posição um pouco acima do cromossomo alvo, possibilitando que
8 fragmentos do mesmo fossem progressivamente coletados até sua microdissecção completa. Os
9 fragmentos cromossômicos foram transferidos para uma micropipeta contendo uma solução
10 coletora (10 mM Tris- HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, SDS 0,1%, 1 mM EDTA pH 7,5-
11 8,0,1% Triton X- 100, 1.44 mg/ml de proteinase K e 30% de glicerol) e inserida em uma
12 câmara úmida a 60 °C por 1 h.

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

14 As micropipetas foram quebradas em um tudo do tipo *Eppendorf* contendo
15 100 mM de dNTPs, 5 mM de primer DOP GMW (5 '-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3')
16 e tampão de diluição Sequenase (24mM Tris HCl, pH 7.5, 12mM MgCl₂, 30mM NaCl). O
17 processo de amplificação foi realizado em um termociclador (Axygen Therm-1000). Os oito
18 primeiros ciclos de amplificação foram realizados utilizando a DNA polimerase T7 (USB,
19 Cleveland, EUA), com o seguinte programa: 90 °C/1 min; 25 °C/2 min; 34 °C/2 min. Um passo
20 inicial de desnaturação a 92 °C, por 5 min, foi adicionado a cada ciclo para inativar a atividade
21 da proteinase K. 0,3U de Sequenase foi adicionada a cada ciclo durante a etapa de
22 reanelamento. Em seguida, foram adicionados 50 µl de um mix contendo 0.1 U Taq
23 polymerase, 0.2 mM dNTPs, 20 µM DOP primer, 25 mM MgCl₂ and 34.23 µl of água para

1 PCR, e 33 ciclos de amplificação foram realizados com o seguinte programa: 92 °C/1 min; 56
2 °C/2 min; 72 °C/2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

3 **3.5.6 Fração Cot-1 DNA**

4 DNA enriquecido com sequências alta e moderadamente repetitivas - Cot-1DNA - (Zwick
5 et al. 1997), também foi utilizado como sondas para experimentos de FISH. Para isso, o DNA
6 genômico de *T. auritus* foi extraído, utilizando o procedimento de fenol-clorofórmio descrito
7 por Sambrook & Russel (2001). Uma biblioteca enriquecida com sequências repetitivas foi
8 construída, com base na cinética de renaturação de Cot-1DNA. Amostras de DNA (200µl de
9 100–500ng µl⁻¹ de DNA genômico em 0,3M NaCl) foram autoclavadas por 10 min, a 1,4
10 atmosferas de pressão e 120 °C e o DNA fragmentado foi separado por eletroforese, em um gel
11 a 1%. Os fragmentos de DNA variaram em tamanho de 100 a 1000 pares de bases. Amostras de
12 50 µl do DNA fragmentado foram desnaturadas a 95 °C, durante 10 min, colocadas em gelo por
13 10 s e transferidas para um banho de água a 65 °C, para reanelamento do DNA. Após 1 min, as
14 amostras foram incubadas a 37 °C, por 8 min, com 1U da enzima S1 nuclease, permitindo a
15 digestão das fitas simples de DNA. As amostras foram imediatamente congeladas em
16 nitrogênio líquido.

1 **3.6 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Marcação das sondas.**

2 **3.6.1 Sondas de DNAs repetitivos**

3 As sondas de DNAr 18S e 5S foram diretamente marcadas com o kit Nick-Translation
4 Mix (Roche, Mannheim, Germany), sendo o DNAr 18S marcado com Cy5-dUTP (amarelo) ou
5 com Spectrum Orange (vermelho), conforme o experimento, e o DNAr 5S com Spectrum
6 Green-dUTP (verde) (Vysis, Downers Grove, USA), conforme as instruções do manual do
7 fabricante. Para alguns experimentos a sonda de DNAr 18S foi marcada indiretamente com
8 Digoxigenin-11-dUTP, usando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche, Basel, Suíça). As
9 sondas dos retroelementos *Rex* foram todas marcadas utilizando o kit DIG-Nick Translation
10 Mix (Roche, Basel, Suíça). A sonda de DNAsn U2 foi marcada via PCR, usando os primers e o
11 programa de amplificação descrito em Cross et al. (2005), incorporando o nucleotídeo marcado
12 Spectrum Orange-dUTP (Vysis, Downers Grove, USA).

13 **3.6.2 Sondas para os experimentos de CGH**

14 Os experimentos de CGH foram realizados em *T. signatus*, representando uma
15 espécie portadora de um dos menores cromossomos W entre as espécies de *Triportheus*. O
16 DNA total (gDNA) da fêmea foi marcada com Digoxigenin-11-dUTP, usando DIG-nick-
17 translation Mix (Roche, Mannheim, Germany), e o gDNA do macho foi marcado com biotin-
18 16-dUTP usando o BIO-nick-translation Mix (Roche). Para cada sonda, 1 µg de gDNA foi
19 usado na marcação. Para o processo de precipitação das sondas, ambos os gDNA (macho e
20 fêmea) foram misturados juntamente com 50 µg de esperma de salmão sonificado (Sigma-
21 Aldrich) para serem precipitados juntos (mix de hibridização). No final do processo, este mix
22 apresentou 1 µg de sonda de gDNA do macho + 1 µg de sonda gDNA da fêmea + 50 µg de

1 esperma de salmão sonificado + 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2 x SSC e 50% de formamida,
2 em um volume final de 20 µl.

3 **3.6.3 Sondas de cromossomos totais**

4 Ambas as sondas dos cromossomos Z e W foram marcadas por PCR. A
5 sonda do cromossomo Z foi marcada com Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove,
6 EUA), e a sonda do W com Spectrum-Green dUTP (Vysis, Downers Grove, USA), em 30
7 ciclos de DOP-PCR utilizando 1 µL dos produtos iniciais de amplificação por DOP-PCR
8 (Yang et al. 2009). Os ciclos de amplificação foram realizados utilizando a AmpliTaq DNA
9 Polymerase (Roche, Basel, Suíça), com o seguinte programa: 91 °C/1 min; 56 °C/1 min; 72
10 °C/2min, com um passo inicial de desnaturação a 92 °C por 3 min e uma etapa de extensão final
11 de 5 min a 72°C.

1 **3.7 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Preparação das lâminas, hibridização e**
2 **detecção do sinal**

3 **3.7.1 *Three-color-FISH (DNAr 5S, 18S e DNAsn U2) / Microssatélites / Rex***

4 As preparações cromossômicas foram inicialmente desidratadas em uma série de etanol a
5 70, 85, e 100% por 3 min em cada banho e incubadas com RNase (10 mg/ml), por 1 hora à 37
6 °C, em câmara úmida. Em seguida, após lavagem em 1 × PBS por 5 min, as lâminas foram
7 tratadas com uma solução de pepsina 0.005% em HCl 10 mM por 3 min, à 37 °C. As lâminas
8 foram lavadas novamente em 1 × PBS por 5 min e o material fixado em formaldeído 1% em
9 temperatura ambiente por 10 min. Após a lavagem, as lâminas foram desidratadas com 70%,
10 85%, e 100% por 3 min. e o DNA cromossômico desnaturado em formamida 70%/ 2 × SSC
11 por 3 min à 72 °C. Seguiu-se a desidratação do material em etanol gelado a 70%, 85% e 100%
12 em temperatura ambiente por 3 min em cada banho. O mix de hibridização, contendo 100 ng de
13 cada sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2 x SSC e 50% de formamida, em
14 um volume final de 20 µl, foi aquecido à 85 °C, por 10 min, e então aplicado sobre as lâminas,
15 sendo a hibridização realizada por um período de 16-18 h, à 37 °C, em câmara úmida. As
16 lavagens pós-hibridização foram realizadas em 1 × SSC por 5 min à 42 °C, em 4 × SSCT
17 usando um agitador à temperatura ambiente e em 1 × PBS. Para as sondas marcadas
18 indiretamente, uma etapa adicional de detecção foi realizada. A detecção das sondas foi
19 realizada com anti-digoxigenin-FITC (Roche) ou anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) por 1 h.
20 Depois da detecção, as lâminas foram lavadas por 3 vezes em 4 × SSCT usando o agitador à
21 temperatura ambiente por 5 min. Subsequentemente, as lâminas foram desidratadas novamente
22 em etanol (70%, 85%, e 100%), por 3 min em cada banho. Os cromossomos foram contra-

1 corados com DAPI (1,2 µg/ml) e foram montados em solução antifading (Vector, Burlingame,
2 CA, EUA).

3 ***3.7.2 Three-color-FISH para experimentos de pintura cromossômica total (WCP)***

4 O experimento de pintura cromossômica total foi realizado de acordo com Yang et al.
5 (2009) e envolveu o uso de sondas do cromossomo Z e W, bem como a sonda do DNAr 18S,
6 uma vez que o cromossomo W possui essas sequências em todas as espécies analisadas. Os
7 passos iniciais do processo de FISH como o pré-tratamento das lâminas e a desnaturação
8 cromossômica em formamida, foram realizados conforme descritos anteriormente para a
9 hibridização das sondas de DNAs repetitivos. Adicionalmente, foi usado Cot1-DNA
10 diretamente isolado de *T. auritus* (preparado de acordo com Zwick et al. 1997). O Cot1-DNA
11 foi dissolvido juntamente com o mix de hibridização, contendo 100 ng de cada sonda
12 desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano e 2 x SSC e 50% de formamida. Este mix foi
13 transferido para um termociclador com o seguinte programa: 75 °C por 5 min, 4 °C por 2 min e
14 37 °C por 30 min, e então aplicado sobre as lâminas e a hibridização foi realizada por um
15 período de 16-18 h, a 37 °C, em câmara úmida. As lavagens pós-hibridização foram realizadas
16 em 1 × SSC por 5 min à 65 °C, e em 4 × SSCT, usando o agitador à temperatura ambiente, e
17 uma lavagem rápida em 1 × PBS. Em seguida, as lâminas foram desidratadas novamente (70%,
18 85% e 100%), por 3 min em cada banho. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI
19 (1,2 µg/ml) e montados em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, EUA).

1 **3.7.3 FISH para CGH**

2 Os experimentos de CGH foram conduzidos conforme descrito em Symonová et al.
3 (2015), com algumas modificações. As preparações cromossômicas foram desidratadas (70%,
4 85% e 100%), por 3 min em cada banho e mantidas no freezer por um dia. No dia seguinte, as
5 lâminas foram colocadas diretamente em etanol 70% à -20 °C e depois em etanol a 85% e
6 100%, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em 2 × SSC por 5 min e
7 submetidas ao pré-tratamento com RNase e pepsina, conforme descrito em seção anterior. O
8 DNA cromossômico foi desnaturado em formamida 75%/ 2 × SSC por 3 min a 74 °C. A seguir,
9 o material foi desidratado em etanol 70% gelado, e 85 e 100% à temperatura ambiente, por 3
10 min em cada banho. O mix de hibridização (conteúdo descrito na seção 3.6.2 - Sondas para
11 experimentos de CGH) foi desnaturado a 86 °C por 6 min, aplicado sobre as lâminas e a
12 hibridização foi realizada por um período de 3 dias, a 37 °C, em câmara úmida. Depois da
13 hibridização, as lâminas foram lavadas uma vez em formamida 50% /2 × SSC a 42 °C for 5
14 min, por três vezes em 1 × SSC a 42 °C por 7 min e em 2× SSC por 20 s a temperatura
15 ambiente. Os sinais de hibridização foram detectados usando uma solução composta por anti-
16 digoxigenina-FITC (Roche), diluída em albumina sérica bovina 0.5% /PBS, e estreptavidina-
17 CY3 (Invitrogen Life Technologies, San Diego, Calif., USA) diluída em PBS contendo soro de
18 cabra normal a 10%. As lâminas foram lavadas quatro vezes em 4 × SSCT à 42 °C, por 7 min
19 em cada lavagem. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (1,2 µg/ml) e as lâminas
20 foram montadas em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, EUA).

1 **3.8 Análises cariotípicas**

2 As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de
3 campo claro, estabelecendo-se o número diplóide modal para cada espécie. Cerca de 30
4 metáfases foram analisadas para cada uma das metodologias propostas. As melhores
5 preparações foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro, Image Pro Plus 4.1
6 (Media Cybernetic), acoplado ao microscópio Olympus BX50, ou em microscópio Zeiss
7 Axioplan, utilizando o software ISIS digital FISH imaging system (MetaSystems,
8 Altusheim, Germany), com os filtros apropriados. Os cromossomos foram classificados de
9 acordo com Levan et al. (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos
10 (st) ou acrocêntricos (a), com base na relação de braços (RB) apresentada (m: RB= 1,0-1,7; SM:
11 RB=1,71-3,0; ST: RB=3,01-7,0; A: RB>7,0).



Resultados e Discussão

1 **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

2 Os resultados obtidos no presente estudo e a sua discussão encontram-se subdivididos na
3 forma de 4 capítulos, os quais correspondem aos artigos científicos listados abaixo que já se
4 encontram publicados, aceitos ou submetidos.

- **1.** Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB (2014) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. **Plos One** 9(3): e90946.
- **2.** Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Coiffi MB (2016) W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triporthidae) - an ongoing process narrated by repetitive sequences. **Journal of Heredity** 107: 342-348.
- **3.** Yano CF, Bertollo LAC, Rebordinos L, Merlo MA, Liehr T, Portela-Bens S, Cioffi MB. Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 snDNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae): high variability and particular syntenic organization (Submetido).
- **4.** Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, Cioffi MB. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae). **Heredity** DOI: doi:10.5061/dryad.8m201

Capítulo 1

Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes

Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB

Plos One 9(3): e90946 (2014)

Abstract

1 Repetitive DNA sequences play an important role in the structural and functional
2 organization of chromosomes, especially in sex chromosome differentiation. The genus
3 *Triportheus* represents an interesting model for such studies because all of its species
4 analyzed so far contain a ZZ/ZW sex chromosome system. A close relationship has been
5 found between the differentiation of the W chromosome and heterochromatinization, with the
6 involvement of different types of repetitive DNA in this process. This study investigated
7 several aspects of this association in the W chromosome of *Triportheus trifurcatus* ($2n = 52$
8 chromosomes), including the cytogenetic mapping of repetitive DNAs such as telomeric
9 sequences (TTAGGG)_n, microsatellites and retrotransposons. A remarkable heterochromatic
10 segment on the W chromosome was observed with a preferential accumulation of (CAC)₁₀,
11 (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀ and (TA)₁₅. The retrotransposons *Rex1* and *Rex3* showed a
12 general distribution pattern in the chromosomes, and *Rex6* showed a different distribution on
13 the W chromosome. The telomeric repeat (TTAGGG)_n was highly evident in both telomeres
14 of all chromosomes without the occurrence of ITS. Thus, the differentiation of the W
15 chromosome of *T. trifurcatus* is clearly associated with the formation of heterochromatin and
16 different types of repetitive DNA, suggesting that these elements had a prominent role in this
17 evolutionary process.

18 **Keywords:** FISH, microsatellites, sex chromosome evolution, transposable elements, ZW
19 system.

1 **Introduction**

2 Fishes show huge chromosome diversity with interspecific variation in diploid numbers,
3 the presence or absence of sex and supernumerary chromosomes and other polymorphic
4 conditions (Oliveira et al. 2009). However, most fish species do not show differentiated sex
5 chromosomes. In fact, approximately only 10% of studied species present heteromorphic sex
6 chromosomes, with the female heterogamety representing the most common case (Devlin &
7 Nagahama, 2002). Included in this group is the Neotropical genus *Triportheus*. This genus is
8 widely distributed in South America and can be found from Colombia to Uruguay. Sixteen
9 species have been described for this group (Malabarba, 2004); thus far, all show a conserved
10 karyotype with $2n=52$ and are composed of meta- submetacentric chromosomes together with
11 a well-differentiated ZZ/ZW sex chromosome system (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro,
12 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al. 2001; Artoni & Bertollo, 2002; Nirchio et al. 2007;
13 Diniz et al. 2008a; 2008b).

14 High heterochromatin formation is clearly associated with W chromosome
15 differentiation in *Triportheus*, similar to the majority of the ZW sex systems reported to date
16 for fishes (reviewed in Cioffi et al. 2011a). Among the different *Triportheus* species, the Z
17 chromosome is conserved, but the W chromosome differs in size (from similar to the Z
18 chromosome to much smaller) and in the amount and distribution of C-positive
19 heterochromatin (Artoni et al. 2001; Diniz et al. 2008a). Therefore, the evolutionary dynamics
20 of sex chromosomes in *Triportheus* appear to be similar to those of higher vertebrates,
21 considering that several DNA repeats accumulate in the sex-specific chromosome, which
22 results in its heterochromatinization. In some groups, however, the sex-specific W chromosome
23 can also be larger than the Z chromosome as a result of a huge heterochromatin amplification.

1 Such amplification has been observed in some lizard (Ezaz et al. 2009) and fish species,
2 remarkably including those from the *Leporinus* genus and the Parodontidae family reviewed
3 in (Cioffi et al. 2011a).

4 The close relationship between heterochromatin formation and sex chromosome
5 differentiation is widely known. In fact, during sex chromosome evolution, selection favors the
6 restriction of sex-determining loci to a chromosome of the sex pair through recombination
7 suppression (Ohno, 1967). With the absence of recombination, repetitive sequences are
8 amplified in the non-recombinant region, resulting in the heterochromatinization of the sex-
9 specific chromosome, perhaps as a cellular defense against this amplification (Charlesworth et
10 al. 1994). The heterochromatin of sex chromosomes has a complex composition that mainly
11 contains *in tandem* repetitive sequences and interspersed elements, most of which are
12 retrotransposons (Lippman et al. 2004). Thus, repetitive DNA sequences play an important role
13 in the structural and functional organization of heterochromatin and are key elements for the
14 understanding of sex chromosome differentiation in many vertebrate species (Schueler et al.
15 2001; Biémont & Vieira, 2006).

16 As in other vertebrates, the heterochromatin of the fish sex chromosomes is also
17 enriched with repetitive DNA sequences, as shown by the isolation and mapping of several sex-
18 specific repetitive DNAs in this group. Such data have proven to be important tools for
19 clarifying the dynamic processes involved in sex chromosome differentiation and for
20 understanding genome evolution in eukaryotes (reviewed in Cioffi & Bertollo, 2012).
21 Therefore, in this study, we mapped 12 repetitive DNA sequences in the species *T.*
22 *trifurcatus* to analyze the degree of repetitive DNA accumulation on the differentiated ZW
23 chromosomes and their association with the evolution of this sex system. The results show that

1 the differentiation of the W chromosome is clearly associated with the formation of
2 heterochromatin and different types of repetitive DNA, suggesting that these elements had a
3 prominent role in this evolutionary process.

1 **Materials and Methods**

2 Material Collection and Classical Analysis

3 Seventeen individuals of *Triportheus trifurcatus* (nine males and eight females) from
4 the Araguaia River (Brazil) were analyzed. The specimens were caught using a hand-net, and
5 after capture, the animals were placed in sealed plastic bags containing oxygen and clean water
6 and transported to the research station. The experiments followed ethical protocols, and
7 anesthesia with clove oil was administered prior to sacrificing the animals to minimize
8 suffering. The process was approved by the FAPESP committee under no. 2012/01778-2, and
9 the collecting permit was obtained from SISBIO under no. 10538-1. Mitotic chromosomes
10 were obtained from the anterior portion of the kidney, according to Bertollo et al. (1978). In
11 addition to the standard Giemsa staining, the C-banding method (Sumner, 1972) was employed
12 to detect C-positive heterochromatin.

13 Probe Preparation

14 Oligonucleotide probes containing microsatellite sequences (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀,
15 (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (CGG)₁₀, (GA)₁₅, (GAA)₁₀ and (TA)₁₅ were directly labeled with Cy5
16 during synthesis by Sigma (St. Louis, MO, USA), as described by Kubat et al. (2008). The
17 retrotransposable elements *Rex1*, 3 and 6 were obtained by polymerase chain reaction
18 (PCR) (Volf et al. 1999). The 18S rDNA probe, corresponding to a 1,400-bp segment of the
19 18S rRNA gene, was obtained via PCR from the nuclear DNA according to Cioffi et al. (2009).
20 All probes were labeled with DIG-11-dUTP using DIG-Nick-translation Mix (Roche,
21 Mannheim, Germany) and were used for the fluorescence *in situ* hybridization (FISH)
22 experiments.

1 Fluorescence in situ Hybridization and Signal Detection

2 FISH was conducted as follows: slides with fixed chromosomes were maintained at 37
3 °C for 1 hour and were then incubated with RNase A (10 mg/ml) for 1 hour at 37 °C in a moist
4 chamber. The slides were then washed with PBS for 5 minutes, and 0.005% pepsin was applied
5 for 10 minutes at room temperature. The slides were then washed again with PBS, and the
6 material was fixed with 1% formaldehyde at room temperature for 10 minutes. After further
7 washing, the slides were dehydrated for 2 minutes each in sequential baths of 70%, 85% and
8 100% ethanol. The chromosomal DNA was denatured in 70% formamide/2xSSC for 3 minutes
9 at 72 °C. The slides were dehydrated again in a cold ethanol series (70%, 85% and 100%) for 5
10 minutes each. The hybridization mixture, containing 100 ng denatured probe, 10 mg/ml dextran
11 sulfate, 2 x SSC and 50% formamide in a final volume of 30 µl, was heated to 95 °C for 10
12 minutes and then applied to the slides. Hybridization was performed for a period of 16–18
13 hours at 37 °C in a moist chamber. After hybridization, the slides were washed for 5 minutes
14 with 2 x SSC and then rinsed quickly in PBS. Signal detection was performed using anti-
15 digoxigenin-FITC (Roche) for the 18S rDNA probe and anti-digoxigenin rhodamine (Roche)
16 for the *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* probes. Telomeric (TTAGGG)_n repeats were detected using a
17 FITC-labeled PNA probe (DAKO, Telomere PNA FISH Kit/FITC, Cat. No. K5325) according
18 to the manufacturer's recommendations. Subsequently, the slides were dehydrated again in an
19 ethanol series (70%, 85% and 100%) for 2 minutes each. After the slides were completely dry,
20 the chromosomes were counterstained with DAPI/Antifading (1.2 mg/ml, Vector Laboratories).

1 Microscopy Analyses

2 Approximately 30 metaphase spreads were analyzed to confirm the diploid
3 chromosome number, karyotype structure and FISH results. Images were captured on an
4 Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan) using CoolSNAP and the
5 Image Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The chromosomes
6 were classified as metacentric or submetacentric according to their arm ratios (Levan et al.
7 1964).

1 **Results**

2 *Triportheus trifurcatus* showed $2n=52$ chromosomes in both male and female specimens,
3 with the karyotype basically composed of meta/submetacentric chromosomes and a
4 heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system. The Z chromosome is metacentric and the
5 largest of the karyotype, while the W chromosome is submetacentric with a significant
6 reduction in size (**Figure 1**). C-positive heterochromatin (C-bands) was observed in the
7 centromeric region of most chromosomes. The Z chromosome also shows additional
8 heterochromatic regions in both telomeres, while the W is almost entirely heterochromatic,
9 except for its small short arm (**Figure 1**).

10 *Chromosomal Mapping of Repetitive Elements*

11 The chromosomal mapping of microsatellite sequences generally showed the same
12 distribution pattern between the autosomes of males and females (**Figures 2 and 3**). Most
13 microsatellites were restricted to the telomeric regions, although some presented a more
14 dispersed pattern in both the autosomes and the sex chromosomes. However, the W
15 chromosome differed from the autosomes and the Z chromosome by a large accumulation of
16 four microsatellites. Of these, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, and (TA)₁₅ presented strong signals in the
17 centromeric/pericentromeric region, while the microsatellite (CGG)₁₀ accumulated across
18 almost its entire length (**Figure 2**). The Z and the W chromosomes showed a strong and
19 dispersed differential accumulation of the microsatellite (GAA)₁₀ (**Figures 2 and 3**). The
20 microsatellites (CAA)₁₅, (CAT)₁₀ and (GA)₁₅ showed similar hybridization patterns between
21 autosomes and sex chromosomes. Conversely, the microsatellite (CA)₁₅ showed interstitial
22 signals in the long arm of the W chromosome, which is different from that observed in the

1 autosomes and Z chromosome, where its accumulation was restricted to telomeric
2 heterochromatin (**Figures 2 and 3**).

3 The retrotransposons *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* showed a dispersed distribution on most
4 chromosomes of the complement (including the Z chromosome) and a distribution in small
5 clusters in the telomeric regions of other chromosomes. However, while Rex 3 was widely
6 distributed throughout the whole W chromosome (with more intense accumulation in the
7 telomeric region of the long arms), *Rex1* and *6* preferentially accumulated in the long and short
8 arms of the W chromosome, respectively. The mapping of the telomeric repeats (TTAGGG)_n
9 showed signals in both telomeres of all chromosomes (**Figures 4 and 5**). Notably, a
10 conspicuous 18S rDNA cistron occurs on the W chromosome, occupying a large extent of its
11 long arm (**Figure 5**). As a result, in all FISH experiments, the 18S rDNA probe was
12 simultaneously applied to correctly identify the W chromosome (data not shown).

1 **Discussion**

2 One of the steps for sex chromosomes evolution is the accumulation of repetitive DNAs
3 that is accompanied by a heterochromatinization process. The accumulation of repetitive
4 elements on the sex chromosomes is favored by the absence or low frequency of
5 recombination, which is caused by the structural and/or DNA changes that occur during the sex
6 chromosome's differentiation process (Charlesworth et al. 2005). Despite this general rule,
7 consensus indicates that not all events involved in the differentiation of the Y chromosome are
8 necessarily valid for W chromosome differentiation (Ezaz et al. 2009; Cioffi et al. 2011a). In
9 fact, sex chromosome evolutionary mechanisms occurred independently among lineages,
10 including plants, insects, fishes, birds and mammals (Vallender & Lahn, 2004). Among fishes,
11 this scenario is evident because the W chromosome presents different morphologies and sizes
12 and, in some cases, is larger than the Z chromosome (Feldberg et al. 1987; Venere et al. 2004,
13 Silva et al. 2009; Bellafronte et al. 2012).

14 The heterochromatinization of the W chromosome that occurs in *T. trifurcatus* is also
15 observed in other species of this genus, but with distinct distribution patterns. In contrast, the Z
16 chromosomes of all species show the conserved feature of heterochromatin that is present only
17 in both telomeric regions (Artoni et al. 2001; Diniz et al. 2008b). Moreover, the occurrence of a
18 conspicuous 18S rDNA cistron on the W chromosome may correspond to a shared condition
19 in *Triportheus* because all of the species analyzed to date showed this characteristic (Artoni &
20 Bertollo, 2002; Marquioni et al. 2013), with the exception of *T. venezuelensis* (Nirchio et al.
21 2007). Certainly, the increase in heterochromatin has driven the differentiation of the W
22 chromosome, as also occurs in other ZW systems in fishes such as *Thoracocharax*,
23 *Parodon*, *Leporinus* and *Apareiodon* (Cioffi et al. 2011a). Additionally, the absence of

1 interstitial (TTAGGG)_n signals demonstrates that the origin of the sex system in this species
2 did not involve rearrangements such as fusions and fissions, which is different from the
3 scenario found in the formation of multiple sex chromosomes reviewed in Cioffi et al.
4 (2012a) (**Figure 4**).

5 In addition to studies related to genes linked to the sex chromosomes, other research has
6 been conducted on the mapping of repetitive DNA sequences. These approaches verified
7 through differential accumulation that these sequences have a prominent role in the evolution
8 of sex-specific chromosomes (Volff et al. 1999; Cioffi et al. 2012a). Modern cytogenetic
9 techniques that are more sensitive than C-banding have enabled the characterization of sex
10 chromosomes across a wider range of species (Ezaz et al. 2009). The FISH technique clearly
11 demonstrated that some microsatellites accumulated preferentially in the heterochromatic
12 region of the W chromosome, highlighting their probable role in the differentiation of these
13 chromosomes (**Figures 2 and 5**). This same feature was observed in other *Triporthesus* species,
14 such as *T. auritus*, where a large accumulation of several microsatellites was found on the W
15 chromosome (Cioffi et al. 2012c). In *T. auritus*, only the (C)₃₀ microsatellite accumulated
16 equally in both the W chromosome and the autosomes, while eight other microsatellites showed
17 a large accumulation in the W chromosome, particularly in the heterochromatic regions, but not
18 in other chromosomes. Concerning the Z chromosome, the distribution of the microsatellite
19 repeats was similar to that found in the autosomes, thus reinforcing the hypothesis that the
20 differential microsatellite accumulation between the Z and W was an essential step for the
21 differentiation of the sex pair in *Triporthesus* species.

22 In other fish species, microsatellites also preferentially accumulated in the
23 heteromorphic sex chromosomes. In fact, several microsatellites showed preferential

1 accumulation in the heterochromatic region of the W chromosome
2 in *Leporinus* species (Poltronieri et al. 2014). Similarly, the same pattern observed for the
3 microsatellite (GAA)₁₀ in *T. trifurcatus* was observed in the wolf fish *H. malabaricus*, with a
4 similar accumulation in both the X and Y chromosomes (Cioffi et al. 2011c). Thus, it is clear
5 that the accumulation of microsatellites plays an important role in sex chromosome
6 differentiation. However, microsatellites can present identical or different distribution patterns
7 on the sex chromosomes of different species. For example, while microsatellites accumulate
8 preferentially in the sex-specific chromosome in some species, in others, they have a
9 widespread distribution among all karyotypes (Kubat et al. 2008; Cioffi et al. 2011c; Pokorná et
10 al. 2011). Indeed, microsatellites are dynamic components of the genome and are formed by
11 distinct molecular processes such as DNA replication slippage or the insertion or deletion of
12 one or more repeats that can also drive their genomic accumulation and distribution (Levinson
13 & Gutman, 1987; Ellegren, 2000).

14 Transposable elements have the ability to copy or transpose themselves into non-
15 homologous regions of a genome. These sequences can also show different evolutionary
16 dynamics that result in small to large genomic fractions (Schueler et al. 2001). Among many
17 retrotransposons, the *Rex* family has been widely analyzed in different fish species because its
18 family members are abundant, and their distribution varies from a scattered pattern to
19 preferential accumulation in certain regions of the chromosomes (reviewed in Cioffi &
20 Bertollo, 2012). Our present data show that the distinct *Rex* elements accumulated in different
21 ways in the W and in the other chromosomes of *T. trifurcatus* (**Figure 4**). Interestingly, instead
22 of presenting the typical pattern of microsatellites, i.e., accumulation in the W
23 chromosome, *Rex6* sequences were restricted to a few clusters in the W chromosome. As for

1 the *Rex1* and *Rex3* elements, no differential accumulation between the W and the other
2 chromosomes was observed, suggesting that, at least for this TE family, their evolutionary
3 dynamics may be more diverse than previously assumed.

4 The analysis of the genomic composition of several microsatellites and retrotransposons
5 in the fish *T. trifurcatus* helps us better understand the correlation of repetitive DNAs with the
6 differentiation of the ZW sex pair. A strict correlation has clearly been shown between the
7 differentiation of the sex-specific W chromosome and the accumulation of several DNA
8 repeats, resulting in the heterochromatinization of this chromosome.

9

10 **Funding Statement**

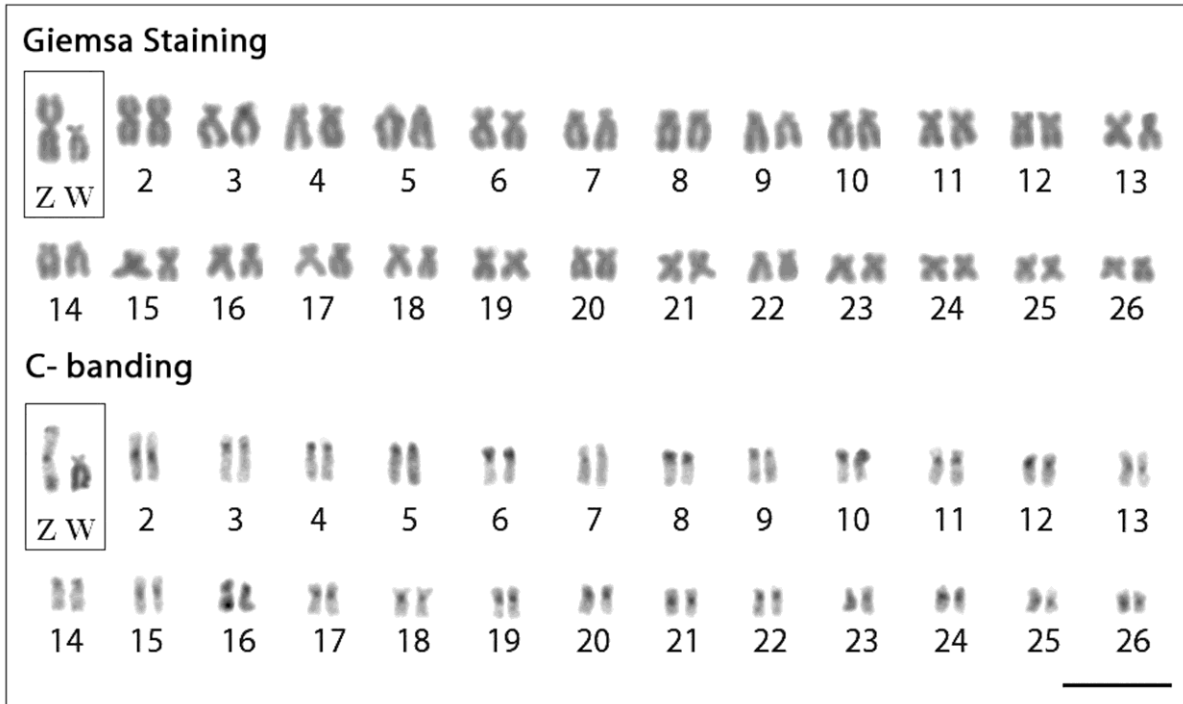
11 This work was supported by the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de
12 Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do
13 Estado de São Paulo), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
14 Superior). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to
15 publish, or preparation of the manuscript.

16

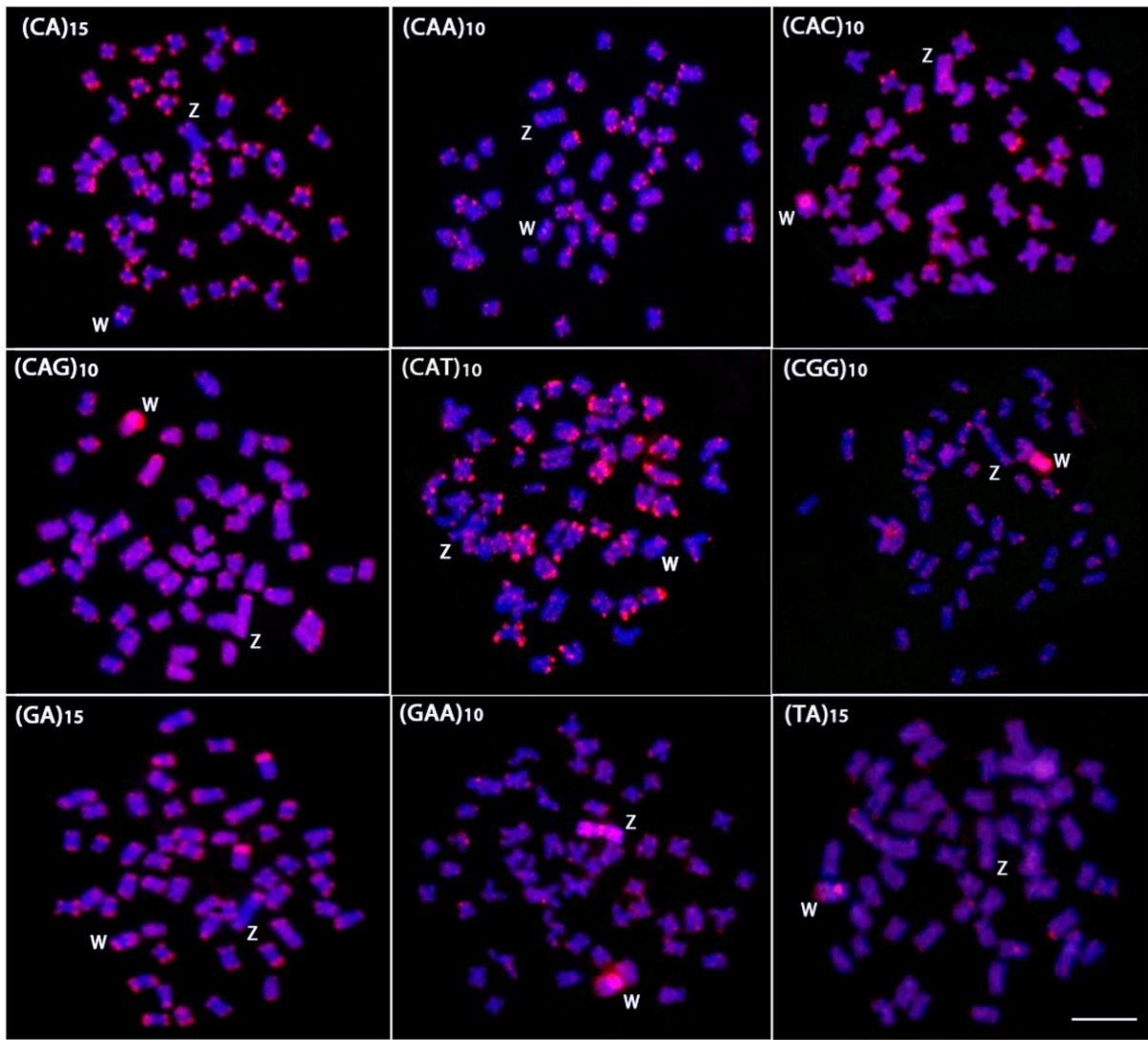
17 **Referências Bibliográficas**

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

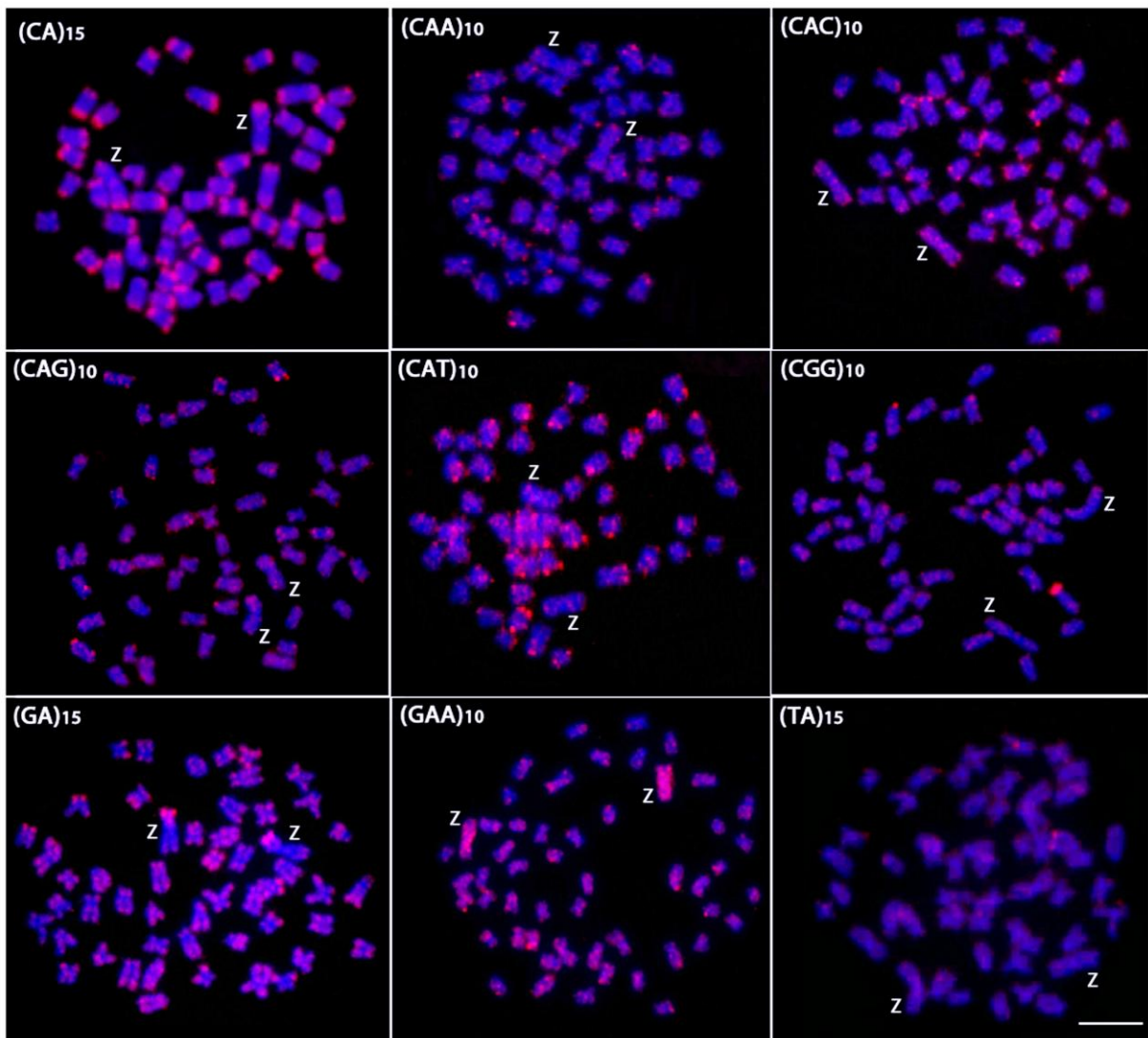
Figures



1 **Figure 1.** Karyotypes of *Triportheus trifurcatus* female arranged from Giemsa-stained (above)
2 and C-banded chromosomes (below). The ZW sex chromosomes are boxed. Note the
3 conspicuous C-positive heterochromatin accumulated on the W chromosome. Bar=5 μm.



1 **Figure 2.** Mitotic metaphase chromosomes of *Triportheus trifurcatus* female hybridized with
2 different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Chromosomes were counterstained
3 with DAPI (blue) and microsatellite probes were directly labeled with Cy3 during synthesis
4 (red signals). Letters mark the Z and W chromosomes. Bar=5 μ m.



1 **Figure 3.** Mitotic metaphase chromosomes of *Triportheus trifurcatus* male hybridized with
2 different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Chromosomes were counterstained
3 with DAPI (blue) and microsatellite probes were directly labeled with Cy3 during synthesis
4 (red signals). Letters mark the Z chromosomes. Bar=5 μ m.

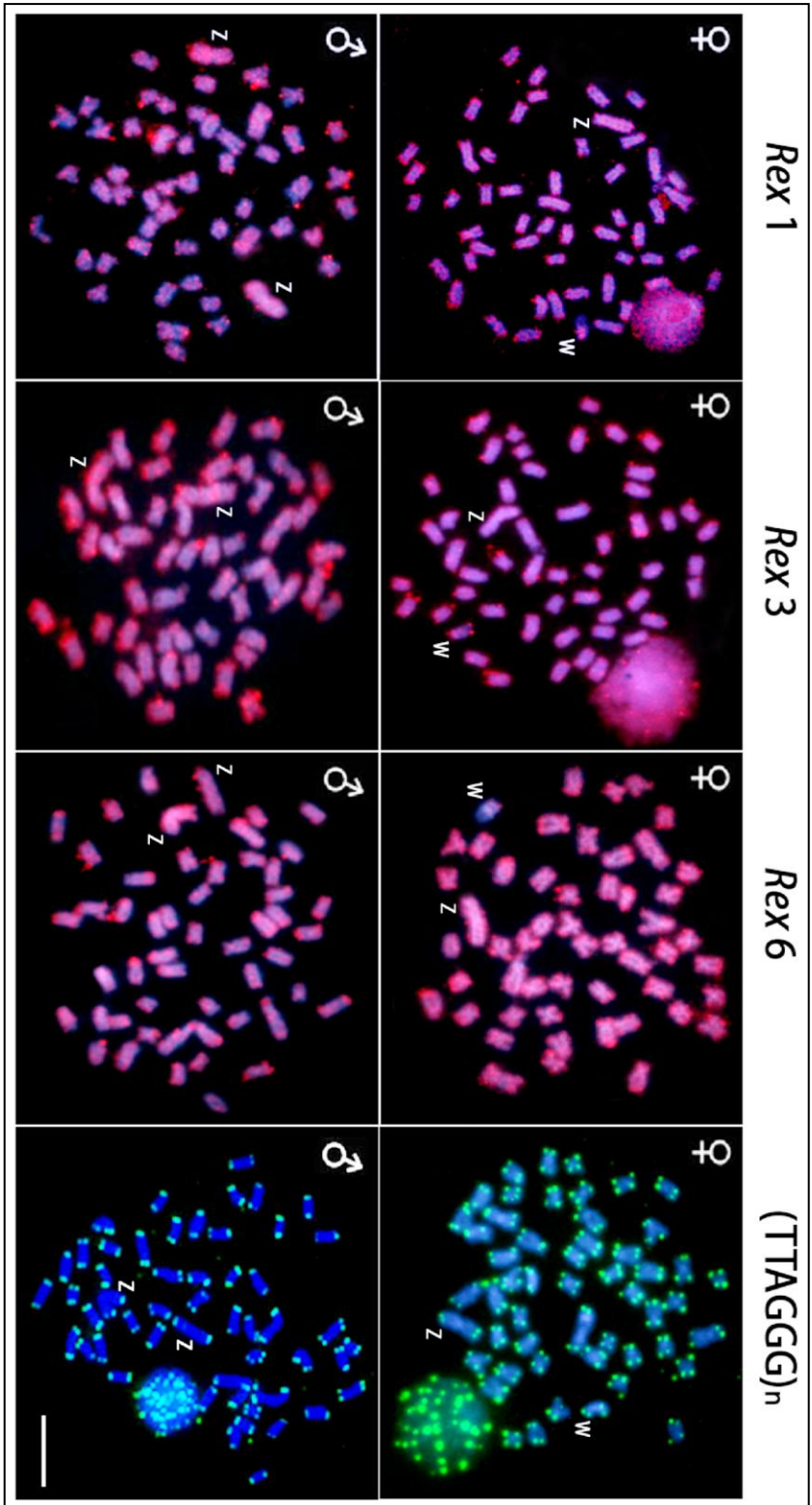
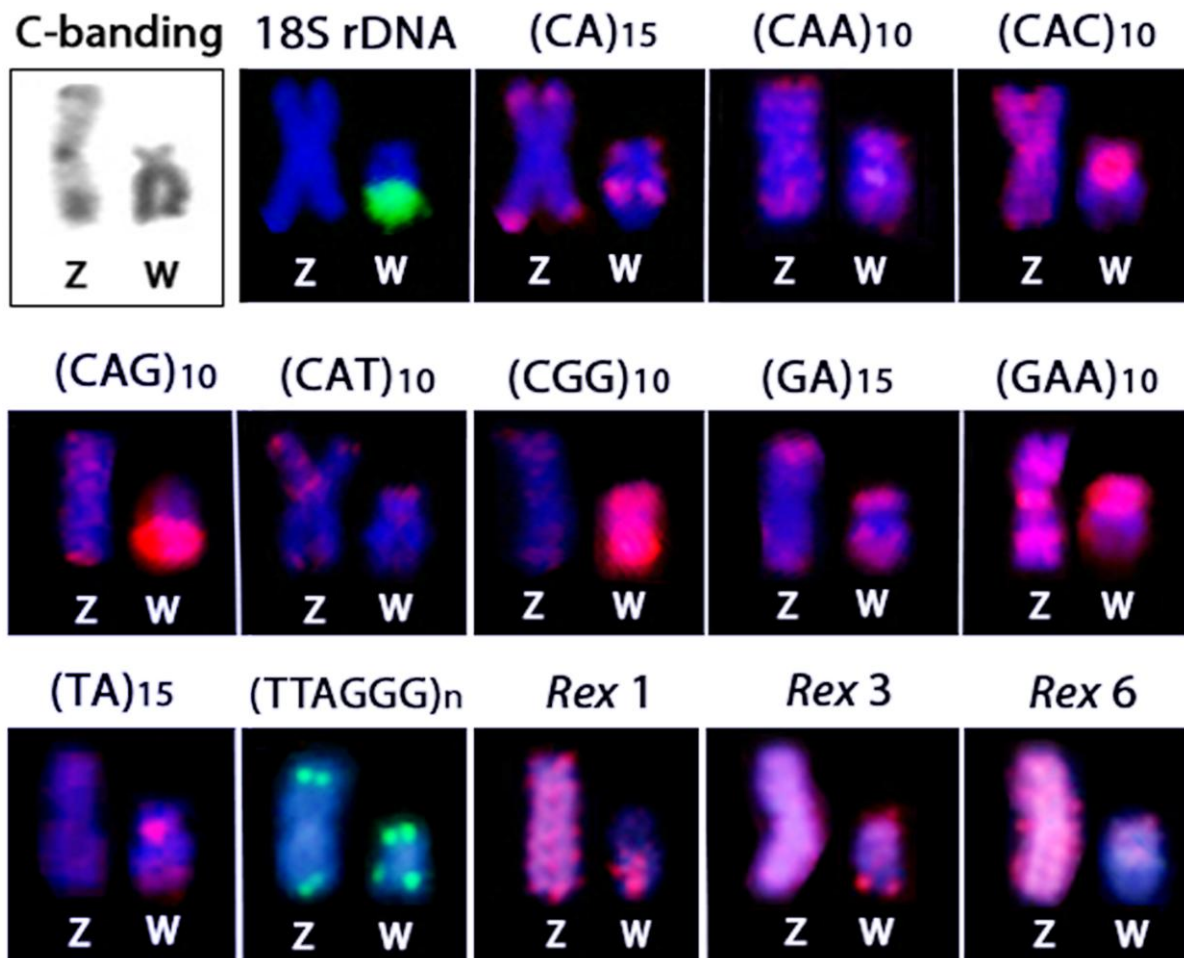


Figure 4. Metaphase plates of *Triportheus trifurcatus* probed with *Rex1*, *Rex3*, *Rex6*, and telomeric (TTAGGG)_n sequences. These sequences show the general distribution pattern of these repeats on the chromosomes. Letters mark the Z and W chromosomes. Bar=5 µm.



1 **Figure 5.** C-banding and the repetitive DNA distribution between the Z and W chromosomes
2 of *Triportheus trifurcatus*. Note the preferential accumulation of heterochromatin and some
3 repeats on the W chromosomes.

Capítulo 2

W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triporthidae) - an ongoing process narrated by repetitive sequences

Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Cioffi MB
Journal of Heredity 107:342-348 (2016)

Abstract

1 Characterizing the abundance and genomic distribution of repetitive DNAs provides
2 information on genome evolution, especially regarding the origin and differentiation of sex
3 chromosomes. *Triportheus* fishes offer a useful model to explore the evolution of sex
4 chromosomes, since they represent a monophyletic group in which all species share a ZZ/ZW
5 sex chromosome system. In this study, we analyzed the distribution of 13 classes of repetitive
6 DNA sequences by FISH, including microsatellites, rDNAs and transposable elements in six
7 *Triportheus* species, in order to investigate the fate of the sex specific chromosome among
8 them. The current findings show the dynamic differentiation process of the W chromosome
9 concerning changes in the repetitive DNA fraction of the heterochromatin. The differential
10 accumulation of the same class of repeats on this chromosome, in both nearby and distant
11 species, reflects the inherent dynamism of the microsatellites, as well as the plasticity that
12 shapes the evolutionary history of the sex chromosomes, even among close related species
13 sharing a same sex chromosome system.

14 **Keywords:** FISH, microsatellites, retrotransposons, sex chromosomes differentiation.

1 **Introduction**

2 Sex chromosomes and their differentiation are valuable tools for evolutionary genetics.
3 Well-differentiated sex chromosomes, comprising male and female heterogamety, are found in
4 mammals and birds, respectively, contrasting with the wide range of sex chromosome systems
5 found in fishes, lizards, plants and insects (Graves, 2008). Indeed, fishes display a broad
6 scenario, which includes undifferentiated, early or highly differentiated sex chromosomes,
7 simple and multiple sex chromosome systems and male or female heterogamety (Thorgaard,
8 1983; Bertollo et al. 2000; Artoni et al. 2001; Phillips & Ráb, 2001; Silva et al. 2009; Cioffi et
9 al. 2011a; 2011c).

10 Sex chromosomes are thought to evolve from an ancestral autosomal pair, in which
11 structural and/or DNA changes occur in the sex specific chromosome. As a general rule, partial
12 or complete suppression of recombination in the sex pair is required as an essential step in this
13 process (Kobayashi et al. 2013). With the absence of recombination, heterochromatin and
14 repetitive sequences can be amplified, playing an important role in the differentiation of the sex
15 specific chromosome (Charlesworth et al. 2005).

16 Relevant evolutionary information has been provided by repetitive DNA analyzes when
17 focusing the origin and differentiation of sex chromosomes (Itoh et al. 2008; Cioffi et al.
18 2011c; Kejnovský et al. 2013). This DNA fraction is composed of satellite-, minisatellite- and
19 microsatellite-DNA organized in tandem and dispersed repeats, which include transposable
20 elements (TEs) (Jurka et al. 2007; López-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Microsatellites are
21 dynamic components of prokaryotic and eukaryotic genomes, mainly composed of mono-, di-,
22 tri- and tetranucleotide repeats (Ellegren, 2004). On the other hand, TEs have approximately
23 20-30 kb in size and are inserted randomly into the DNA (Jurka et al. 2007).

1 Fishes from the *Triportheus* genus (Characiformes, Triporthidae) offer a useful model
2 to analyze sex chromosomes evolution, since they represent a particular group in which all
3 analyzed species share a ZZ/ZW sex chromosome system (Artoni et al. 2001). The basal origin
4 of this system is reinforced by the interspecific homology of the Z chromosome within the
5 genus, as evidenced by whole chromosome painting in five *Triportheus* species using the Z
6 chromosome of *T. nematurus* as a probe (Diniz et al. 2008b). In all *Triportheus* species, the W
7 chromosome is always smaller than the Z one, almost entirely heterochromatic (Artoni et al.
8 2001) and carrying 18S rDNA sites on their long arms (Marquioni et al. 2013), although
9 differing in sizes and amounts of heterochromatin (Artoni et al. 2001; Cioffi et al. 2012c; Yano
10 et al. 2014a).

11 In this study, we analyzed the distribution of 13 classes of repetitive DNA sequences,
12 including microsatellites, rDNAs and TEs in the sex chromosomes of six *Triportheus* species,
13 some of them now analyzed for the first time. The differential distribution of repetitive
14 elements on the W chromosomes indicated that it has differentiated from the Z in a different
15 fashion in each species, highlighting the ongoing dynamic differentiation process of this sex
16 specific chromosome.

1 **Material and Methods**

2 Material collection and conventional chromosome analysis

3 Females and males of *Triportheus albus*, *T. guentheri*, *T. nematurus*, *T. pantanensis*, *T.*
4 *aff. rotundatus* and *T. signatus* from different Brazilian river basins were analyzed. The
5 samples were collected with the authorization of the Brazilian environmental agency
6 ICMBIO/SISBIO (License number 48628-2). All species were properly identified by
7 morphological criteria and deposited in the fish museum of the Laboratory of Biology and
8 Genetic of Fishes of the Universidade Estadual Paulista (UNESP – Botucatu – SP), with the
9 respective deposit numbers (**Table 1**). The experiments followed ethical conducts, in
10 accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal
11 de São Carlos (Process number CEUA 1853260315). Mitotic chromosomes were obtained from
12 cells of the anterior portion of the kidney, according to Bertollo et al. (2015). In addition to
13 standard Giemsa staining, C-banding method was also applied to detect C-positive
14 heterochromatin (Sumner, 1972).

15 Probe preparation

16 Oligonucleotide probes containing microsatellite sequences (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GC)₁₅,
17 (TA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (CGG)₁₀ and (GAA)₁₀ were directly labeled with
18 Cy5 during synthesis (Sigma, St. Louis, MO, USA), as described by Kubat et al. (2008). The
19 retrotransposable elements *Rex1* and *Rex6* were obtained by PCR according to Volff et al.
20 (1999). The 18S rDNA probe, corresponding to a 1,400-bp segment of the 18S rRNA gene,
21 was obtained via PCR from the nuclear DNA of *T. nematurus*, according to Cioffi et al. (2009).
22 All these probes were labeled with Digoxigenin, DIG-11-dUTP (2'-Deoxyuridine-5'-

1 Triphosphate) using DIG-Nick-translation Mix (Roche) and used for the fluorescence in situ
2 hybridization (FISH) experiments.

3 *Fluorescence in situ hybridization and signal detection*

4 For FISH method, the slides with the fixed chromosomes were first incubated at 37 °C
5 for 1 hour. Subsequently, they were treated with RNase (10 mg/ml) for 1 hour at 37 °C in a
6 moist chamber. Next a 5-minute wash using 1xPBS was performed followed by adding of
7 0.005% pepsin solution to the slides for 10 minutes at room temperature (RT). The slides were
8 then washed again with 1 x PBS. As final step of pretreatment the material was fixed with 1%
9 formaldehyde at RT for 10 minutes. After further washing, the slides were dehydrated with
10 70%, 85% and 100% ethanol, 2 minutes each. Afterwards, chromosomal DNA was denatured
11 in 70% formamide/2xSSC for 3 minutes at 72 °C. The slides were dehydrated again in a cold
12 ethanol series (70%, 85% and 100%), 5 minutes each. The hybridization mixture, containing
13 100 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2 x SSC and 50% formamide (final
14 volume of 30 µl), were heated to 95 °C for 10 minutes and then applied on the slides.
15 Hybridization was performed for a period of 16-18 hours at 37 °C in a moist chamber. After
16 hybridization, the slides were washed for 5 minutes with 2xSSC and then rinsed quickly in
17 1xPBS. The detection was performed using anti-digoxigenin-FITC (Roche) for the *Rex1* probe
18 and anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) for the *Rex6* probe. The signal for the 18S rDNA
19 probe was detected using anti-digoxigenin-FITC (Roche) for simultaneous use with *Rex6* probe
20 or anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) for simultaneous use with *Rex1* probe. After the
21 detection, the slides were washed for 5 minutes in 4xSSCT using a shaker at RT, for 3 times.
22 Subsequently, the slides were dehydrated again in an ethanol series (70%, 85% and 100%), 2

1 minutes each. After the complete drying of the slides, the chromosomes were counterstained
2 with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)/antifade (1.2 mg/ml, Vector Laboratories).

3 Microscopy analyses

4 At least 30 metaphase spreads were analyzed to confirm the diploid chromosome
5 numbers, karyotype structure and FISH results. Images were captured by the CoolSNAP
6 system software, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), coupled
7 to an Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan). The chromosomes
8 were classified as metacentric (m), submetacentric (sm) or subtelocentric (st) according to their
9 arm ratios (Levan et al. 1964).

1 **Results**

2 Karyotyping and C-banding of *T. pantanensis* and *T. aff. rotundatus*

3 *Triportheus pantanensis* and *T. aff. rotundatus* were cytogenetically analyzed for the
4 first time in the present study. They have identical karyotype features to the other *Triportheus*
5 species, i.e., $2n = 52$ in males and females, composed mainly by m/sm and some st
6 chromosomes, with a clear heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system. The Z
7 chromosome is m and the largest one of the karyotype, while the W is sm and smaller than Z
8 (**Figure 1**). The C-positive heterochromatin has a predominant localization on the centromeric
9 region of majority of chromosome pairs. The Z chromosome also has additional
10 heterochromatin in both telomeric regions, while the W chromosome is almost entirely
11 heterochromatic, except for its short arms (**Figures 1,3**). These general patterns of Z and W
12 chromosomes are also shared by the other *Triportheus* species until now analyzed.

13 Chromosomal mapping of repetitive elements

14 Several microsatellites showed preferential accumulation on the W chromosome.
15 Indeed, this chromosome presents a remarkable accumulation of the $(CA)_n$ and $(GA)_n$
16 microsatellites in all species (**Figure 2**). In a particular way, differential signals on the W
17 chromosome was showed by $(CAC)_n$ and $(CG)_n$ microsatellites in *T. albus* and $(CAT)_n$ in *T.*
18 *nematurus*, while $(CAG)_n$ and $(GAA)_n$ showed large accumulation in *T. signatus* (**Figure 2**). In
19 relation to the Z chromosome, only $(GAA)_n$ repeats had a differential accumulation in *T. albus*,
20 *T. aff. rotundatus* and *T. signatus*.

21 Concerning autosomal pairs, the $(CA)_n$ and $(GA)_n$ microsatellites showed a general
22 accumulation in the terminal position of all chromosomes of the six species. In addition, a

1 compartmentalized accumulation of (CAT)_n was found on four chromosomal pairs of *T.*
2 *guentheri*. The remaining microsatellites had a well-dispersed pattern or very small signals in
3 the terminal region of some specific chromosomes (**Supplementary Figure T1-T6**).

4 The retrotransposons *Rex1* and *Rex6* did not show preferential accumulation on the W
5 chromosome (**Figure 3**). In all species, scattered signals of both TEs were observed throughout
6 the length of all chromosomes, in addition to small *Rex6* terminal clusters in some other ones
7 (**Supplementary Figure T7**).

8 18S rDNA cistrons also occur on the long arms of the W chromosome in all *Triportheus*
9 species (**Figure 3**). The mapping of this rDNA was simultaneously applied in all FISH
10 experiments in order to properly identify this chromosome.

1 **Discussion**

2 ***Distribution of repetitive DNAs in the sex chromosomes***

3 The importance of using microsatellites investigations to analyze sex chromosome
4 differentiation has been emphasized in several groups of plants and animals (Schlötterer, 2000;
5 Pokorná et al. 2011; Yano et al. 2014b; MacDonald et al. 2014). The intrinsic ability of
6 microsatellites for expansion in the non-recombining chromosome regions has been supported
7 in some species, such as the plant belonging to the order Caryophyllales, *Rumex acetosa*, where
8 the accumulation of (CA)_n and (CAA)_n repeats in the young Y chromosome was associated
9 with its differentiation process (Kejnovský et al. 2013). Although not yet completely
10 enlightened, the DNA slippage, or the misalignment of repetitive DNAs, has been usually
11 linked with the initial microsatellite expansion (Kejnovský et al. 2013). Such slippage errors
12 may be corrected during recombination, but if recombination is suppressed, this provides the
13 opportunity for further expansion of larger arrays of microsatellites (Charlesworth et al. 1994;
14 Kejnovský et al. 2013). Thus, it is possible that microsatellite accumulation represents one of
15 the factors acting on the differentiation process of the sex-specific chromosome.

16 In *Triportheus* species, a pronounced expansion of (CA)_n and (GA)_n repeats generally
17 occurs in both sex chromosomes. In addition, a large accumulation of some specific
18 microsatellites is also found in the W chromosome, as (CAC)_n and (CG)_n in *T. albus*, (CAG)_n
19 and (GAA)_n in *T. signatus* and (CAT)_n in *T. nematurus*, indicating that the differentiation of
20 this chromosome is clearly associated with microsatellites accumulation (**Figure 2**). Similarly,
21 the Z chromosome of *T. albus*, *T. aff. rotundatus* and *T. signatus*, shares a differential
22 accumulation of (GAA)_n repeats, as also previously found in *T. trifurcatus* (Yano et al. 2014a).

1 Dinucleotides are the most frequent short repeats and, among them, (CA)_n microsatellite
2 prevails in all vertebrates and arthropods (Tóth et al. 2000), followed by (GA)_n and (TA)_n
3 (Ellegren, 2004). The larger distribution of dinucleotides than other repeats is probably due to
4 their higher instability, allowing more slippage mechanisms (Katti et al. 2001). This particular
5 condition is probably associated with the strong (CA)_n and (GA)_n signals on the W
6 chromosome of *Triportheus* species. However, although microsatellite density is influenced by
7 base composition, species-specific molecular features, such as enzymes related to replication or
8 DNA repair, or even the proper euchromatin/ heterochromatin chromosomal organization can,
9 altogether, influence the density of microsatellites in the genome (Bachtrog et al. 1999; Tóth et
10 al. 2000; Katti et al. 2001).

11 Transposable elements also play an important role in the evolutionary processes of the
12 sex chromosomes (Ferreira et al. 2011). *Rex* are among the most investigated TEs in fishes due
13 to their wide distribution in the genome, allowing a comparative analysis among different
14 species (Splendore de Borba et al. 2013). Although in some cases *Rex* retrotransposons have
15 been mapped in the heterochromatic regions, they show a dispersed distribution throughout the
16 whole genome in approximately 60% of the fish families (reviewed in Ferreira et al. 2011), as
17 also observed for *Rex1* and *Rex6* sequences in all *Triportheus* species yet analyzed. However,
18 no differential accumulation of *Rex* transposons was observed on the W chromosomes of
19 *Triportheus*, contrasting with *Leporinus* genus, where *Rex1* was accumulated on the W
20 chromosome in *L. obtusidens*, and *L. macrocephalus* and on the W₁ chromosome of *L.*
21 *elongatus* (Splendore de Borba et al. 2013). Although microsatellites are usually associated
22 with TEs (Kejnovský et al. 2013), this is not the case for *Triportheus*. In fact, the accumulation
23 of microsatellites contrasts with the uniform distribution of *Rex* elements on the W

1 chromosome, reflecting the independent path of these repetitive DNA classes in the sex-
2 specific chromosome, probably due to the faster dynamism of microsatellites.

3 ***Species-specific dynamics of Triportheus sex chromosomes***

4 The Triportheidae family was established by Oliveira et al. (2011), encompassing the
5 genera *Agoniates*, *Clupeacharax*, *Engraulisoma*, *Lignobrycon* and *Triportheus*. All previously
6 analyzed *Triportheus* species share a ZZ/ZW sex chromosome system, in which the W
7 chromosome is smaller than the Z one and almost entirely heterochromatic (Artoni et al. 2001).
8 Accordingly, the same cytogenetic traits are present in *T. pantanensis* and *T. aff. rotundatus*,
9 reinforcing the hypothesis that this sex chromosome system represent a genus-specific ancestral
10 trait (Artoni et al. 2001).

11 According to the recent phylogenetic study, Triportheidae and *Triportheus* represents
12 monophyletic groups, in which *Triportheus* originated at 26.2 ± 6.5 Myr, having *T. auritus* as the
13 most ancestral species (20.7 ± 6.5) (Mariguela et al. 2016). In this way, the ZZ/ZW sex
14 chromosome system is a basal trait for *Triportheus* and, perhaps, also present in other
15 Triportheidae species. In fact, despite the lack of additional studies, a similar ZZ/ZW sex
16 chromosome system is also found in *Lignobrycon*, a sister group of *Triportheus* (Rodrigues et
17 al. 2013).

18 This study, with *Triportheus* as a model, highlights how the sex chromosomes evolution
19 is a labile process, even among related species. Indeed, the W chromosome is subjected to
20 particular evolutionary processes among species, as evidenced by its unequal accumulation of
21 microsatellites. These findings are also supported by some previous studies in other
22 *Triportheus* species, such as *T. auritus* (Cioffi et al. 2012c), and *T. trifurcatus* (Yano et al.
23 2014a), in which the accumulation of the $(CA)_n$ and $(GA)_n$ microsatellites on the W

1 chromosome is similar to the pattern found in the present study. In two of the most recent
2 originated species, *T. trifurcatus* and *T. signatus* (Mariguela et al. 2016), more classes of
3 microsatellites had substantial accumulation on the W chromosome. However, it is not possible
4 to have a correlation between age and accumulation of repeats sequences on the sex
5 chromosomes, since in other more recently originated species, such as *T. pantanensis*, *T.*
6 *nematurus* and *T. aff. rotundatus* no preferential microsatellites accumulation was verified.
7 Thus, despite the role of these repetitive sequences in the differentiation process of the sex-
8 specific chromosome, it is put in evidence that this chromosome is subjected to distinctive
9 evolutionary mechanisms, maybe in view of a free selective pressure. Such plasticity of the
10 differentiation process of the sex specific chromosome was also found in *Leporinus*
11 (Anostomidae, Characiformes), where the heterochromatic W chromosome also has a
12 differential distribution of some repeats among species (Poltronieri et al. 2014).

13 Among other lower vertebrates, morphological variations in the sex chromosomes of
14 closely related lizard species or populations (Ezaz et al. 2009), with large or no accumulation of
15 microsatellites (Pokorná et al. 2011), were also reported. Similar scenarios can also be found in
16 several other animal and plant species, indicating that the sex chromosomes differentiation is an
17 ongoing and dynamic process. Indeed, a high degree of differentiation is frequently observed in
18 these chromosomes, appearing to have evolved independently many times among animal and
19 plant species (Schlötterer, 2000; Graves, 2008). Notably, undifferentiated sex chromosomes,
20 together with different sex chromosomes systems, can coexist in a same fish family or genus,
21 or even in different populations of a same species, providing effective models to explore
22 evolutionary events linked to sex chromosomes (reviewed in Cioffi et al. 2011a). For instance,
23 in the Neotropical Parodontidae family, several species have no differentiated heteromorphic

1 sex chromosomes while some *Apareiodon* and *Parodon* species share a same ZZ/ZW sex
2 system, but with variations in size and morphology of the W chromosome. In addition, *A.*
3 *affinis* shows a distinct and particular ZZ/ZW₁W₂ multiple sex chromosome system (reviewed
4 in Bellafronte et al. 2011). Accordingly, in salmonid fishes simple and multiple sex
5 chromosome systems can also be found in the same genus, as in *Oncorhynchus* (Phillips &
6 Ráb, 2001). In addition, some populations of rainbow trout display a heteromorphic Y
7 chromosome, which is not observed in other ones (Thorgaard, 1983).

8 Our current findings show the dynamic differentiation process of the sex specific
9 chromosome concerning the repetitive DNA fraction of the heterochromatin. Besides standing
10 out the involvement of heterochromatin on the differentiation of the sex pair, it is highlighted
11 that repetitive DNAs play a differential role in this heterochromatinization process. The
12 differential accumulation of the same class of repeats on the W chromosome of both close and
13 distant species reflects the inherent dynamism of microsatellites, as well as the plasticity that
14 shapes the evolutionary history of the sex chromosomes.

15

16 **Funding**

17 This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
18 Tecnológico - CNPq (Proc. n° 306896/2014-1); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
19 São Paulo – FAPESP (Proc. n° 2014/22532-7); and Coordenação de Aperfeiçoamento de
20 Pessoal de Nível Superior – CAPES (Bolsista da CAPES (PDSE): Proc. n° BEX 11744/13-8).

21 **Referencias Bibliográficas**

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

Figures and Table

- 1 **Table 1.** Brazilian collection sites of the *Triportheus* species analyzed, with the sample sizes.

| Species | Site | Basin | N | Deposit number |
|---|--------------------|----------------------|---------------|-----------------------|
| <i>Triportheus albus</i> | - Araguaia River | - Araguaia-Tocantins | (04 ♀ ; 04 ♂) | LBP18620 |
| <i>Triportheus guentheri</i> | - Inhuma Lake | - São Francisco | (12 ♀ ; 06 ♂) | LBP18628 |
| <i>Triportheus nematurus</i> | - Paraguai River | - Paraguai | (09 ♀ ; 07 ♂) | LBP18624 |
| <i>Triportheus pantanensis</i> | - Paraguai River | - Paraguai | (01 ♀ ; 01 ♂) | LBP18623 |
| <i>Triportheus</i> aff. <i>rotundatus</i> | - Paraguai River | - Paraguai | (19 ♀ ; 21 ♂) | LBP18625 |
| <i>Triportheus signatus</i> | - Piracicaba River | - Tietê | (13 ♀ ; 24 ♂) | LBP18619 |



1 **Figure 1.** Female karyotypes of *Triportheus aff. rotundatus* and *T. pantanensis* arranged from
2 Giemsa-stained (above) and C-banded chromosomes (below). The ZW sex chromosomes are
3 boxed. Note the conspicuous C positive heterochromatin accumulated on the W chromosomes.
4 Bar = 5 µm.

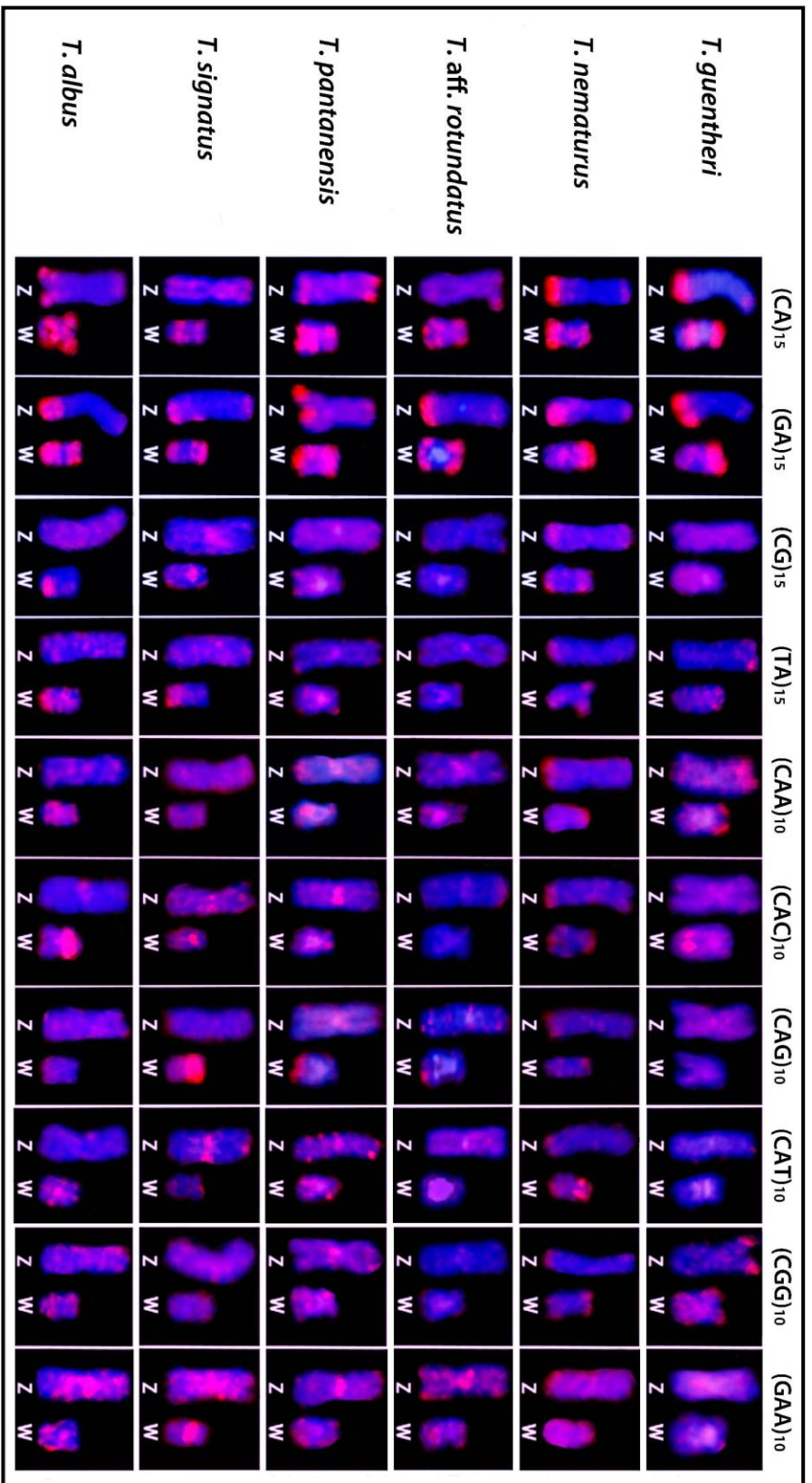
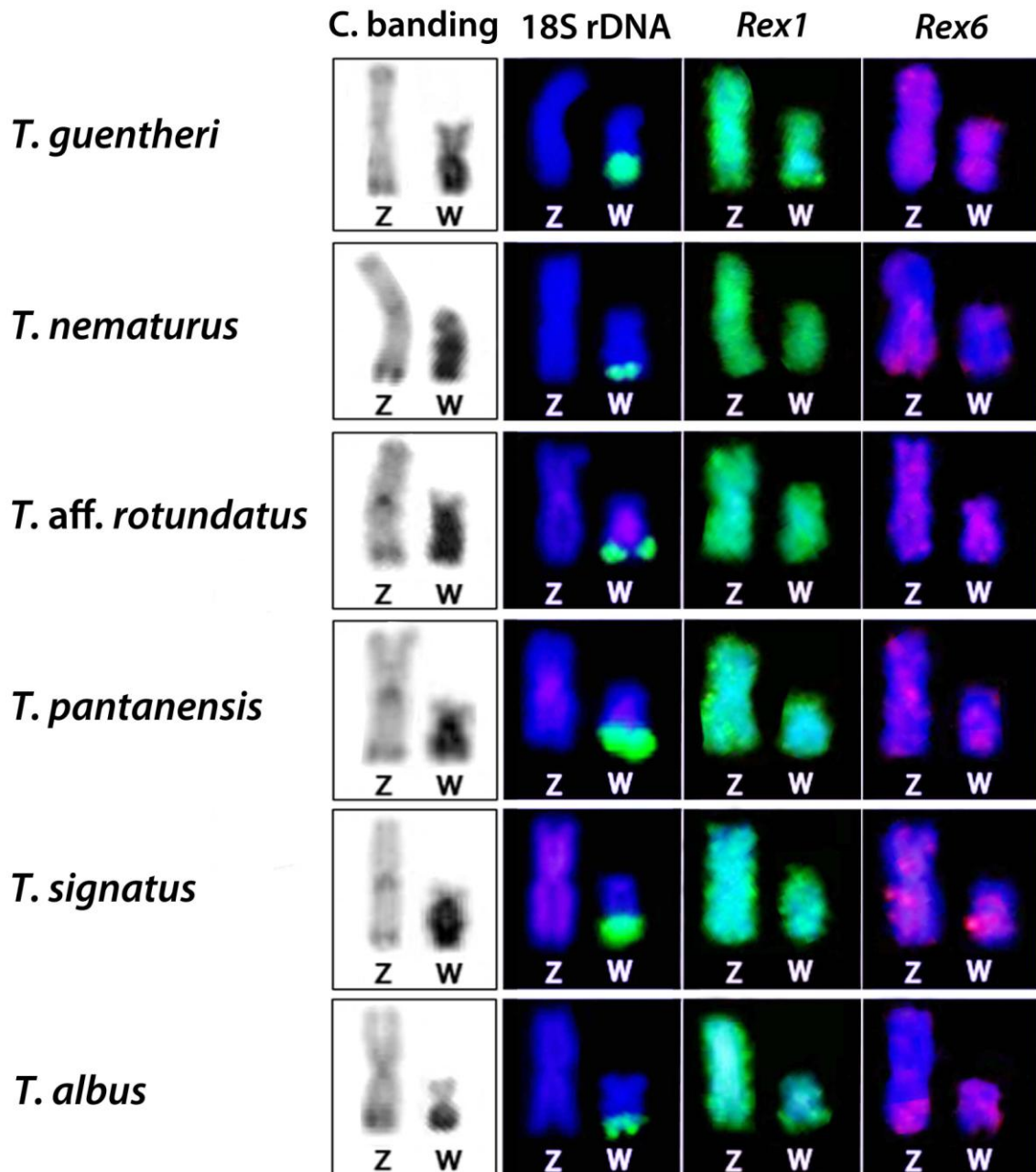
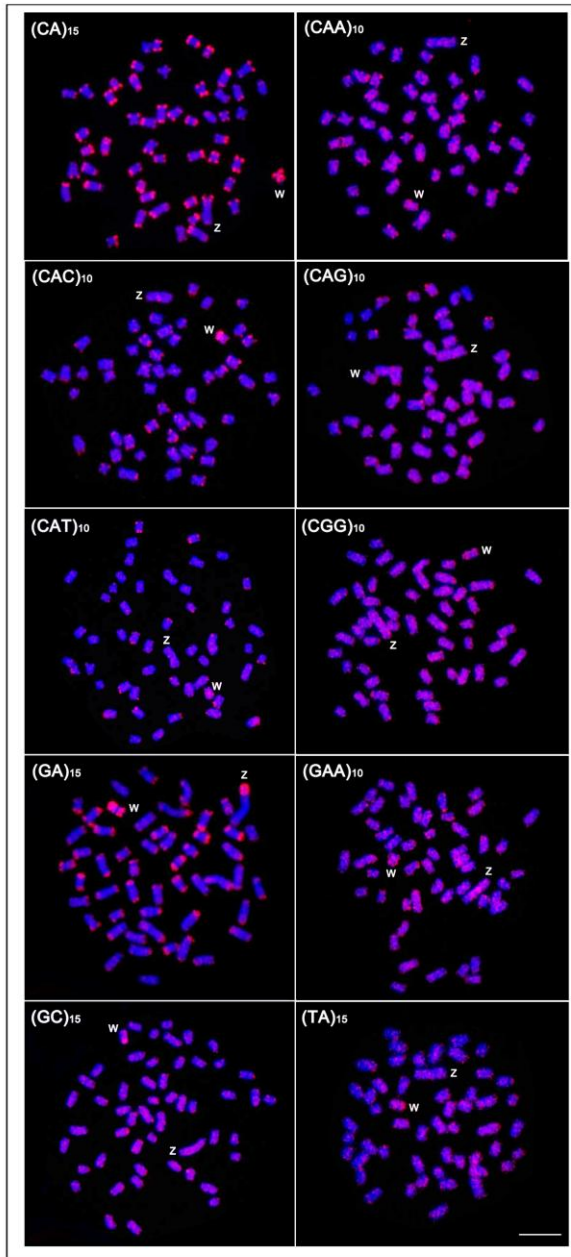


Figure 2. Distribution of microsatellites on the Z and W chromosomes of six *Triportheus* species. Note the preferential accumulation of some repeats on the W chromosomes.

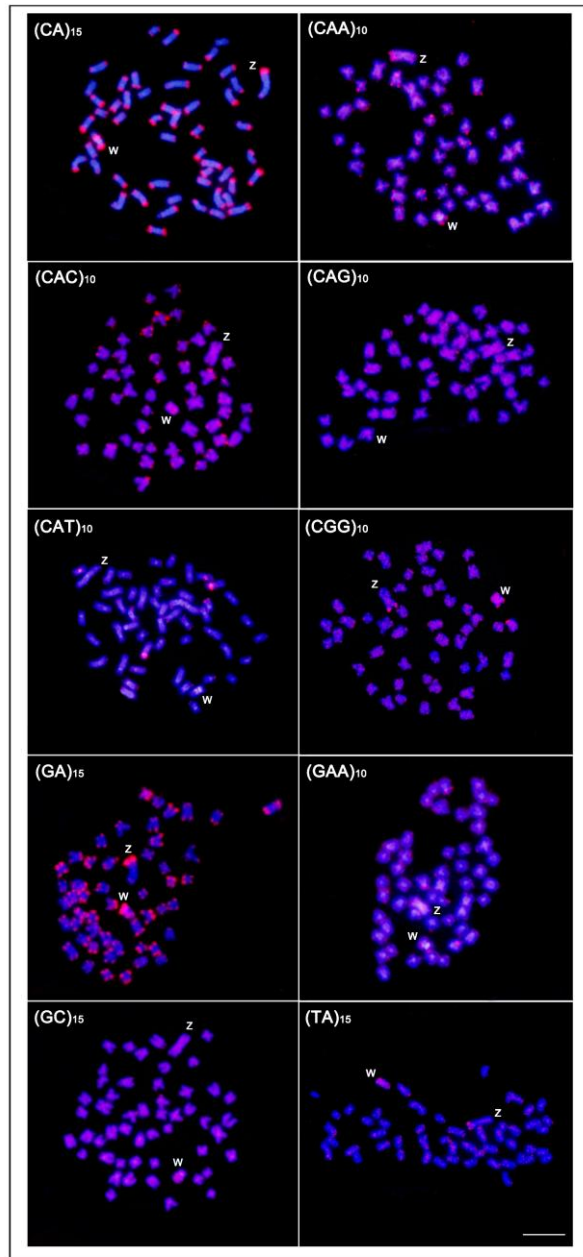


1 **Figure 3.** C-banding and distribution of repetitive DNA sequences on the Z and W
2 chromosomes of six *Triportheus* species. Note the occurrence of 18S rDNA gene and the
3 preferential accumulation of heterochromatin on the W chromosomes.

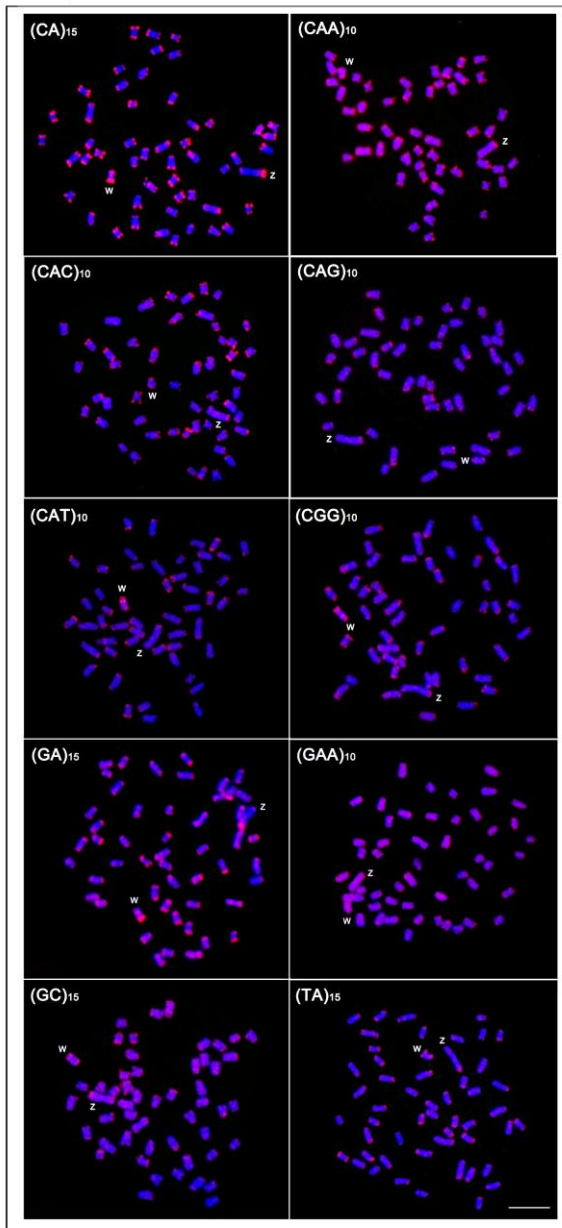
Supplementary data



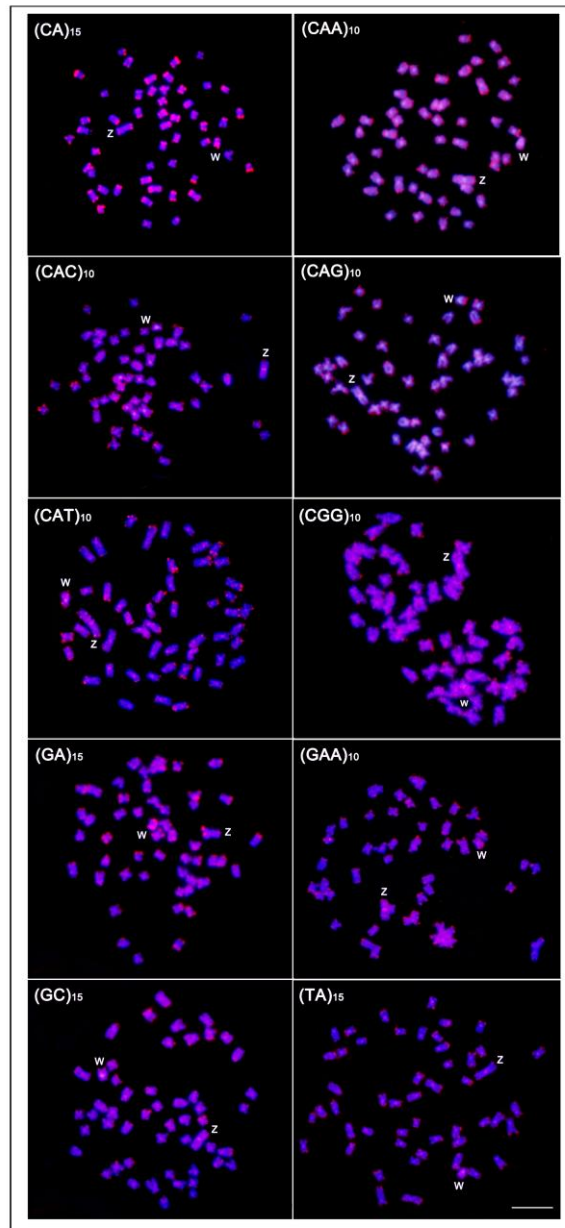
Supplementary 1. Microsatellite distribution in *T. albus* metaphases.



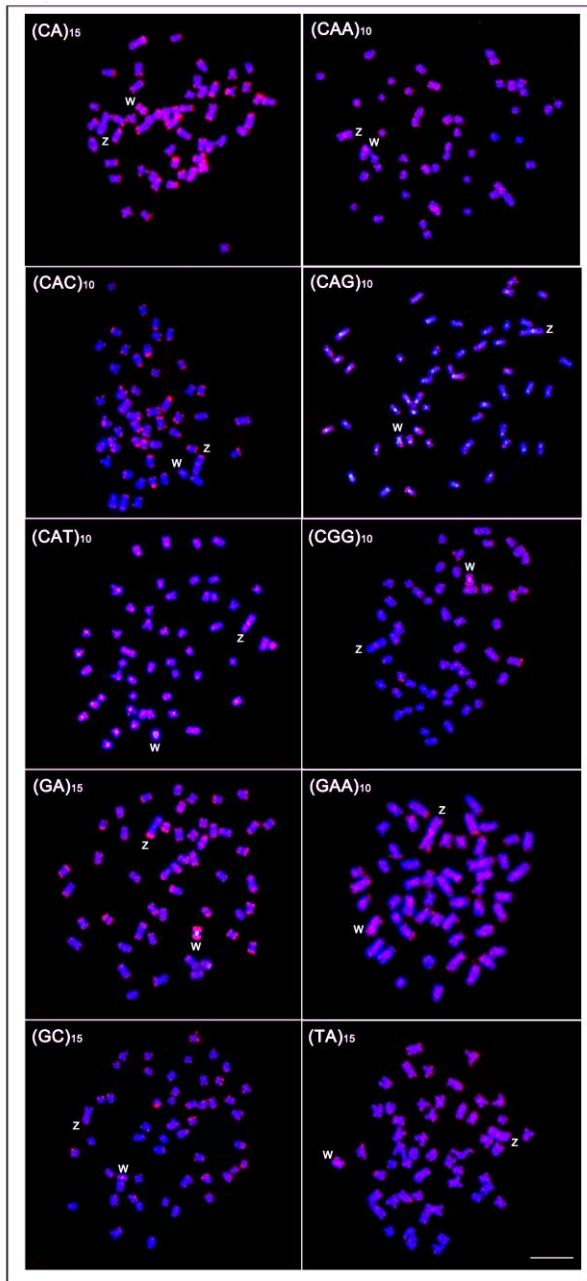
Supplementary 2. Microsatellite distribution in *T. guentheri* metaphases.



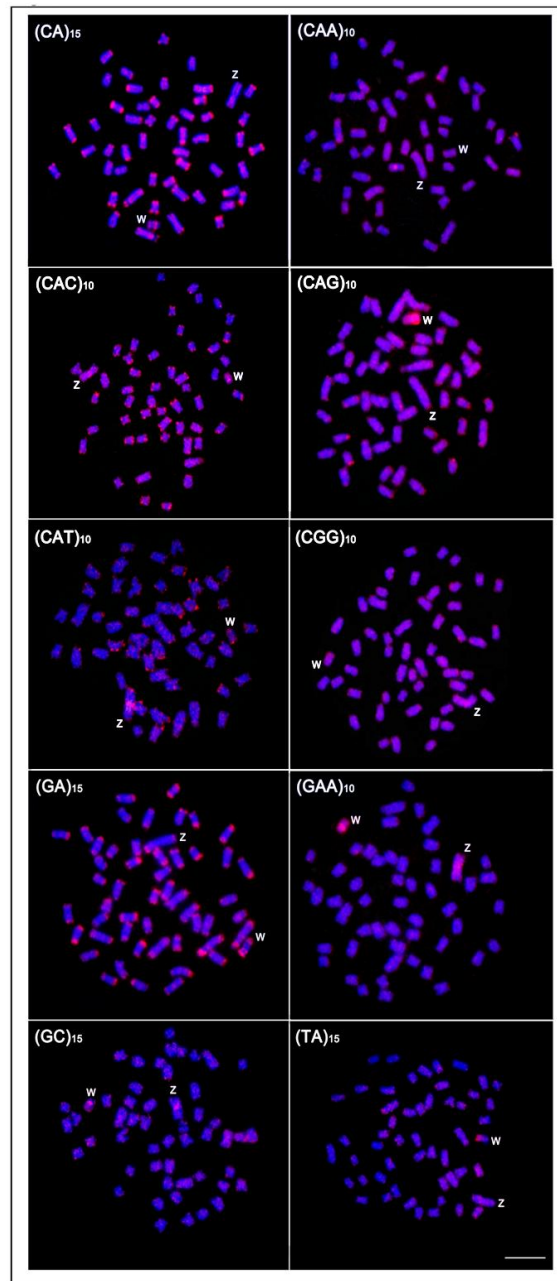
Supplementary 3. Microsatellite distribution in *T. nematurus* metaphases.



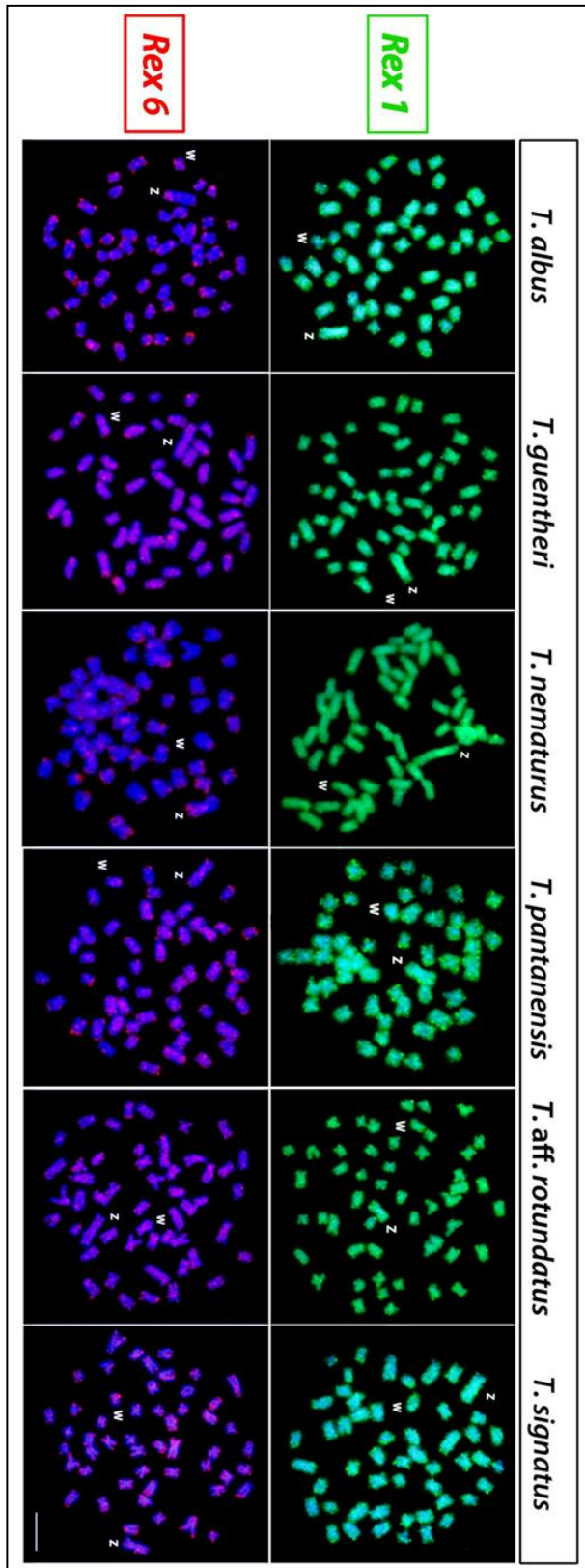
Supplementary 4. Microsatellite distribution in *T. pantanensis* metaphases.



Supplementary 5. Microsatellite distribution in *T. aff. rotundatus* metaphases.



Supplementary 6. Microsatellite distribution in *T. signatus* metaphases.



Supplementary 7 – Metaphase plates of all *Triportheus* species analyzed with *Rex1* and *Rex6* probes

Capítulo 3

Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 snDNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae): high variability and particular syntenic organization.

Yano CF, Bertollo LAC, Rebordinus L, Merlo MA,
Liehr T, Portela-Bens S, Cioffi MB

Submetido: Zebrafish

Abstract

1 Multigene families correspond to a group of genes tandemly repeated, showing enormous
2 diversity in both number of units and genomic organization. In fishes, unlike rDNAs that have
3 been well explored in cytogenetic studies, U2 snRNA genes are poorly investigated concerning
4 their chromosomal localization. *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae) is a freshwater fish
5 genus, widely distributed in most of the major river drainages of South America. All
6 *Triportheus* species studied so far carry a ZZ/ZW sex chromosomes system, where the W
7 chromosome contains repetitive DNAs, including a huge 18S rDNA cistron. In some species
8 the syntenic organization of rDNAs on autosomes was also verified. To explore this particular
9 organization, we performed three-color-fluorescence in situ hybridization (FISH) using 5S, 18S
10 rDNA and U2 snRNA genes as probes in eight *Triportheus* species. This work represents the
11 first one analyzing the chromosomal distribution of U2 snRNA genes in genomes of
12 Triportheidae. The variability in number of rDNA clusters, as well as the divergent syntenies
13 for these three multigene families, put in evidence their evolutionary dynamism, revealing a
14 much more complex organization of these genes than previously supposed for closely related
15 species. Our study also provides additional data on the accumulation of repetitive sequences in
16 the sex specific chromosome and their significance in the differentiation of the sex pair.
17 Besides, the chromosomal organization of U2 snDNAs among fish species is also reviewed.

18 **Keywords:** multigene families, FISH, sex chromosomes, repetitive DNAs

1 **Introduction**

2

3 The repetitive DNA content of eukaryotic genomes has received particular attention for
4 being composed by plastic and dynamic elements, providing thus relevant information about
5 the chromosomal structure in genomes of various taxa. Multigene families comprise a group of
6 genes repeated in tandem, showing enormous diversity in both number of units and genomic
7 organization (Walsh & Stephan, 2001). Among them, genes encoding ribosomal RNAs (rRNA)
8 and U2 small nuclear RNAs (snRNAs) have been used as suited markers for chromosomal
9 investigations (e.g. Hatanaka & Galetti, 2004; Cioffi et al. 2010b; Merlo et al. 2010; García-
10 Souto et al. 2015). rDNAs play an important role in protein synthesis, in which 45S rDNA
11 encodes for 18S, 5.8S and 28S rRNAs, and the 5S rDNA encodes for 5S rRNA (López-Flores
12 & Garrido-Ramos, 2012). All rDNAs are processed to form ribosome subunits in which 45S
13 rDNAs are generated in the nucleolus (*nucleolus organizer region* -NOR), while 5S rRNAs are
14 first synthesized in nucleoplasm and latter enter the nucleolus to form a functional component
15 of the large ribosomal subunit (Martins & Wasko, 2004).

16 In fishes, rDNAs have been deeply explored in cytogenetic and genomic studies,
17 providing interesting data to elucidate chromosomal evolutionary process in many groups
18 (Rebordinos et al. 2013). Concerning the number and position of 45S rDNAs in fish
19 chromosomes, compiled data about 330 species from 22 orders demonstrated that karyotypes of
20 approximately 72% of species carry single 45S rDNA sites, which are located in a terminal
21 position in 87% of cases (Gornung, 2013). On the other hand, the mapping of 5S rDNA in most
22 studied species has showed a conservative interstitial position (Martins & Wasko, 2004).
23 Additionally, the most common situation is the localization of both ribosomal genes on
24 different chromosomal pairs (Martins & Galetti, 2001). Despite these common patterns, a

1 growing number of studies have pointed to variable numbers and locations of rDNAs loci,
2 which are eventually present in syntenic configuration in many species (Diniz et al. 2009;
3 Calado et al. 2014; Cioffi et al. 2015; Barros et al. 2016; Getlekha et al. 2016; Maneechot et al.
4 2016).

5 Unlike rDNAs, U2 snRNA genes have been poorly investigated in fish chromosomes
6 (Merlo et al. 2012a). U2 as well as U1, U4, U5 and U6 snRNAs are components of a complex
7 of small nuclear ribonucleoproteins that are associated to the splicing process of mRNA
8 precursors (Manchado et al. 2006). Despite the fact that U2 snDNAs appear to be highly
9 conserved in eukaryotes, the number and organization of this multigene family can be highly
10 variable among species (Busch et al. 1982; Dahlberg & Lund, 1988). The chromosomal
11 mapping of U2 snRNA genes show a broad scenario, with these sequences accumulating in one
12 or more chromosome pairs, as well as dispersing through the chromosomes (Úbeda-Manzanaro
13 et al. 2010; Merlo et al. 2012b; Merlo et al. 2013a; Utsunomia et al. 2014). By now, only two
14 studies showed a syntenic organization of U2 snDNA and rDNAs among fishes (Manchado et
15 al. 2006; Úbeda-Manzanaro et al. 2010), since in most cases these genes are found on separate
16 chromosomes.

17 The genus *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae) is a freshwater fish genus,
18 widely distributed in the most of the major river drainages of South America (Malabarba, 2004;
19 Oliveira et al. 2011). These fishes are commonly known as “freshwater sardines” and stands
20 out for their economic importance, constituting an important food resource for traditional
21 communities (Malabarba, 2004). Several species have been extensively investigated in
22 cytogenetic approaches, in which all of them carry a ZZ/ZW sex chromosomes system
23 (Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al. 2001). The W chromosome is highly differentiated from

1 the Z, being rich in heterochromatin and in repetitive DNAs, including a huge 18S rDNA
2 cistron on its long arms (Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al. 2001; Diniz et al. 2009; Yano et
3 al. 2014a; 2016). Besides the unusual presence of 18S rDNAs on the sex-specific chromosome,
4 a variable hybridization pattern of rDNAs was also verified on some autosomal pairs, including
5 a syntenic organization of these genes in some species (Nirchio et al. 2007; Diniz et al. 2009;
6 Marquioni et al. 2013).

7 Although it is a well-explored group, further investigation about the organization of
8 multigene families, including U2 snRNAs genes are indicated, as only few data therefore is
9 available for fishes in general. In addition to provide new U2 snDNAs data, this study explored
10 the hypervariability concerning the number of loci, the particular syntenic organization of
11 multigene families, the conserved presence of 18S rDNAs on the W chromosome, as well as
12 the putative evolutionary mechanisms associated with this scenario in *Triportheus* species. The
13 results put in evidence the evolutionary dynamism of multigene families, revealing a much
14 more complex organization of these genes than previously supposed for closely related species.

1 **Materials and Methods**

2 Materials and chromosomal preparation

3 Eight *Triportheus* species from different Brazilian river basins were collected and
4 analyzed: the individuals investigated, the collection locations and sexes are listed in **Table 1**.
5 The sampling permit was obtained from the Brazilian environmental agency ICMBIO/SISBIO
6 (License number 48628-2). All individuals were properly identified and deposited in the fish
7 collection of the Laboratory of Biology and Genetic of Fishes of the Universidade Estadual
8 Paulista (UNESP – Botucatu, SP) (**Table 1**). The experiments followed ethical conduct, and
9 anesthesia was administered prior to sacrificing the animals to minimize suffering in
10 accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal
11 de São Carlos (UFSCar – São Carlos, SP- CEUA 1853260315). Mitotic chromosomes were
12 directly prepared from cell suspensions of the anterior kidney according to Bertollo et al.
13 (2015).

14 Probe preparation

15 Three multigene families were directly isolated from the genome of *T. albus*, cloned
16 into plasmid vectors and propagated in DH5 *E. coli*-competent cells (Invitrogen, San Diego,
17 Calif., USA). The 18S rDNA probe was obtained according to Cioffi et al. (2009) and
18 corresponded to a 1400-bp segment of the 18S rRNA gene. The 5S rDNA probe was obtained
19 according to Martins et al. (2006) and the U2 snDNA probe was isolated using the primers
20 described by Cross (2005).

21 Both 18S and 5S rDNAs probes were directly labeled using Nick-Translation Mix
22 (Roche, Mannheim, Germany), in which 18S rDNA was labeled with Cy5-dUTP (yellow) and

1 5S rDNA with Spectrum Green-dUTP (green) (Vysis, Downers Grove, USA). The U2 snRNA
2 probe was labeled via PCR using the U2 primers and the cycle program described in Cross
3 (2005) with Spectrum Orange-dUTP (red) (Vysis, Downers Grove, USA).

4 *Fluorescence In Situ Hybridization - FISH (Three-color-FISH)*

5 Chromosomal preparations of males and females of the mentioned *Triportheus* species
6 were used for a three-color FISH experiment. The slides were first incubated at 37 °C for 1 h
7 and subsequently, they were treated with RNase (10 mg/ml) for 1 h at 37 °C in a moist
8 chamber. Next, a 5-min wash using 1 × PBS was performed and the slides were treated with
9 0.005% pepsin solution in 10 mM HCl for 3 min at 37 °C. The slides were washed again with 1
10 × PBS for 5 min and the material was fixed with 1% formaldehyde at room temperature (RT)
11 for 10 min. After further washing, the slides were dehydrated with 70, 85, and 100% ethanol
12 series, 3 min each. Afterwards, chromosomal DNA was denatured in 70% formamide/2 × SSC
13 for 3 min at 72 °C. The slides were dehydrated in a cold ethanol 70% series and 85% and 100%
14 at RT, 3 min each. The hybridization mixture, containing 100 ng denatured of each probe, 10
15 mg/ml dextran sulfate, 2 × SSC and 50% formamide in a final volume of 25 µl, was heated to
16 °C for 10 min and then applied to the slides. Hybridization was performed during 16-18 h at 37
17 °C in a moist chamber. After hybridization, the slides were washed in 1 × SSC for 5 min at 42
18 °C, and in 4 × SSCT using a shaker at RT and then quickly rinsed in 1 × PBS. Subsequently,
19 the slides were dehydrated again in an ethanol series (70, 85, and 100%), 3 min each. After the
20 complete drying of the slides, the chromosomes were counterstained with DAPI (4', 6-
21 diamidino-2-phenylindole)/antifade (1.2 mg/ml, Vector Laboratories).

1 *Microscope analyses and image processing*

2 At least 30 metaphase spreads were analyzed per individual to confirm the diploid
3 chromosome numbers, karyotype structure and FISH results. All images were captured by the
4 Zeiss Axioplan microscope using the ISIS digital FISH imaging system (MetaSystems,
5 Altlussheim, Germany). The longitudinal distribution of signals along the chromosome pair
6 No.3 was also analyzed using the ISIS digital FISH imaging software. The chromosomes were
7 classified metacentric (m), sub-metacentric (sm) or subtelocentric (st) according to their arm
8 ratios (Levan et al. 1964).

1 **Results**

2 All *Triportheus* species analyzed have diploid chromosome number $(2n) = 52$ and
3 karyotype composed by m/sm and some st chromosomes, with a heteromorphic ZZ/ZW sex
4 chromosome systems (**Figure 1**), as verified before (Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni et al.
5 2001; Diniz et al. 2008a; Cioffi et al. 2012c; Yano et al. 2014a; 2016). Besides, the Z
6 chromosome is metacentric and the largest one within the karyotype, while the W is always
7 smaller than Z, but with variable shapes and sizes among species (**Figure 1**).

8 The W chromosome of all species shows an 18S rDNA cluster on the long (q) arms,
9 however, in *T. albus*, this chromosome also possesses U2 snDNA cluster in the same
10 chromosomal site. Concerning autosomes, the three multigene families depict a variable
11 distribution pattern depending on the species, being located in separate chromosomes or in a
12 synteny (**Figures 1 and 2**). The chromosome pair No. 3 of all species bears an 18S rDNA site
13 on the short (p) arms. Additionally, these sequences are also present on the p arms of the
14 chromosome-pair No. 8 in *T. albus* and pair No. 7 in *T. trifurcatus*. The 5S rDNA sequences
15 are located on the p arms of the chromosome-pair No. 9 in all species. In addition to this site, *T.*
16 *auritus*, *T. nematurus*, *T. signatus* and *T. trifurcatus* display 5S rDNA cluster in the
17 chromosome-pair No. 3, and *T. auritus* also in chromosome-pairs Nos. 4, 5 and 6. The U2
18 snDNA in each species is always clustered on the p arms of four chromosomes: the
19 chromosome-pair No. 7 in all species; the pair No. 3 in *T. auritus*, *T. albus*, *T. nematurus*, *T.*
20 *signatus* and *T. trifurcatus* and the pair No. 4 in *T. guentheri*, *T. pantanensis* and *T. aff.*
21 *rotundatus* (**Figures 1 and 2**). A review providing the chromosomal characteristics of U2
22 snDNAs among fish species, i.e. number of sites, location and syntenic organization with
23 rDNAs sites, is given in **Table 2**.

1 In summary, each of the three multigene families is located in separate chromosomes in
2 *T. guentheri*, *T. pantanensis* and *T. aff. rotundatus*. The short arms of the pair No. 3 holds
3 syntenic sequences of 5S and 18S rDNAs and U2 snDNAs in *T. auritus*, *T. nematurus*, *T.*
4 *signatus* and *T. trifurcatus*, but only 18S rDNA and U2 snDNA in *T. albus*. *T. trifurcatus* also
5 presents an additional syntenic location of 18S rDNA and U2 snDNA on the p arms of the
6 chromosome-pair 7 (**Figures 1 and 2**).

7 All the multigene families are in adjacent syntenic location in chromosome-pair No. 3,
8 not showing an intercalary arrangement. The results obtained by the ISIS digital FISH imaging
9 software, confirmed their flanking configuration (**Figure 3**).

1 **Discussion**

2

3 Repetitive DNA sequences turned out to be excellent markers in cytogenetic studies,
4 mainly considering their inherent dynamism, contributing to identify chromosome
5 rearrangements and other evolutionary process (Ferreira et al. 2007; Cioffi & Bertollo, 2012).

6 The hypervariability in numbers of rDNA loci highlighted the intense evolutionary dynamics
7 related to these genes, which can generate different chromosomal patterns even in closely
8 related species (Nakajima et al. 2012). Previous studies conducted in *Triportheus* have pointed
9 to distinctly different organization of rDNAs among species (Nirchio et al. 2007; Diniz et al.
10 2009; Marquioni et al. 2013), providing already cytogenetic data for this group. However, the
11 present study aimed to clarify the evolutionary trends behind the particular chromosomal
12 organization of multigene families (including U2 snDNAs). This was realized based on the
13 extensive variation in numbers of loci, the syntenic configuration of these sequences and their
14 distribution pattern on the W chromosome of these *Triportheus* species.

15 U2 snDNA genes were mapped for the first time in *Triportheus*. This represents the
16 only available data for Triportheidae family, contributing to characterize these sequences in
17 Characiformes, since only some *Astyanax* species (Characidae *Incertae sedis*) were analyzed
18 until now (Silva et al. 2015) (**Table 2**). The U2 snDNAs are quite conserved in all eukaryotes,
19 but their genomic and chromosomal organization can be very distinct among species (Matera et
20 al. 1990; Manchado et al. 2006). Although dispersed U2 snRNA signals have been found in
21 species from the Batrachoididae family (Úbeda-Manzanaro et al. 2010), most studies have
22 indentified these sequences as clustered within one chromosome pair (Merlo et al. 2010; Merlo
23 et al. 2013a; Merlo et al. 2013b; Utsunomia et al. 2014; García-Souto et al. 2015, **Table 2**). In
24 *Triportheus*, two autosomal pairs, each were mapped to carry U2 snRNA in the terminal region

1 of the p arms in all species (**Figures 1 and 2**), which seems to be hint on a conserved number
2 of sites in this genus. However, the location of one cluster is variable, being located in
3 chromosome-pair No. 4 or in syntenic organization with rDNAs in chromosome-pair No. 3
4 depending on the species (**Figures 1 and 2**). Regarding the W chromosome, only *T. albus*
5 showed U2 snRNA sequences, syntenic with the 18S rDNA site. The presence of U2 snRNA
6 genes in sex chromosomes was only verified on the X₁ chromosome of *Gymnotus pantanal*
7 (Utsunomia et al. 2014). However, one can rule out their ubiquitous presence on the sex
8 chromosomes since only few data are currently available (**Table 2**).

9 On the contrary to the conserved number of U2 snDNAs sites, the number of rDNAs is
10 quite variable among the different *Triporthesus* species. It has been assumed that a single pair of
11 45S rDNA site is the most common scenario found among teleosts, including the ancestral
12 groups (Gornung, 2013). In all *Triporthesus* species, the 18S rDNA sequences are clustered in
13 the chromosome-pair No. 3 and in W chromosome, with an additional cluster present in *T.*
14 *albus* and *T. trifurcatus* (**Figure 2**). According to Martins & Wasko (2004), the number of 45S
15 rDNA loci is more variable in fishes compared to the conserved number of 5S rDNAs.
16 However, the scenario shown in *Triporthesus* is quite the opposite, since 5S rDNAs are even
17 more variable than the 18S rDNA loci. Indeed, in spite of 5S rDNA clusters be always found in
18 the pair No. 9 in all species, their variability is demonstrated by additional sites being found in
19 *T. nematurus*, *T. signatus* and *T. trifurcatus* (where they occur in a syntenic organization with
20 18S rDNAs and U2 snDNAs in pair 3), and by the presence of eight additional sites in *T.*
21 *auritus* (**Figure 2**).

22 It was proposed that the relative conserved nature of 5S rDNA loci in fishes might be
23 due to their interstitial chromosome position, which is also found in other animal groups

1 (Martins & Wasko, 2004). Therefore, the variable number of loci of these genes can be related
2 with their chromosomal terminal position in *Triportheus*. In fact, this chromosomal location
3 seems to facilitate frequent rearrangements, due the proximity of the chromosome ends in the
4 interphase nucleus allowing the spreading of sequences through the genome (Schweizer &
5 Loidl, 1987; Hanson et al. 1996). Moreover, some studies have also pointed out the
6 involvement of transposable elements (TEs) in rDNA movement, as verified in *Diplodus*
7 *sargus* and cichlid fishes, since the variable number of rDNA genes in these species were
8 associated with the presence of TEs in their flanking regions (FRs) (Nakajima et al. 2012;
9 Merlo et al. 2013b). In *Erythrinus erythrinus*, the huge chromosomal dispersion of 5S rDNAs
10 was associated with the activity of the non-LTR retrotransposons *Rex 3*, since they were co-
11 localized in the centromeric region of several chromosomes (Cioffi et al. 2010b). Regarding
12 *Triportheus* species, this feature seems to be less plausible, at least for *Rex* retrotransposons,
13 since neither they are found in synteny with rDNA genes nor occupy a particular chromosomal
14 region (Yano et al. 2014a; 2016). In addition, the movement of ribosomal genes could be also
15 mediated by extrachromosomal circular DNA (eccDNA), as verified in many taxa (Drouin &
16 Sá, 1995).

17 Distinct chromosomal location of 5S and 18S rDNAs is common in fishes as well as
18 other taxa (Martins & Galetti, 2001). The syntenic organization, not only for the rDNAs, but
19 also for the U2 snDNAs, reveals a very particular pattern in *Triportheus* species (**Figures 1 and**
20 **2**). Indeed, the present study shows a very rare situation for fishes, in which U2 snDNA clusters
21 are closely located to both rDNAs (**Table 2**). However, the divergent distribution of these
22 sequences, even in closely related species, involving the syntenic state as well as their
23 distribution in distinct chromosome pairs, reflects the instability of the particular region bearing

1 all of the three multigene families, i.e., the heterochromatic p arms of the chromosome-pair No.
2 3. Alongside with other reported mechanisms, the constitutive heterochromatin is also
3 associated with chromosomal rearrangements (Kuzin et al. 2002; Gornung, 2013) and could
4 have facilitated the spreading of those sequences. The fact that these three multigene families
5 are arranged in an adjacent way and not interspersed with each other (**Figure 3**), may also
6 explain their turnover organization along the chromosomal evolution of *Triportheus*.

7 The presence of 18S rDNAs on the W chromosome of *Triportheus* seems to be a
8 conserved feature, since all species studied so far display this distribution. It is common sense
9 that sex chromosomes evolve from an ancestral autosomal pair, in which structural and/or DNA
10 changes occur in the specific chromosome bearing sex determining factors (Ohno, 1967; Bull,
11 1983). Partial suppression of recombination in the proto-sex chromosome pair is a crucial step
12 in this process (Kobayashi et al. 2013). Once recombination stopped, repetitive sequences can
13 invade and be amplified in the sex-specific chromosome, leading its differentiation
14 (Charlesworth et al. 2005). Beside 18S rDNAs, the W chromosome of *Triportheus* is rich in
15 other repetitive DNA classes, as evidenced by the variable accumulation of microsatellites
16 (Yano et al. 2016). Additionally, the W chromosome of *T. albus* also bears a particular U2
17 snDNA cluster, reflecting the dynamic mechanisms of transposition and amplification of
18 repetitive DNAs, especially in the sex-specific chromosomes. The size of the 18S rDNA cluster
19 on the Wq is also well differentiated among *Triportheus* species (**Figure 1**). These changes in
20 size are probably associated with independent evolutionary process followed by the W
21 chromosome in this fish group, as demonstrated by their differential size, morphology and
22 repetitive DNA content (Artoni et al. 2001; Yano et al. 2016). The presence of 18S rDNA
23 sequences on the sex chromosomes has already been reported in fishes and in other groups

1 (Kawai et al. 2007; Abramyan et al. 2009; O’Meally et al. 2010; Scacchetti et al. 2015). As
2 demonstrated in *Salmonella typhimurium*, unequal crossing over occurs more frequently at the
3 rDNA sites than at other loci (Anderson & Roth, 1981). This seems to be a powerful
4 evolutionary force and, among others, an attractive hypothesis to explain the occurrence of
5 these sequences on the sex chromosomes of several species.

1 **Conclusions**

2 Our study shows a particular scenario concerning the distribution of three multigene
3 families in *Triportheus* genomes and provides new chromosomal data for U2 snRNA genes in
4 fish species. The variability in numbers of rDNA clusters, as well as the various syntenic status
5 for these three multigene families, put in evidence the evolutionary dynamism of these genes,
6 even in closely related species. Additionally, the fact that they are located in terminal position
7 and arranged in an adjacent way, may also explain their turnover organization along the
8 chromosomal evolution of *Triportheus* species. Our study also provides additional data on the
9 accumulation of repetitive sequences in the sex specific chromosome and their significance in
10 the differentiation of the sex pair.

11

12 **Acknowledgments**

13 This study was supported by the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de
14 Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Proc. no 306896/2014-1), FAPESP (Fundação de
15 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Proc. no 2014/22532-7), and CAPES
16 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Proc. No BEX 11744/13-8).

17

18 **Referências Bibliográficas**

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

1 **Figures and Tables**

2 **Table 1.** Brazilian collection sites of the *Triportheus* species and number of individuals in this
 3 study

| Species | Site | Basin | N | Deposit number |
|---|------------------|--------------------|---------------|-----------------------|
| <i>Triportheus albus</i> | Araguaia river | Araguaia-Tocantins | (04 ♀ ; 04 ♂) | LBP18620 |
| <i>Triportheus auritus</i> | Araguaia river | Araguaia-Tocantins | (05 ♀ ; 04 ♂) | LBP18622 |
| <i>Triportheus guentheri</i> | Inhuma lake | São Francisco | (12 ♀ ; 06 ♂) | LBP18628 |
| <i>Triportheus nematurus</i> | Paraguai river | Paraguai | (09 ♀ ; 07 ♂) | LBP18624 |
| <i>Triportheus pantanensis</i> | Paraguai river | Paraguai | (01 ♀ ; 01 ♂) | LBP18623 |
| <i>Triportheus</i> aff. <i>rotundatus</i> | Paraguai river | Paraguai | (19 ♀ ; 21 ♂) | LBP18625 |
| <i>Triportheus signatus</i> | Piracicaba river | Tietê | (13 ♀ ; 24 ♂) | LBP18619 |
| <i>Triportheus trifurcatus</i> | Araguaia river | Araguaia-Tocantins | (04 ♀ ; 11 ♂) | LBP18621 |

1 **Table 2.** Cytogenetic data of U2 snRNA genes in fish chromosomes

| Chromosomal characterization of U2 snRNA genes in fishes | | | | | | |
|---|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| Orders and Species | Number of chromosomes | Position | Syntenic 18S/28S rDNA | Syntenic 5S rDNA | With both rDNAs | References |
| Batrachoidiformes | | | | | | |
| <i>Amphichthys cryptocentrus</i> | dispersed | dispersed | negative | — | negative | Úbeda-Manzanaro (2010) |
| <i>Batrachoides manglae</i> | dispersed* | dispersed* | negative | negative | negative | Úbeda-Manzanaro (2010) |
| <i>Halobatrachus didactylus</i> | 2 | interstitial/q arms | negative | negative | negative | Merlo et al. (2012a) |
| <i>Porichthys plectrodon</i> | dispersed | dispersed | negative | — | negative | Úbeda-Manzanaro (2010) |
| <i>Thalassophryne maculosa</i> | 2/dispersed | interstitial/q arms | positive | — | — | Úbeda-Manzanaro (2010) |
| Characiformes | | | | | | |
| <i>Astyanax altiparanae</i> | 4 | proximal | — | negative | negative | Silva et al. (2015) |
| <i>Astyanax bockmanni</i> | 4 | proximal | — | negative | negative | Silva et al. (2015) |
| <i>Astyanax fasciatus</i> | 4 | proximal | — | negative | negative | Silva et al. (2015) |
| <i>Astyanax jordani</i> | 2 | proximal | — | negative | negative | Silva et al. (2015) |
| <i>Astyanax paranae</i> | 4 | proximal | — | negative | negative | Silva et al. (2015) |
| <i>Characidium cf. zebra</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium tenue</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium xavante</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium stigmosum</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium sp1</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium sp2</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium sp3</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium sp4</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium sp5</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium vestigipinne</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium rachovii</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Characidium orientale</i> | 2 | subcentromeric | negative | positive | negative | Scacchetti et al. (2015) |

| | | | | | | |
|---|--------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| <i>Characidium</i> aff. <i>C. vidali</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Scacchetti et al. (2015) |
| <i>Triportheus albus</i> | 4 + W | terminal | positive 1 pair | negative | negative | Present study |
| <i>Triportheus auritus</i> | 4 | terminal | positive 1 pair | positive 1 pair | positive | Present study |
| <i>Triportheus guentheri</i> | 4 | terminal | negative | negative | negative | Present study |
| <i>Triportheus nematurus</i> | 4 | terminal | positive 1 pair | positive 1 pair | positive | Present study |
| <i>Triportheus pantanensis</i> | 4 | terminal | negative | negative | negative | Present study |
| <i>Triportheus</i> aff. <i>rotundatus</i> | 4 | terminal | negative | negative | negative | Present study |
| <i>Triportheus signatus</i> | 4 | terminal | positive 1 pair | positive 1 pair | positive | Present study |
| <i>Triportheus trifurcatus</i> | 4 | terminal | positive 2 pairs | positive 1 pair | positive | Present study |
| Gadiformes | | | | | | |
| <i>Merluccius merluccius</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | García-Souto et al. (2015) |
| Gymnotiformes | | | | | | |
| <i>Gymnotus carapo</i> | 2 | terminal | negative | negative | negative | Utsunomia et al. (2014) |
| <i>Gymnotus inaequilabiatus</i> | 2 | terminal | negative | negative | negative | Utsunomia et al. (2014) |
| <i>Gymnotus javari</i> | 2 | terminal | negative | negative | negative | Utsunomia et al. (2014) |
| <i>Gymnotus pantanal</i> | 12♀/10♂ + X1 | terminal | negative | negative | negative | Utsunomia et al. (2014) |
| <i>Gymnotus pantherinus</i> | 2 | terminal | negative | negative | negative | Utsunomia et al. (2014) |
| <i>Gymnotus sylvius</i> | 2 | terminal | negative | negative | negative | Utsunomia et al. (2014) |
| Perciformes | | | | | | |
| <i>Argyrosomus regius</i> | 2 | subcentromeric** | negative | negative | negative | Merlo et al. (2013a) |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | 2 | telomeric/q arms | negative | negative | negative | Merlo et al. (2010) |
| <i>Dicentrarchus punctatus</i> | 2 | telomeric/q arms | negative | negative | negative | Merlo et al. (2010) |
| <i>Diplodus sargus</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Merlo et al. (2013b) |
| <i>Pagrus auriga</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Merlo et al. (2013b) |
| <i>Pagrus pagrus</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Merlo et al. (2013b) |
| <i>Plectorhinchus mediterraneus</i> | 2 | subcentromeric | negative | negative | negative | Merlo et al. (2012b) |
| Pleuronectiformes | | | | | | |
| <i>Solea senegalensis</i> | 4 | subcentromeric | positive*** | positive | positive | Manchado et al. (2006) |

Siluriformes

| | | | | | | |
|------------------------|---|-----------|----------|----------|----------|------------------------|
| <i>Mystus bocourti</i> | 2 | telomeric | negative | negative | negative | Supiwong et al. (2013) |
|------------------------|---|-----------|----------|----------|----------|------------------------|

*a degree of clustering in a specific chromosome pair in *B. manglae*

**in addition, the U2 snRNA gene showed minor spots scattered throughout the genome of *A. regius*

***see the chromosomal location of 18S rDNAs in *Solea senegalensis*, the data is available in Cross et al. 2006.

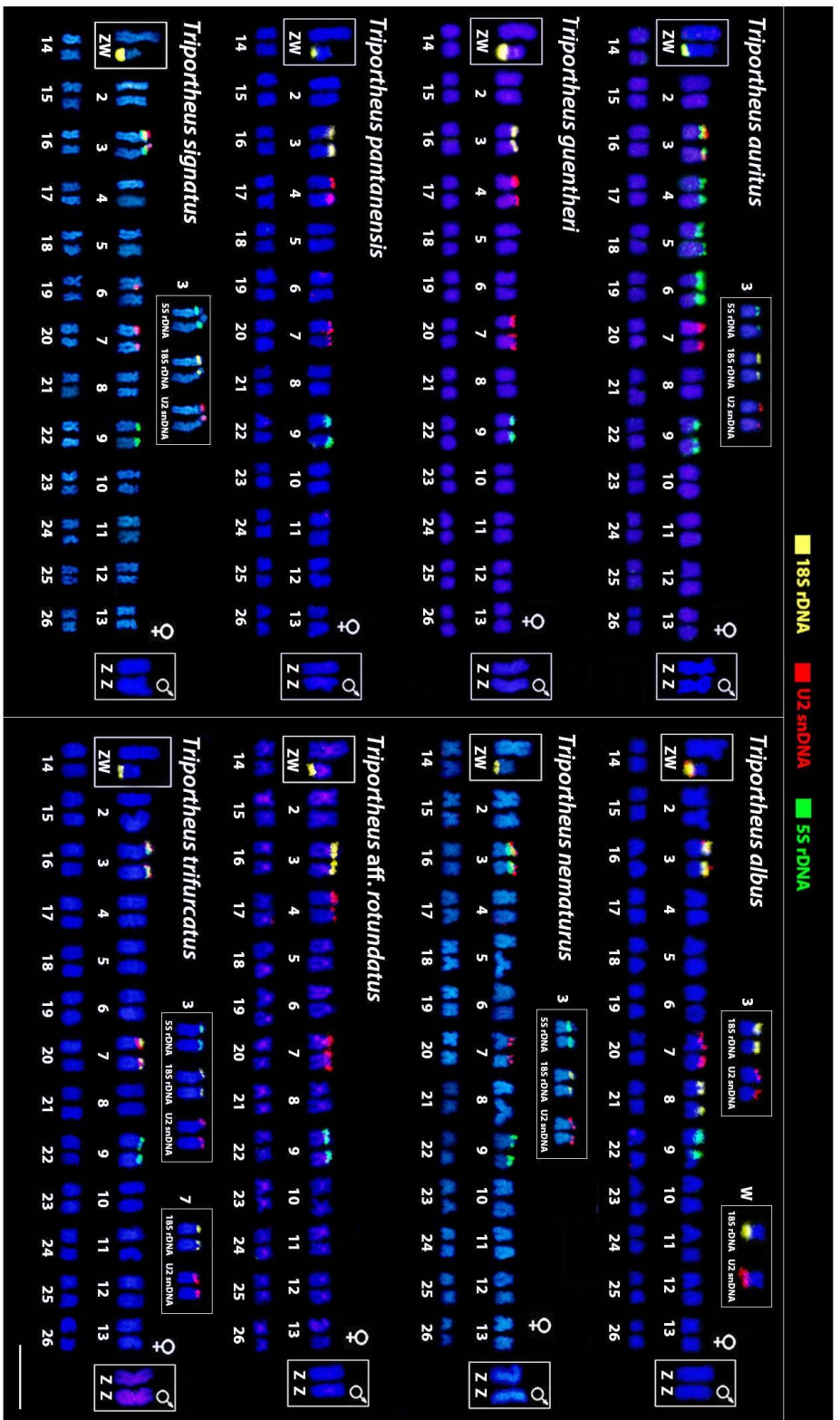
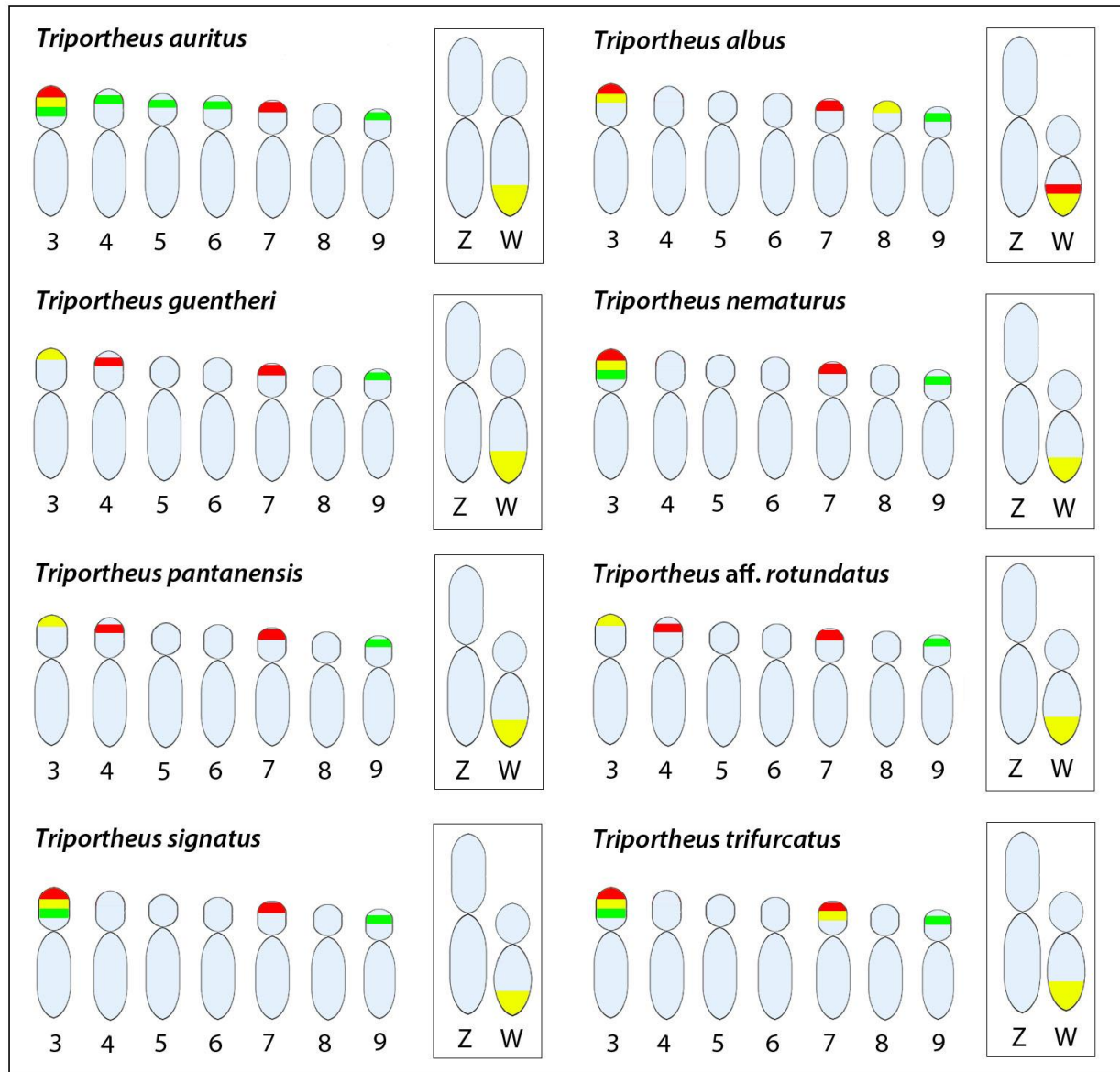
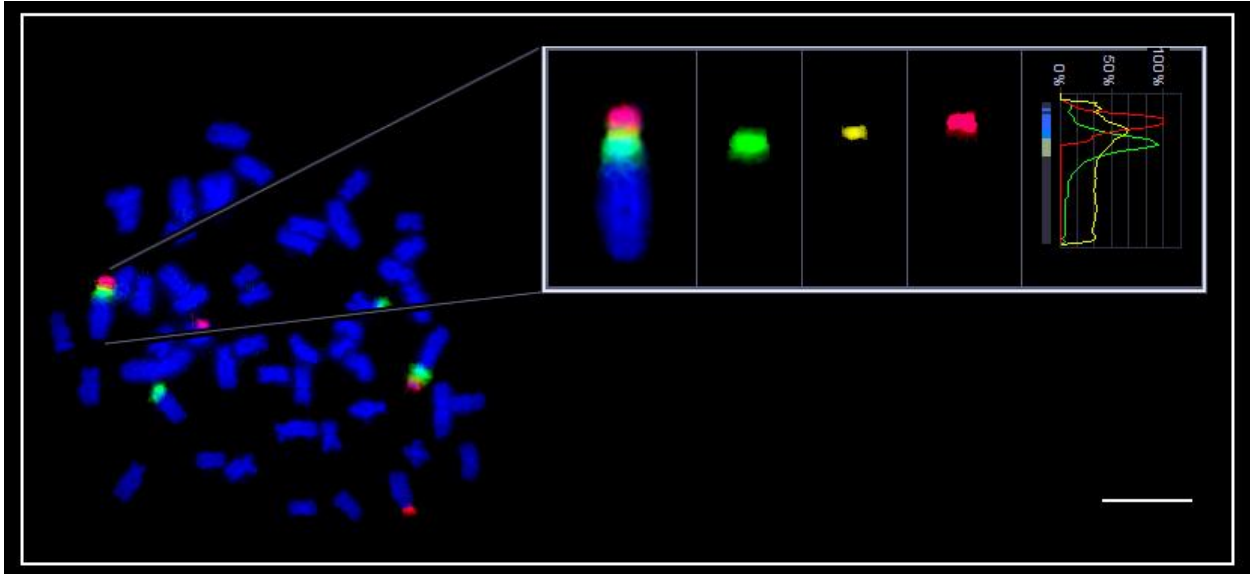


Figure 1. Karyotypes of eight *Triportheus* species arranged from chromosomes after three color FISH experiment FISH showing the distribution of 18S rDNA (yellow), 5S rDNA (green) and U2 snDNA (red) sequences on the chromosomes. The chromosomes bearing syntenic sites are boxed and each probe is displayed separately. The Z and W chromosomes are highlighted. Bar = 5 µm.



1 **Figure 2.** Partial schematic idiograms showing the chromosomal pairs bearing the multigene
 2 families analyzed in eight *Triportheus* species analyzed. 18S rDNA (yellow), 5S rDNA (green)
 3 and U2 snDNAs (red). Note the number of loci and the variable syntenic organization among
 4 them. The sex chromosomes are boxed.



1 **Figure 3.** Analysis of the syntenic configuration of the multigene families on the chromosome-
2 pair No. 3 of *Triportheus signatus*. Metaphase plate of *T. signatus* and the pair No. 3 in detail;
3 note the longitudinal distribution of the 5S (green), 18S rDNAs (yellow) and the U2 snDNA (red)
4 along this chromosome pair. Bar = 5 μ m.

Capítulo 4

Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae)

Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember, Liehr T, Cioffi MB

Heredity: DOI: doi:10.5061/dryad.8m201

Abstract

1 The main objectives of this study were to test (i) if the W chromosome differentiation matches
2 to species' evolutionary divergence (phylogenetic concordance) and (ii) if sex chromosomes
3 share a common ancestor within a congeneric group. The monophyletic genus *Triportheus*
4 (Characiformes, Triportheidae) was the model group for this study. All species in this genus so
5 far analyzed have ZW sex chromosome system, where the Z is always the largest chromosome
6 of the karyotype, while the W chromosome is highly variable ranging from almost
7 homomorphic to highly heteromorphic. We applied conventional and molecular cytogenetic
8 approaches including C-banding, rDNA mapping, comparative genomic hybridization (CGH)
9 and cross species whole chromosome painting (WCP) to test our questions. We developed Z
10 and W chromosome paints from *T. auritus* for cross species WCP and performed CGH in a
11 representative species (*T. signatus*) to decipher level of homologies and rates of differentiation
12 of W chromosomes. Our study revealed that the ZW sex chromosome system had a common
13 origin, showing highly conserved Z chromosomes and remarkably divergent W chromosomes.
14 Notably, the W chromosomes have evolved to different shapes and sequence contents within
15 ~15-25 MYA of divergence time. Such differentiation highlights a dynamic process of W
16 chromosome evolution within congeneric species of *Triportheus*.

17
18
19 **Keywords:** whole chromosome painting (WCP), comparative genomic hybridization (CGH),
20 evolutionary dynamics, Z chromosomes, fish species.

1 **Introduction**

2 Sex chromosomes are thought to have evolved from an autosomal pair when a sex-
3 determining region or locus (SDL) evolves on one of the homologues (Bull, 1983; Charlesworth,
4 1991). Interaction of SDL with sexually antagonistic polymorphisms maintained in linked genes
5 is thought to have favored recombination suppression between the nascent sex chromosomes
6 (Bachtrog, 2006) and the subsequent acquisition of neutral and deleterious mutations (genetic
7 degeneration), amplification of repetitive DNA sequences and heterochromatinization of the sex-
8 specific chromosome (Charlesworth et al. 2005; Bachtrog, 2006). Therefore, differences in size
9 and gene content can be found among the sex chromosomes, in which the Y (or W) may undergo
10 variable degrees of degeneration (Graves, 2006).

11 Here we study sex chromosome evolution in a fish genus. In teleost fishes, although most
12 species lack heteromorphic sex chromosomes, a variety of sex chromosome systems including
13 simple and multiple ones, can be found in some species (Devlin & Nagahama 2002; Cioffi et al.
14 2011a). Among the approximately 10% of teleost fish species studied that have detectably
15 heteromorphic sex chromosomes, most have female heterogamety (Devlin & Nagahama, 2002).
16 We studied one such group, the genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae) with ZW sex
17 chromosomes in 12 species so far analyzed. The Z is a metacentric chromosome, the largest in
18 the karyotype, while the W is always smaller than the Z, and varies in size and morphology
19 among species (Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al. 2001; Artoni
20 and Bertollo, 2002; Nirchio et al. 2007; Diniz et al. 2008a; Yano et al. 2014a; 2016). Besides, the
21 W chromosome is rich in heterochromatin and carries an 18S rDNA site on its long arms (Artoni
22 & Bertollo, 2002; Nirchio et al. 2007; Diniz et al. 2009; Marquioni et al. 2013; Yano et al. 2014a;
23 Schmid et al. 2015). Recently, a molecular phylogeny to the Triporthidae family was introduced
24 based on the 16S rRNA and Cytochrome *b* (*CytB*) mitochondrial genes, and on the recombination

1 activating gene 1 (*Rag1*), recombination activating gene 2 (*Rag2*) and myosin heavy chain 6
2 cardiac muscle alpha (*Myh6*) nuclear genes (Mariguela et al. 2016). According to this study,
3 *Triportheus* represent a monophyletic group originated at 26.2 ± 6.5 Myr, in which *T. auritus* is a
4 direct representative of the first lineage that differentiated in the genus at 20.7 ± 6.5 Myr, and
5 correspond to a sister group to all *Triportheus* species (Mariguela et al. 2016), as demonstrated in
6 the phylogenetic tree (**Figure 1**).

7 Molecular cytogenetics provides valuable tools and insights for comparative genomics
8 research and has emerged as promising for understanding genome evolution and organization. In
9 particular, whole chromosome painting (WCP) and comparative genomic hybridization (CGH)
10 have been effective methods for the identification and characterization of sex chromosomes,
11 tracking their origin and evolution among various taxa (Traut et al. 1999; Phillips et al. 2001;
12 Ezaz et al. 2005; Henning et al. 2008; Ráb et al. 2008; Cioffi et al. 2013; Pazian et al. 2013;
13 Symonová et al. 2015). However, the effectiveness of CGH technique can be limited to identify
14 nascent sex chromosomes with very small sex-specific sequences, as demonstrated in the iguana
15 *Oplurus fierinensis* (Altmanová et al. 2016).

16 In a diversity of organisms, heterochromatinization, accompanied by amplification of
17 tandem repeats, represents an important step in the morphological differentiation of simple sex
18 chromosome systems, especially in the ZW ones (Nanda et al. 2000; Kondo et al. 2004; Marchal
19 et al. 2004; Peichel et al. 2004; Charlesworth et al. 2005; Ezaz et al. 2009; Kejnovský et al.
20 2009). Same type of studies provided evidence that rDNA cistrons can also occur on the sex
21 chromosomes of distinct organisms (e.g. Goodpasture & Bloom, 1975; Yonenaga-Yassuda et al.
22 1983; Schmid et al. 1983; Morielle & Varella-Garcia, 1988; Cioffi et al. 2010a). In this sense, the
23 detection of the heterochromatin by C-banding procedures, as well as the mapping of rDNA
24 repeats represent helpful approaches for sex chromosomes identification and characterization.

1 Here we compared sex chromosomes of eight species from *Triportheus* genus using
2 multiple molecular and conventional cytogenetic tools, such as C-banding to detect
3 heterochromatin, rDNA mapping, CGH and WCP to characterize regions of homology between
4 the Z and W chromosomes, which we assume represent the ancestral state, as well as the size of
5 the W-specific region. Our study confirmed that the Z chromosomes are highly conserved and
6 revealed remarkably divergent W chromosomes shapes and sequence content.

1 **Materials and Methods**

2 Fish species and sample collection

3 Table 1 lists the individuals investigated, the collection locations and sexes, and the
4 numbers of cells' analyzed in the cytogenetic experiments. Collections had the authorization of
5 the Brazilian environmental agency ICMBIO/SISBIO (License number 48628-2). All species
6 were identified and deposited in the fish museum of the Laboratory of Biology and Genetic of
7 Fishes of the Universidade Estadual Paulista (UNESP – Botucatu – SP) (Table 1). The
8 experiments followed ethical and anesthesia rules in accordance with the Ethics Committee on
9 Animal Experimentation of the Universidade Federal de São Carlos (Process number CEUA
10 1853260315).

11 Chromosome preparations and C-banding

12 Mitotic chromosomes were obtained as described in Bertollo et al. (2015). Briefly, the
13 animals were treated with an aqueous solution of colchicine for 50–60 minutes, anesthetized and
14 sacrificed, and the chromosomal preparations were obtained from cells of the anterior kidney.
15 The C-positive heterochromatin was detected using barium hydroxide according to Sumner
16 (1972).

17 Chromosomes microdissection, probe preparation and fluorescence in situ hybridization (FISH)

18 Fifteen copies of the Z and 20 copies of the W chromosomes from *T. auritus*, since it
19 corresponds to a sister group to all *Triportheus* species (Mariguela et al. 2016), and harbors the
20 largest W chromosome. The chromosomes were manually microdissected and pooled before
21 amplifying by DOP-PCR, following protocol described in Telenius et al. (1992). Chromosome
22 paints were prepared following Yang et al. (2009). The Z probes were labeled via PCR with

1 SpectrumOrange-dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) and the W probes with SpectrumGreen-
2 dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) in a 30 cycle label-PCR with DOP primer, using 1 µl of the
3 primary DOP-PCR products as template DNA (Yang et al. 2009). 18S and 5S rDNA probes were
4 obtained according to Cioffi et al. (2009) and Martins et al. (2006), respectively. The 18S rDNA
5 probe was labeled with Cyanine 5-dUTP, while de 5S rDNA was labeled with Spectrum Green-
6 dUTP, using nick-translation method (Roche, Mannheim, Germany).

7 Three-color-FISH for Whole chromosome painting (WCP)

8 Cytogenetic preparations of males and females of the eight mentioned *Triportheus* species
9 were used for a three-color FISH experiment, combining microdissected Z and W chromosomes,
10 together with 18S rDNA probe, according to Yang et al. (2009). Since commercial salmon sperm
11 blocking DNA (Sigma-Aldrich) was not sufficient to block the hybridization of high-copy repeat
12 sequences, Cot1-DNA directly isolated from *T. auritus* female genome (prepared according to
13 Zwick et al. 1997), was used instead. Hybridization was performed for 16-18 h at 37 °C in a
14 moist chamber. After hybridization, the slides were washed for 5 min with 1x SSC at 65 °C, and
15 in 4x SSC/Tween using a shaker at RT and then rinsed quickly in 1xPBS. Subsequently, the slides
16 were dehydrated again in an ethanol series (70, 85 and 100%), 2 min each. After the complete
17 drying of the slides, the chromosomes were counterstained with DAPI/Antifading (1.2 mg/ml,
18 Vector Laboratories).

19 Preparation of probes for Comparative genomic hybridization (CGH)

20 The CGH experiments were performed in *T. signatus*, representing a species with one of
21 the smallest W chromosomes found among *Triportheus* species. The female gDNA was labeled
22 with Digoxigenin-11-dUTP using DIG-nick-translation Mix (Roche, Mannheim, Germany), and
23 the male gDNA was labeled with biotin-16-dUTP using BIO-nick-translation Mix (Roche), in

1 which 1 µg of gDNA was used, each. Hybridization mixture for one slide (25-30 µl) was
2 composed of 1 µg of labelled male gDNA, 1 µg of labelled female gDNA and 50 µg of sonicated
3 salmon sperm blocking DNA (Sigma-Aldrich).

4

5 FISH for CGH

6 The CGH experiments followed the methodology described by Symonová et al. (2015).
7 The hybridization signal was detected using a solution composed by anti-digoxigenin-FITC
8 (Roche) diluted in 0.5% bovine serum albumin (BSA) in PBS; and streptavidin-CY3 (Invitrogen
9 Life Technologies, San Diego, Calif., USA) diluted in PBS containing 10% normal goat serum
10 (NGS). The slides were then washed 4 times in 4× SSC and 0.01% Tween, 7 min each at 42 °C.
11 After the complete drying, the chromosomes were counterstained and mounted in antifade
12 containing 1.5 µg/ml DAPI (Cambio, Cambridge, United Kingdom).

13 Two-color FISH with 18S and 5S rDNA probes

14 18S and 5S rDNA sequences were mapped on female chromosome preparations of *T.*
15 *signatus* species, following the protocol described in Marquioni et al. (2013). For this
16 experiment, the 18S and 5S rDNA probe were labeled with SpectrumOrange-dUTP and
17 SpectrumGreen-dUTP, respectively, using nick-translation method (Roche, Mannheim,
18 Germany).

19 Microscopic analyses

20 At least 20 metaphase spreads were analyzed per individual to confirm the diploid
21 chromosome numbers, karyotype structure and FISH results. Images were captured by the
22 CoolSNAP system software, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA),
23 coupled to an Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan).

1 **Results**

2 C-banding and rDNA mapping

3 C-positive heterochromatin was consistently localized in the centromeric regions of
4 autosome pairs (data not shown). The Z chromosomes have additional heterochromatin in one or
5 both telomeric regions, depending on the species, while the W chromosomes were almost entirely
6 heterochromatic, except for the p arms in all species (**Figure 1**), in agreement with previous
7 studies (Artoni and Bertollo, 2002; Diniz et al. 2009; Yano et al. 2014a).

8 The two color FISH with 18S and 5S rDNA showed that both sites are co-localized on the
9 p arms of the chromosome pair 3 in *T. signatus*, with an 18S rDNA additional site adjacent to the
10 Wq telomere (**Figure 2**).

11
12 Comparative genomic hybridization (CGH)

13 CGH using male and female gDNA probes developed from *T. signatus* identified Z- and
14 W- specific sequences. In females, all chromosomes except the W stained equally with these
15 probes. The female- gDNA probe painted the whole W chromosome, with a very bright signal on
16 most of the Wq, as well as the telomeric region of both Z chromosome arms. Additionally, the p
17 arms of pair 3 also showed an extensive homology with the Wq region. With the male gDNA
18 probe, the W chromosome showed signals on Wp and the proximal region of Wq. The merged
19 images revealed that sequences from both sexes are shared on Wp and the proximal region of the
20 Wq arm, whereas female-specific sequences are concentrated in the terminal region of the Wq
21 (**Figure 2**).

1 *Sex chromosome paint preparation and cross species sex chromosomes painting*

2 The quality of both Z and W chromosome paints were validated by mapping them back
3 onto *T. auritus* metaphase spreads with salmon sperm DNA and *T. auritus* female specific Cot1-
4 DNA as suppressor. The probe mixed with salmon sperm DNA produced non-specific signals
5 (data not shown), while 5 µg/µl of *T. auritus* female specific Cot1-DNA was sufficient to block
6 non-specific signals, giving clear hybridization signals on Z and W chromosomes, and
7 identifying probes that are largely or completely Z- or W-specific (**Figures 3 and 4**).

8 Together with the Z and W probes, an additional 18S rDNA probe was used in a three
9 color FISH experiment to clearly identify the W chromosome in the metaphase plates, since the
10 W chromosome carries a huge 18S rDNA cistron in the Wq arms of all *Triportheus* species. The
11 Z probe from *T. auritus* completely painted the Z chromosome of all other species. The W
12 chromosome of this species also displayed fluorescence signals in the p arms, but there were
13 remarkable differences among species, with only *T. guenteri*, *T. nematurus* and *T. albus* showing
14 strong hybridization signals across the whole Wp. A major part of the Wq arms was also painted
15 with the Z probe in all species, with the exception of *T. aff. rotundatus* and *pantanensis* (**Figures**
16 **3 and 4**).

17 A high level of homology was found for the W chromosome among species, but with
18 different hybridization patterns (**Figures 3 and 4**). Using the W-probes, the W chromosome was
19 homogeneously painted along its entire length in all species, except for the Wq telomeric region
20 and the centromeric region of *T. aff. rotundatus* and *T. pantanensis* (**Figures 3 and 4**). In all
21 species, the W probe also painted the Z chromosome in the centromeric and telomeric regions of
22 the p arms, with the exception of *T. auritus*, in which only the telomeric region was painted
23 (**Figures 3 and 4**). Since the whole chromosome painting experiments were performed using a *T.*
24 *auritus* female Cot1-DNA as a competitor, the W-specific region (terminal part of the q arm) was

1 thus blocked and did not hybridized. Accordingly, on the euchromatic Z chromosome, only the
2 centromere (a highly repetitive region) and the ancestral homologous region (terminal part of the
3 p arm) were painted with the W probe, with the exception of the centromeric region of the Z
4 chromosome of *T. auritus*, which was also blocked or suppressed (**Figure 4**).

1 **Discussion**

2 Our study demonstrated that the ZW sex chromosome system in *Triportheus* had a
3 common origin, considering the homology found in all species using the Z and W chromosomes
4 probes from *T. auritus*; however, the W chromosomes have undergone rapid discordant
5 differentiation, since differential hybridization patterns was verified for these chromosomes in
6 WCP experiments. In fact, the W chromosomes display a differential molecular composition, size
7 and morphology among species despite their evolutionary relationships, highlighting the dynamic
8 process that shapes the differentiation of the sex chromosomes. In addition, our study provided
9 molecular cytogenetic evidence of the chromosomal rearrangement involving rDNA locus,
10 highlighting its probable role in the evolution of the sex chromosomes by facilitating the reduced
11 recombination and the subsequent accumulation of repetitive sequences on the W chromosome,
12 which ultimately led the evolution of highly differentiated sex chromosomes within this
13 congeneric group.

14
15 ***Chromosomal rearrangements and sex chromosomes differentiation***

16 It is clear that size reduction and accumulation of heterochromatin are events that are
17 associated with the differentiation of the W chromosome within *Triportheus* species (**Figure 1**).
18 However, CGH and WCP experiments were able to clarify additional details on this evolutionary
19 pathway. In fact, both techniques were critical to demonstrate the sequences that are still shared
20 by both sex chromosomes or, otherwise, that those are more exclusive to one of them.
21 Noteworthy, it was evidenced that the end of the Wq has a high concentration of female specific
22 sequences (**Figures 2-4**), where an 18S rDNA cluster is also located in all *Triportheus* species so
23 far analyzed (Artoni & Bertollo, 2002; Nirchio et al. 2007; Diniz et al. 2009; Marquioni et al.
24 2013; Yano et al. 2014a). Sex chromosomes carrying 18S rDNA sequences have already been

1 reported in several other vertebrates, such as *Characidium* fishes (Scacchetti et al. 2015), cane
2 toad *Bufo marinus* (Abramyan et al. 2009), Chinese softshell turtle *Pelodiscus sinensis* (Kawai et
3 al. 2007) and tiger snake *Notechis scutatus* (O'Meally et al. 2010). However, the *Triporthesus*
4 case deserves further considerations due to the unusual and particular location of these sequences,
5 which do not occur in both homologues of the sex pair (only on the W chromosome) and in some
6 autosomes.

7 Unusually, the *Triporthesus* sex chromosomes do not have 18S rDNA sequences on both
8 homologues, but they are present only on the W chromosome. A huge 18S rDNA block is also
9 located on the p arm of the 3rd chromosome pair in all *Triporthesus* species. Besides, in some
10 species additional 18S rDNA sites are verified in other autosomes (Yano et al. submitted). The
11 18S rDNA region of the 3rd chromosome also showed high homology with the Wq, in our CGH
12 experiments, suggesting either that part of the 18S rDNA block was transposed from the W
13 chromosome to the 3p arm, or vice versa. Evidence for an 18S rDNA cluster in the telomeric
14 region of the Z chromosome was reported in *T. venezuelensis* and *T. angulatus* (Nirchio et al.
15 2007; Marquioni et al. 2013), which represent two of the most recently derived species, since
16 their lineage originated at 5.2 ± 2.3 and 2.6 ± 1.4 Myr, respectively (Mariguela et al. 2016).
17 Considering the fact that most species, including those originated from older *Triporthesus*
18 lineages, does not show an 18S rDNA cluster on the Z chromosome, it is more plausible to
19 assume that these sequences were firstly translocated onto W and latter transposed from the W to
20 the Z chromosome in *T. venezuelensis* and *T. angulatus*, in independent events. However, an
21 alternative scenario in which these sequences were originally carried on both sex chromosomes,
22 and that their present distribution reflects subsequent loss from the Z in some species, cannot be
23 fully excluded (Artoni and Bertollo, 2002).

1 It is tempting to speculate that maintenance and amplification of the rDNA sites on the W
2 chromosome might have promoted reduced recombination between the ZW pair (see **Figure 5**).
3 It has been proposed that polymorphisms in the rDNA locus in *Salvelinus* species may have acted
4 in a similar way to limit crossing over near the sex locus (Reed & Philips, 1997). Besides 18S
5 rDNA, the W chromosome of *Triportheus* is rich in other repetitive DNA classes, as evidenced
6 by the variable accumulation of microsatellites and U2 snDNA (Yano et al. 2016; Yano et al.
7 submitted). Therefore, we cannot rule out the possible involvement of distinct classes of
8 repetitive DNA sequences in the differentiation process of W chromosome. Our WCP and CGH
9 experiments clearly demonstrate that much of the Wq is a W-specific region (**Figures 2-4**), but
10 that differentiation of the W chromosome morphology, associated with heterochromatinization,
11 and probably with degeneration, evolved independently in different *Triportheus* lineages (**Figure**
12 **5**). These changes are specific to the W chromosome, whereas other chromosomes, including the
13 Z, remain similar in the *Triportheus* species so far analyzed, supporting the monophyletic status
14 of this genus, but indicating that the female-specific sex chromosome is subject to particular
15 evolutionary forces not shared by other chromosomes. Moreover, as the sex specific chromosome
16 can experience different evolutionary forces, parameters like effective population size and sexual
17 selection may also affect how the recombination suppression evolves (Graves, 2006; Bachtrog et
18 al. 2011), even among closely related species as *Triportheus* case.

19
20 ***Common origin of the ZW sex system in Triportheus and differentiation of the W chromosome***

21 The Triporthidae include four other genera, including *Lignobrycon*, in which *L. myersi*
22 represents the only species currently described, corresponds to the sister group of all other
23 Triporthidae (Mariguela et al. 2016). Recent analyses indicate a similar ZW sex chromosome
24 system in *L. myersi* (Rodrigues et al. 2016), suggesting an early origin of the ZW system in the

1 family, an unusual situation among fishes, where sex chromosomes have evolved independently
2 among congeneric species, or even within the same species (Cioffi et al. 2013).

3 The molecular divergence, demonstrated by cross species WCP, and the variable
4 morphological forms, underline the process shaping the evolution of the sex-specific
5 chromosome in *Triportheus*. Rapid degeneration of recently formed Y chromosomes has been
6 demonstrated in *Drosophila* (Bachtrog et al. 2008) and sticklebacks (Peichel et al. 2001).
7 However, there are few empirical data for W chromosomes. The data presented here suggest that
8 the W chromosomes of *Triportheus* have evolved during a relative short (~15-25 MYA)
9 divergence time (phylogenetic data from Mariguela et al. 2016), displaying different genomic
10 composition in terms of repetitive DNA sequences, size, and morphology among species,
11 including accumulation of microsatellites, TEs and rDNAs on the W chromosomes (Yano et al.
12 2014a), like the situation in the W chromosomes of pyralid moths (Vítková et al. 2007).

13 The current situation in *Triportheus* resembles sex chromosome evolution in other taxa, such
14 as birds and snakes. In primitive ratite birds, the W chromosome is almost the same size as the Z
15 (Shetty et al. 1999), and this may represent the ancestral condition from which other bird W
16 chromosomes have evolved (Ferguson-Smith, 2007). Similarly, *T. auritus*, the earliest branching
17 extant *Triportheus* species (Mariguela et al. 2016), has the largest W chromosome, with a size
18 comparable to the Z (**Figure 1**). However, we detect no correlation between the size reduction of
19 the W chromosome and the divergence time between *Triportheus* species (**Figure 1**). Similarly,
20 various bird species also show variations in the morphology of the W chromosome, but no clear
21 pattern of gradual reduction in size over time (Rutkowska et al. 2012).

1 **Conclusions**

2 Overall, our study provides evidence for the common origin of a sex chromosome system
3 within a congeneric group, which corresponds to an uncommon event among fish species, even
4 among much related ones, where independent evolution is more common. It is also remarkable
5 that rapid differentiation of the sex specific chromosome occurred in size, shape and sequence
6 content, likely favored by recombination reduction between the sex pair in view of the
7 maintenance and amplification of specific genome sequences in the W chromosome. Our study
8 provides unique opportunity for fine scale analysis of sex chromosome sequences in this group
9 through sequencing and sequence analysis of microdissected sex chromosomes which will assist
10 in discovering novel sex determining genes and mechanisms of sex chromosome evolution in
11 vertebrates in general.

12 **Acknowledgments**

13 This study was supported by the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de
14 Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Proc. no 306896/2014-1), FAPESP (Fundação de
15 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Proc. no 2014/22532-7), and CAPES (Coordenação
16 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Bolsista da Capes - Proc. nº BEX 11744/13-
17 8). TE is partially supported by an Australian Research Council Future Fellowship
18 (FT110100733).

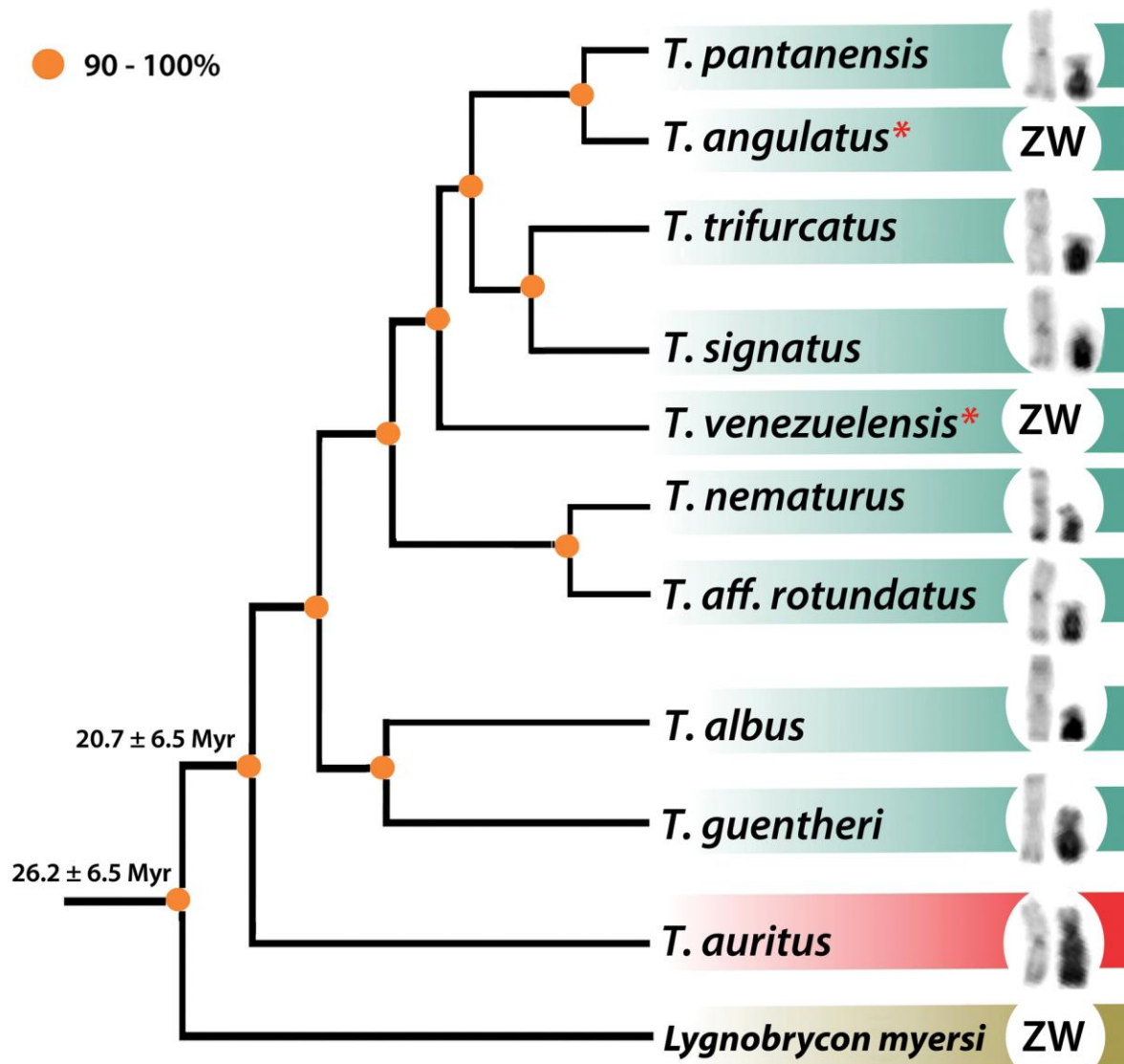
19 **Referencias Bibliográficas**

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

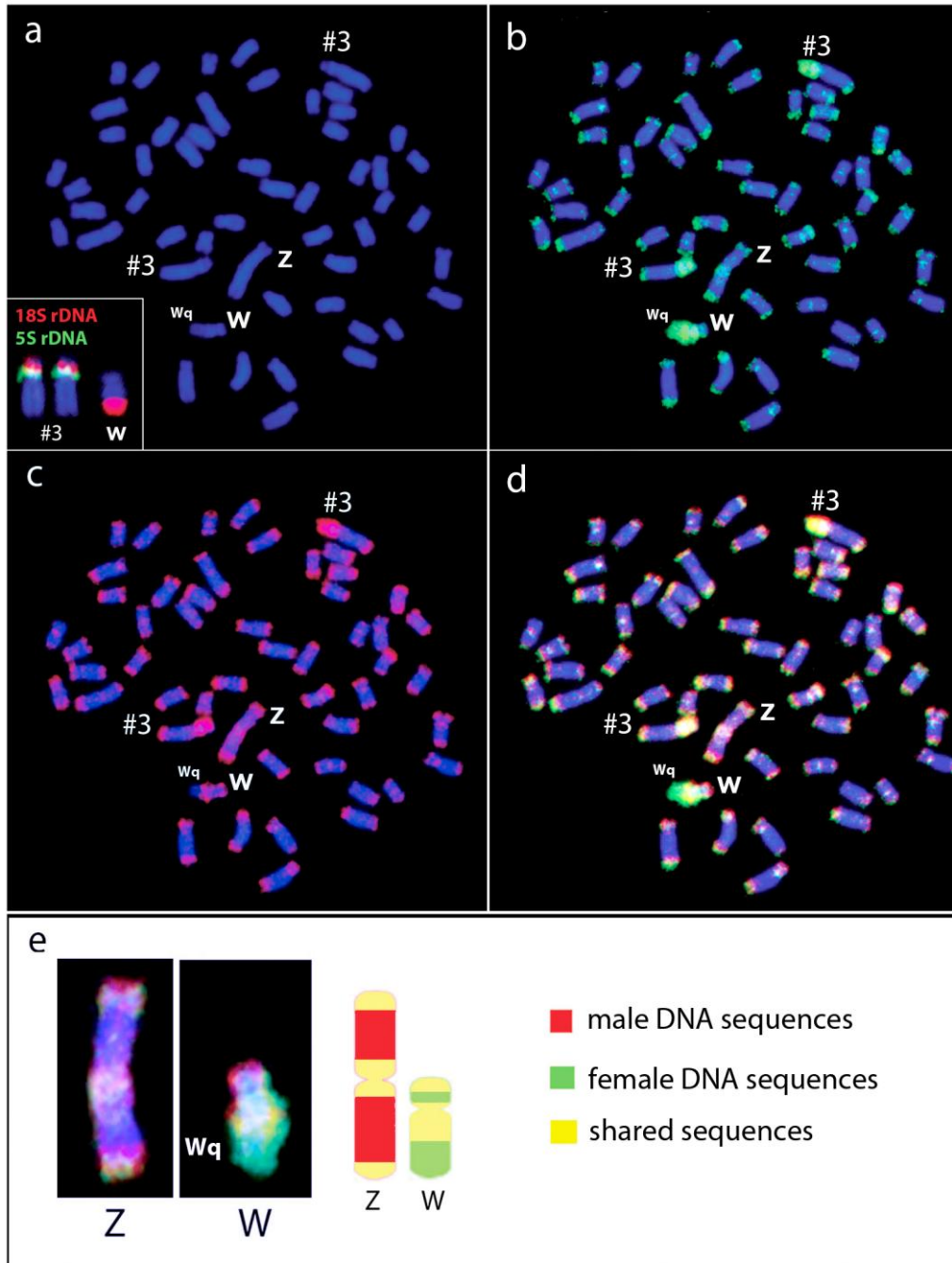
1 **Figures and Table**

2 **Table 1.** Brazilian collection sites of the *Triportheus* species and number of individuals in this
3 study

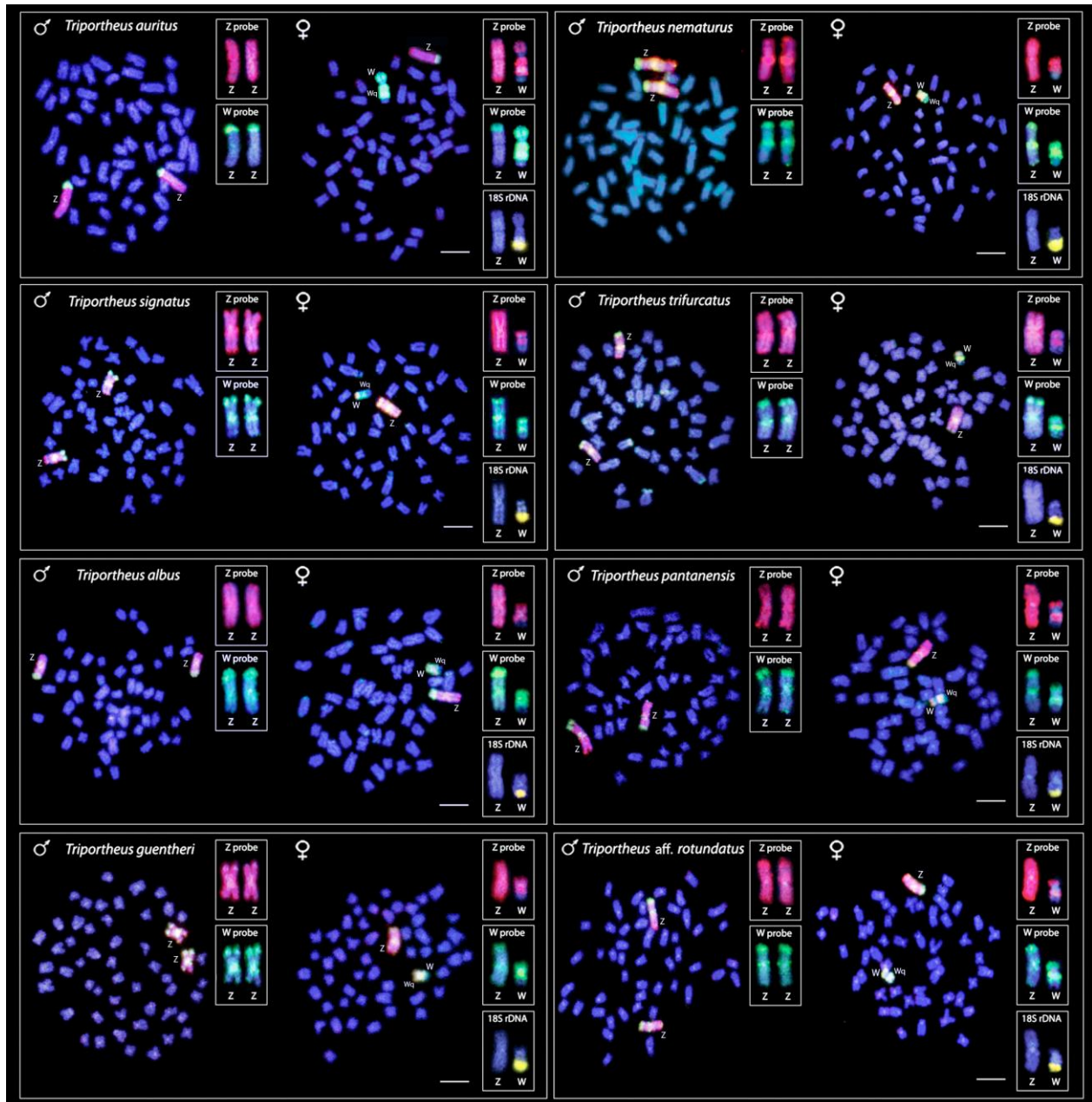
| Species | Site | Basin | N | Deposit number |
|---|------------------|--------------------|---------------|-----------------------|
| <i>Triportheus albus</i> | Araguaia river | Araguaia-Tocantins | (04 ♀ ; 04 ♂) | LBP18620 |
| <i>Triportheus auritus</i> | Araguaia river | Araguaia-Tocantins | (05 ♀ ; 04 ♂) | LBP18622 |
| <i>Triportheus guentheri</i> | Inhuma lake | São Francisco | (12 ♀ ; 06 ♂) | LBP18628 |
| <i>Triportheus nematurus</i> | Paraguai river | Paraguai | (09 ♀ ; 07 ♂) | LBP18624 |
| <i>Triportheus pantanensis</i> | Paraguai river | Paraguai | (01 ♀ ; 01 ♂) | LBP18623 |
| <i>Triportheus</i> aff. <i>rotundatus</i> | Paraguai river | Paraguai | (19 ♀ ; 21 ♂) | LBP18625 |
| <i>Triportheus signatus</i> | Piracicaba river | Tietê | (13 ♀ ; 24 ♂) | LBP18619 |
| <i>Triportheus trifurcatus</i> | Araguaia river | Araguaia-Tocantins | (04 ♀ ; 11 ♂) | LBP18621 |



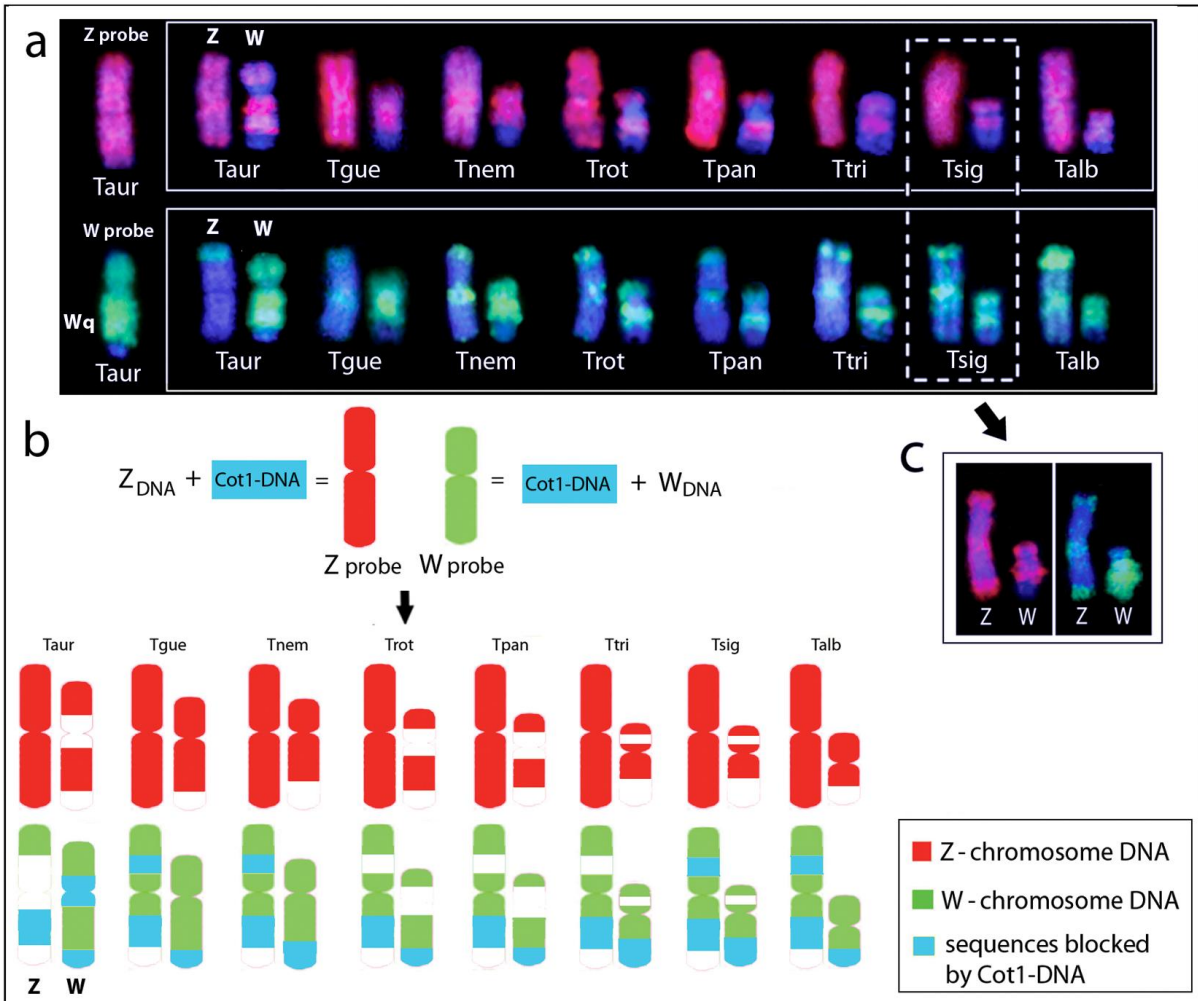
1 **Figure 1.** Adapted phylogenetic tree for the *Triportheus* genus, based on the phylogenetic data
2 generated by Mariguela et al. (2016), with the respective C-banded Z and W chromosomes
3 evidencing the divergence in size of the later. Besides the species analyzed in this study, *T.*
4 *venezuelensis* and *T. angulatus* (indicated in asterisks) were also included. Note that *T. auritus*,
5 which corresponds to a sister group to all *Triportheus* species, carries the larger W chromosome,
6 while *T. albus* has the smaller one compared with its congeneric species.



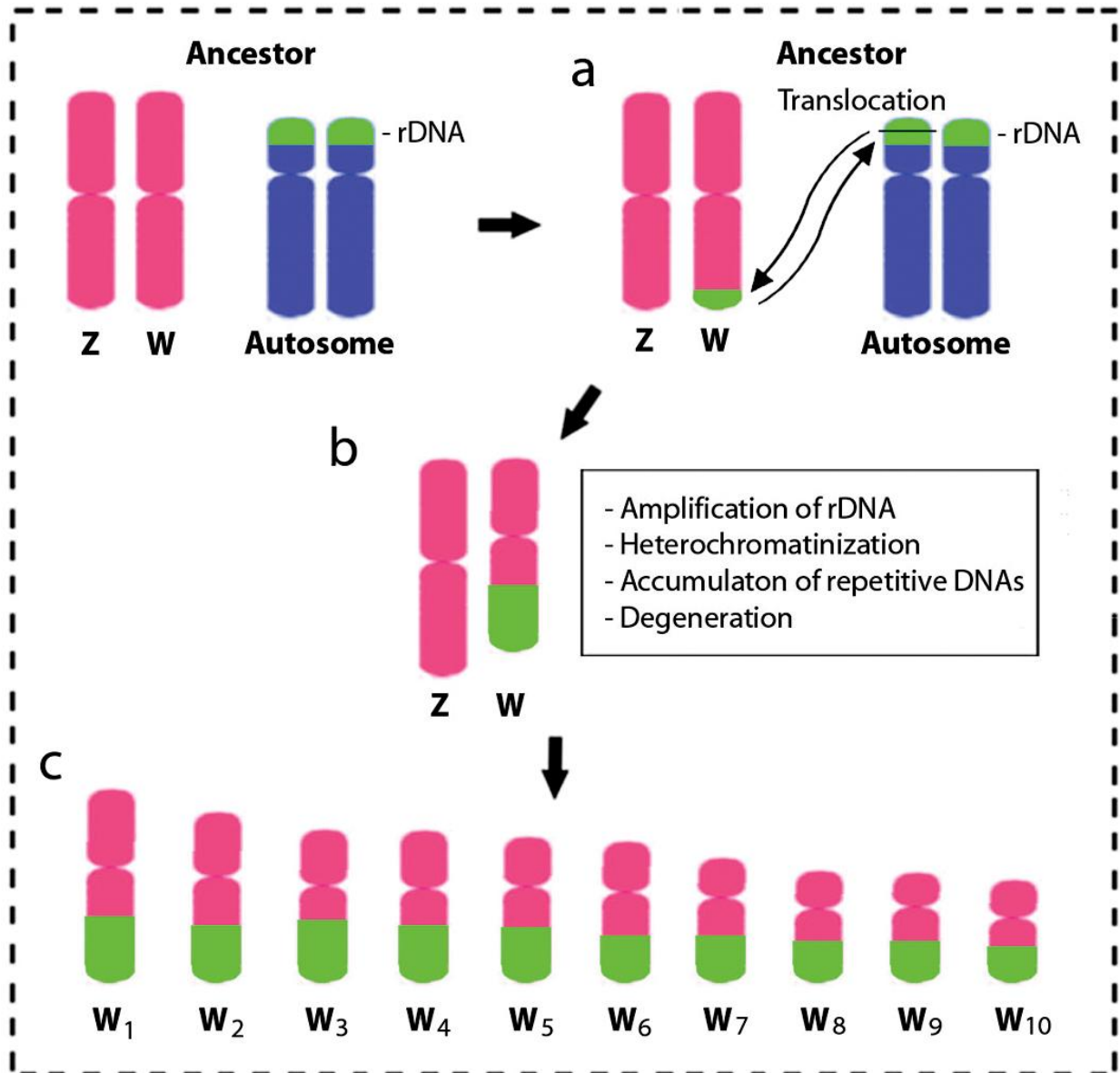
1 **Figure 2.** CGH on female metaphase of *T. signatus*, with emphasis on the Z and W
 2 chromosomes. The superposition of male and female gDNA probes highlights chromosomal
 3 regions sharing male and female sequences and the prevalence of female or male specific
 4 sequences. DAPI staining (a). Hybridization with gDNA female probe (b). Hybridization with
 5 gDNA male probe (c). Superposition of female and male gDNA probes (d). In (e) the sex
 6 chromosomes after the superposition of female and male gDNA probes are highlighted in
 7 enlarged forms, together with schematic diagrams summarizing the results, evidencing the
 8 accumulation of female-specific sequences in the terminal region of the Wq. The chromosome
 9 pair 3 and the W chromosome harboring 18S and 5S rDNA are boxed. Bar = 5 μ m



1 **Figure 3** - Cross species chromosome painting using W-chromosome (green), Z-chromosome
 2 (red) probes, both obtained from *T. auritus*, together with an 18S rDNA probe (yellow) in a three
 3 color FISH experiment. The sex chromosomes are highlighted in boxes. Note the location of 18S
 4 rDNA sequences on the telomeric Wq. The additional 18S rDNA sites located on autosomes are
 5 not shown. Bar = 5 μ m.



1 **Figure 4** - Hybridization patterns on the sex chromosomes of *Triportheus* species using Z and W
 2 chromosome probes (**a**). Note that the sex chromosomes showed evident FISH signals with both
 3 Z and W probes, although with a variable pattern among species. In (**b**), the diagrams explaining
 4 the observed hybridization patterns, taking account the use of Cot11-DNA from a female of *T.*
 5 *auritus* as a competitor. The W-specific regions (terminal part of the q arm) were thus blocked
 6 and did not hybridize. Accordingly, on the euchromatic Z chromosome, only the centromeric
 7 highly repetitive region and the ancestral homologous region (terminal part of the p arm) were
 8 painted with the W probe. In (**c**) ZW chromosomes after CGH experiments performed in *T.*
 9 *signatus* are highlighted.



1 **Figure 5** - Schematic diagram summarizing the proposed chromosome rearrangements leading to
 2 the evolution of sex chromosomes in *Triportheus* species. Fission and translocation event
 3 involving the p arm of an ancestral chromosome 3 occurred within an 18S rDNA cluster onto the
 4 W chromosome, or vice versa, in a common ancestor (a). Subsequently, such 18S rDNA cistron
 5 was amplified in W chromosome (b). Finally, while the Z kept morphologically conserved, the
 6 W had extensive morphological and size variations, due to rDNA expansion,
 7 heterochromatinization and repetitive DNA accumulation, in which the degree of degeneration
 8 and the differentiation later evolved independently in each *Triportheus* species (c). W₁ = *T.*
 9 *auritus*; W₂ = *T. guentheri*; W₃ = *T. signatus*; W₄ = *T. rotundatus*; W₅ = *T. nematurus*; 6 = *T.*
 10 *pantanensis*; W₇ = *T. trifurcatus*; W₈ = *T. venezuelensis* (data from Nirchio et al. 2007); W₉ = *T.*
 11 *angulatus* (data from Diniz et al. 2009); W₁₀ = *T. albus*.



Considerações Finais

1 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 A proposta deste estudo foi investigar os processos evolutivos associados à origem e
3 diferenciação dos cromossomos sexuais nas espécies de *Triportheus*, considerando o excelente
4 modelo apresentado por este gênero. De fato, o cenário presente em *Triportheus* propiciou uma
5 abordagem comparativa aprofundada sobre a dinâmica evolutiva dos cromossomos sexuais entre
6 várias de suas espécies, usando ferramentas diversificadas da citogenética convencional e
7 molecular, como o bandamento-C, mapeamento de DNAr e diversas outras classes de DNAs
8 repetitivos, hibridização genômica comparativa (CGH) e pintura cromossômica total (WCP). Os
9 resultados obtidos possibilitaram avaliar divergências e similaridades genômicas entre os
10 cromossomos sexuais, obtendo-se avanços significativos no conhecimento da história evolutiva
11 do sistema ZZ/ZW nesse grupo da nossa ictiofauna.

12 O acúmulo preferencial de várias sequências de DNA repetitivo no cromossomo W
13 destacou o papel deste componente do genoma na diferenciação desse cromossomo.
14 Notadamente, o acúmulo diferencial de microssatélites no cromossomo W evidenciou processos
15 evolutivos específicos entre as diferentes espécies, bem como um padrão acumulativo que não
16 apresenta correlação direta com a ancestralidade desse cromossomo, evidenciando emergências
17 evolutivas aparentemente aleatórias entre as espécies. Por sua vez, o acúmulo desigual de uma
18 mesma classe de microssatélites, tanto entre espécies mais distantes como intimamente
19 relacionadas, colocou em evidência o dinamismo dessas repetições no processo evolutivo, bem
20 como a plasticidade da diferenciação dos cromossomos sexuais entre espécies estreitamente
21 relacionadas e que compartilham de um mesmo sistema. Em contraste, o cromossomo Z se
22 caracteriza por um padrão de hibridização bastante conservado, similar ao que ocorre nos
23 cromossomos autossomos, com raras exceções.

1 O mapeamento cromossômico do DNAr 5S e 18S e do DNAsn U2 também evidenciou
2 um cenário bastante particular na distribuição dessas famílias multigênicas em *Triportheus*. A
3 variabilidade em relação ao número de sítios de DNAr, bem como o “status” sintênico dessas
4 três famílias, evidenciaram a participação diferenciada desses genes ao longo do processo
5 evolutivo, mesmo entre espécies proximamente relacionadas. Estudos prévios já haviam
6 apontado para uma organização distinta dos DNAr entre as espécies de *Triportheus*. Porém, os
7 dados agora obtidos com o emprego do *software* “ISIS digital FISH imaging”, possibilitou
8 constatar a distribuição longitudinal e adjacente dessas sequências quando situadas em um
9 mesmo cromossomo. A ocorrência de DNAsn U2 no cromossomo W de *T. albus* representa uma
10 novidade evolutiva, correspondendo ao segundo relato na literatura sobre o acúmulo dessas
11 sequências em cromossomos sexuais de peixes. Por sua vez, a ocorrência de DNAr 18S no
12 cromossomo W de *Triportheus* confirmou sua condição conservada no gênero, assim como uma
13 peculiaridade do processo evolutivo deste cromossomo, visto que todas as espécies analisadas
14 até o momento são portadoras dessas sequências.

15 O emprego de WCP, e principalmente de CGH, possibilitou demonstrar a localização de
16 sequências que são compartilhadas pelos cromossomos Z e W, bem como de sequências que
17 são exclusivas de cada um deles. Assim, a região Wq terminal se caracteriza por uma grande
18 concentração de sequências específicas de fêmeas, em coincidência com a localização do
19 cluster de DNAr 18S nesse cromossomo. Adicionalmente, um grande bloco de DNAr 18S está
20 também localizado na região terminal 3p de todas as espécies, a qual evidencia destacada
21 homologia com o segmento terminal Wq. Tendo em vista que a ocorrência de sequências de
22 DNAr em cromossomos sexuais não constitui uma condição usual entre as espécies, foi
23 considerada como uma hipótese provável que parte do sítio DNAr 18S 3p tenha sido
24 transferido para o proto-par sexual. Consequentemente, tais sequências estariam então

1 presentes em ambos os homólogos deste par numa fase inicial de sua diferenciação, sendo
2 posteriormente eliminadas do cromossomo Z da maioria das espécies após a aquisição de um
3 lócos sexo-específico pelo cromossomo W e a restrição de recombinação entre os
4 cromossomos Z e W. No entanto, sequências de DNAr 18S na região telomérica do
5 cromossomo Z só foram até agora constatadas em *T. venezuelensis* e *T. angulatus*. Assim
6 sendo, tendo em vista que conforme filogenia do grupo essas duas espécies se situam entre as
7 mais recentes do gênero, uma hipótese alternativa inclui a possibilidade de que esses cistrons
8 estariam originalmente presentes apenas no W e que foram transferidos para o cromossomo Z
9 dessas espécies como eventos independentes.

10 Nossos dados também demonstraram que o sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais
11 teve, de fato, uma origem comum para as espécies do gênero *Triportheus*, considerando as
12 homologias encontradas nos mapeamentos cromossômicos com sondas dos cromossomos
13 sexuais Z e W. *Triportheus auritus* é o representante direto da primeira linhagem a se
14 diferenciar no gênero e experimentos de WCP, utilizando a sonda do cromossomo Z desta
15 espécie, mostrou que este cromossomo se encontra notavelmente conservado em todas as
16 espécies investigadas. Por outro lado, o cromossomo W apresentou padrões variáveis de
17 homologia entre as espécies, indicando a aquisição de sequências W específicas durante o
18 processo evolutivo, incluindo elementos repetitivos. De fato, a divergência molecular do
19 cromossomo W, demonstrada pelos experimentos WCP cruzados entre as espécies, assim como
20 as suas diversas formas morfológicas, evidenciam que este cromossomo foi diferencialmente
21 moldado ao longo da sua história evolutiva. De fato, a associação dos dados citogenéticos e
22 filogenéticos destacam que o cromossomo W de *Triportheus* evoluiu durante um tempo

1 relativamente curto (~15-25 milhões de anos), exibindo diferenças interespecíficas na
2 composição genômica, tamanho e morfologia.

3 Em conclusão, os resultados do presente estudo possibilitaram atestar a origem
4 comum do sistema ZZ/ZW em *Triportheus*, destacando a participação de diferentes classes de
5 DNAs repetitivos na diferenciação do cromossomo sexo-específico entre as espécies, em
6 contraste com o acentuado conservadorismo apresentado pelo cromossomo Z. Por sua vez,
7 seqüências cromossômicas sexo específicas ou compartilhadas pelo par sexual puderam ser
8 evidências pela hibridização genômica comparativa, possibilitando inferir sobre as homologias
9 ainda existentes entre esses cromossomos e suas divergências decorrentes do processo
10 evolutivo. Assim sendo, avanços significativos foram alcançados no tocante ao entendimento
11 da origem e diferenciação dos cromossomos sexuais entre os vertebrados inferiores, tendo
12 como enfoque o modelo particular apresentado pelos peixes do gênero *Triportheus*.



Referências Bibliográficas

1 **6. REFERÊNCIAS**

- 2
- 3 Abramyán J, Ezaz T, Graves JAM, Koopman P (2009) Z and W sex chromosomes in the cane
4 toad (*Bufo marinus*). **Chromosome Res** 17:1015-1024.
- 5 Anderson P, Roth J (1981) Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium*
6 arise by unequal recombination between rRNA (rrn) cistrons. **Proc Natl Acad Sci USA**
7 78:3113–3117.
- 8 Albert JS, Bart HJ, Reis RE (2011a) Species Richness and Cladal Diversity, In: Historical
9 Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes, Albert JS, Reis RE (Eds), pp. 89–104,
10 University of California Press, Berkeley, CA.
- 11 Albert JS, Petry P, Reis RE (2011b) Major biogeographic and phylogenetic patterns, In:
12 Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes, Albert JS, Reis RE (Eds), pp.
13 21–57, University of California Press, Berkeley, CA.
- 14 Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Moysés CB, Fonteles SBA, Lopes CE, Akama A, et al.
15 (2002) Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia*
16 *virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae). **Cytogenet Genome Res** 99:164-169.
- 17 Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho S (2000) Sex chromosome evolution
18 in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes).
19 **Chromosoma** 109:197-200
- 20 Altmanová M, Rovatsos M, Kratochvíl L, Pokorná MJ (2016) Minute Y chromosomes and
21 karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae). **Biol J Linn**
22 **Soc** 118:618–633.
- 23 Ansari HA, Takagi N, Sasaki M (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in
24 three species of ratite birds. **Cytogenet Cell Genet** 47:185-188.
- 25 Artoni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) An uncommon condition for a sex
26 chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW
27 system in *Triportheus*. **Chromosome Res** 9:449-456.
- 28 Artoni RF, Bertollo LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in
29 the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W
30 chromosome. **Heredity** 89: 15–19.
- 31 Bachtrog D, Weiss S, Zangerl B, Brem G, Schlötterer C (1999) Distribution of dinucleotide
32 microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. **Mol Biol Evol** 16:602–610.
- 33 Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. **Curr Opin Genet Dev**
34 16:578–585.
- 35 Bachtrog D, Hom E, Wong K, Maside X, de Jong P (2008) Genomic degradation of a young Y
36 chromosome in *Drosophila miranda*. **Genome Biol** 9(2):R30.

- 1 Bachtrog D, Mank JE, McDaniel SF, Pires JC, Rice W, Valenzuela N (2011) Are all sex
2 chromosomes created equal?. **Trends Genet** 27:350-357.
- 3 Bachtrog D (2013) Y chromosome evolution: emerging insights into processes of Y chromosome
4 degeneration. **Nat Rev Genet** 14(2):113–24.
- 5 Barros LC, Junior PMG, Feldberg E (2016) Mapping 45S and 5S ribosomal genes in
6 chromosomes of Anostomidae fish species (Ostariophysi, Characiformes) from different
7 Amazonian water types. **Hydrobiologia** 1–13.
- 8 Bellafronte E, Schemberger MO, Moreira-Filho O, Almeida MC, Artoni RF, Margarido VP, et al.
9 (2011) Chromosomal markers in Parodontidae: An analysis of new and reviewed data
10 with phylogenetic inferences. **Rev Fish Biol Fisher** 21:559–570.
- 11 Bellafronte E, Schemberger MO, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari MR (2012) Sex
12 chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes,
13 Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genet Mol Biol** 35: 770-776.
- 14 Bergero R, Forrest A, Kamau E, Charlesworth D (2007) Evolutionary strata on the X
15 chromosomes of the dioecious plant *Silene latifolia*: evidence from new sex-linked genes.
16 **Genetics** 175:1945-1954.
17
- 18 Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias*
19 *lacerdae* (Pisces Erythrinidae). **Braz J Genet** 2: 103–120.
- 20 Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1983) Multiple sex chromosomes in the genus
21 *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia** 48: 1-12.
- 22 Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti PM Jr (1986) Cytogenetics and taxonomy considerations
23 based on chromosome studies of freshwater fish. **J Fish Biol** 28:153–159.
- 24 Bertollo LAC, Cavallaro ZI (1992) A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a
25 Characidae fish, *Triporthus guentheri*. **Cytogenet Cell Genet** 60: 60–63.
- 26 Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000) A biodiversity
27 approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey,
28 geographic distribution of cytotypes and citotaxonomic considerations. **Chromosome Res**
29 8:603-613.
- 30 Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF (2004) Chromosome evolution in the erythrinid fish,
31 *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity** 93:228–233.
- 32 Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O (2015) Direct chromosome preparation from
33 Freshwater Teleost Fishes, In: Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and
34 Teleosts), Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (Eds), pp. 21-261,
35 Enfield, CRC Press, USA.
- 36 Biémont C, Vieira C (2006) Junk DNA as an evolutionary force. **Nature** 443:521-524.

- 1 Born GG, Bertollo LAC (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias*
2 *malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res** 8:
3 111:118
- 4 Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms. Benjamin/Cummings, Menlo Park,
5 CA, pp.248-269
- 6 Busch H, Reddy R, Rothblum L, Choi YC (1982) SnRNAs, SnRNPs, and RNA Processing.
7 **Annu Rev Biochem** 51:617–654.
- 8 Calado LL, Bertollo LAC, Cioffi MB, Costa GWWF, Jacobina UP, Molina WF (2014)
9 Evolutionary dynamics of rDNA genes on chromosomes of the *Eucinostomus* fishes:
10 cytotaxonomic and karyoevolutive implications. **Genet Mol Res GMR** 13:9951–9959.
- 11 Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. **Science** 251:1030-33.
- 12 Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA
13 in eukaryotes. **Nature** 371: 215-220.
- 14 Charlesworth B, Charlesworth D (1997) Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by
15 Muller’s ratchet. **Genet Res** 70(1):63–73.
- 16 Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex
17 chromosomes. **Heredity** 95:118–128.
- 18 Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC (2009) Chromosomal variability
19 among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three
20 classes of repetitive DNAs. **Cytogenet Genome Res** 125:132–141.
- 21 Cioffi MB, Bertollo LAC (2010) Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias*
22 *malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y sex chromosome system in this fish
23 group. **Heredity** 105: 554–561.
- 24 Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC (2010a) Differentiation of the
25 XY Sex Chromosomes in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae):
26 Unusual Accumulation of Repetitive Sequences on the X Chromosome. **Sex Dev** 4:176-
27 185.
- 28 Cioffi MB, Martins C, Bertollo LA (2010b) Chromosome spreading of associated transposable
29 elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome
30 change and karyoevolution in fish. **BMC Evol Biol** 10:271.
- 31 Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC (2011a) Repetitive DNAs and Differentiation of Sex
32 Chromosomes in Neotropical Fishes. **Cytogenet Genome Res** 132:188–194.
- 33 Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, et al. (2011b) Cross-
34 species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in
35 two cofamiliar Erythrinidae fishes. **BMC Evol Biol** 11:186.

- 1 Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC (2011c) The Chromosomal Distribution of Microsatellite
2 Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the Sex
3 Chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 132:289–296
- 4 Cioffi MB, Bertollo LAC (2012) Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs
5 in Fish, In: Repetitive DNAs Genome Dynamics, Garrido Ramos (Ed), pp. 197-221,
6 Basel: Karger.
- 7 Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2012a) The contrasting role of
8 heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical
9 fishes. **J Fish Biol** 80:2125–2139.
- 10 Cioffi MB, Molina WF, Artoni RF, Bertollo LAC (2012b) Chromosomes as tools for discovering
11 biodiversity. The case of Erythrinidae fish family, In: Recent Trends in Cytogenetic
12 Studies - Methodologies and Applications, Padma Tirunilai (Ed), pp. 125-146, InTech
13 Open Access Publisher, Rijeka.
- 14 Cioffi MB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D, et al. (2012c) The key
15 role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex
16 chromosome system. **Mol Cytogenet** 5:28.
- 17 Cioffi MB, Liehr T, Trifonov V, Molina WF, Bertollo LAC (2013) Independent sex chromosome
18 evolution in lower vertebrates: a molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish
19 family. **Cytogenet Genome Res** 141: 186–194.
- 20 Cioffi MB, Bertollo LAC, Villa MA, Oliveira EA, Tanomtong A, Yano CF, et al. (2015)
21 Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Its Implications for the
22 Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes). **PLOS ONE**
23 10:e0130199.
- 24 Cross I, Díaz E, Sánchez I, Rebordinos L (2005) Molecular and cytogenetic characterization of
25 *Crassostrea angulata* chromosomes. **Aquaculture** 247:135–144.
- 26 Cross I, Merlo A, Manchado M, Ifante C, Canavate JP, Rebordinos L (2006) Cytogenetic
27 characterization of the *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-
28 NOR, (GATA)(n), (TTAGGG)(n) and ribosomal genes by one-color and two-color FISH.
29 **Genetica** 128:253–259.
- 30 Dahlberg JE, Lund E (1988) The Genes and Transcription of the Major Small Nuclear RNAs, In:
31 Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles,
32 Birnstiel PDML (Ed), pp 38–70, Springer, Berlin Heidelberg.
- 33 Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of
34 genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture** 208: 191-364.
- 35 Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008a) Molecular cytogenetics and characterization of
36 a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes,
37 Characidae). **Genetica** 133:85–91.

- 1 Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC (2008b) Microdissection and whole
2 chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei,
3 Characiformes). **Cytogenet Genome Res** 122:163–168.
- 4 Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC (2009) Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in
5 *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). **Genet Mol Biol** 32:37–41.
- 6 Drouin G, Sá MM (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat
7 units of other multigene families. **Mol Biol Evol** 12:481–493.
- 8 Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary
9 inference. **Trends Genet** 16: 551-558.
- 10 Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Genet**
11 5:435-445.
- 12 Ellegren H (2010) Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends Ecol Evol**
13 25:283–291.
- 14 Eschmeyer WN, Fong JD (2016) Species by Family/subfamily.
15 <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.
16 Accessed 19 Aug 2016.
- 17 Ezaz T, Sarre S, O'Meally D, Graves JA, Georges A (2009) Sex Chromosome Evolution in
18 Lizards: Independent Origins and Rapid Transitions. **Cytogenet Genome Res** 127: 249-
19 260.
- 20 Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre SD, Georges A, Graves JAM (2005) The dragon lizard *Pogona*
21 *vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. **Chromosome Res** 13:763-76.
- 22 Falcão JN (1988) Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei,
23 Characiformes, Characidae). PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP,
24 Brazil.
- 25 Faria R, Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of
26 evidence. **Trends Ecol Evol** 25:660–669.
- 27 Feldberg E, Bertollo LAC, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Moreira-Filho O, Santos AF (1987)
28 Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the
29 genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genome** 29: 1-4.
- 30 Ferguson-Smith M (2007) The Evolution of Sex Chromosomes and Sex Determination in
31 Vertebrates and the Key Role of DMRT1. **Sex Dev** 1:2-11.
- 32 Fernández R, Barragán MJL, Bullejos M, Marchal JA, Martínez S, Días de la Guardia R, et al.
33 (2001) Molecular and cytogenetic characterization of highly repeated DNA sequences in
34 the vole *Microtus cabreræ*. **Heredity** 87:637–646.

- 1 Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C (2007) Comparative chromosome mapping of 5 S rDNA
2 and 5S HindIII repetitive sequences in Erythrinidae fish (Characiformes) with emphasis
3 on *Hoplias malabaricus* “species complex”. **Cytogenet Genome Res** 118:78–83.
- 4 Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F (2011) Transposable elements as a potential
5 source for understanding the fish genome. **Mob Genet Elements** 1:112-117.
- 6 Froese R, Pauly D. Editors FishBase (2016) World Wide Web electronic publication. Disponível
7 em: <http://www.fishbase.org/search.php> Accessed 10 Jul 2016.
- 8 Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubíckova S, Marec F (2007) Probing the W
9 chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected
10 sex chromatin. **Chromosoma** 116:135.
- 11 Garcia C, Almeida-Toledo LF (2010) Comparative chromosomal analyses in species of the genus
12 *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical
13 polymorphisms. **Caryologia** 63:32-40.
- 14 García-Souto D, Troncoso T, Pérez M, Pasantes JJ (2015) Molecular Cytogenetic Analysis of the
15 European Hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA
16 Gene Clusters Map to the Same Location. **PLOS ONE** 10:e0146150.
- 17 Getlekha N, Molina WF, Cioffi MB, Yano CF, Maneechot N, Bertollo LAC, et al. (2016)
18 Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of
19 *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). **Genetica** 144:203–211.
- 20 Gilbert SF (2000) Developmental Biology. Oogenesis. Sunderland (MA), Sinauer Associates, 6th
21 edition. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10008/>
- 22 Gonçalves C, Batista VS (2008) Avaliação do desembarque pesqueiro efetuado em Manacapuru,
23 Amazonas, Brasil. **Acta Amazon** 38(1):135-144.
- 24 Goodpasture C, Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian
25 chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 53:3740.
- 26 Gornung E (2013) Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the
27 teleosts: A review of research. **Cytogenet Genome Res** 141(2-3):90–102
- 28 Goulding M (1980) The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history.
29 University of California Press, Los Angeles.
- 30 Graves JAM (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell** 124:
31 901-14.
- 32 Graves JAM (2008) Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex
33 chromosomes. **Ann Rev Genet** 42:565–586.
- 34 Handley LJ, Ceplitis H, Ellegren H (2004) Evolutionary strata on the chicken Z chromosome:
35 implications for sex chromosome evolution. **Genetics** 167:367-376.

- 1 Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y (1996) Distribution of 5S and 18S–
2 28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid
3 ancestors. **Chromosoma** 105:55–61.
- 4 Hatanaka T, Galetti PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish
5 *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**
6 122:239–244.
- 7 Hayman DL, Martin PG (1974) Mammalia I: Monotremata and Marsupialia, In: Animal
8 cytogenetics, Chordata 4, John B, Bauer H, Brown S, Kayano H, Levan A, White M
9 (Eds), Gebrüder Borntraeger, Berlin Stuttgart.
- 10 Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008) Non-homologous sex
11 chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes).
12 **Cytogenet Genome Res** 121:55–58.
- 13 Itoh Y, Kampf K, Arnold AP (2006) Comparison of the chicken and zebra finch Z chromosomes
14 shows evolutionary rearrangements. **Chromosome Res** 14:805–815.
- 15 Itoh Y, Kampf K, Arnold AP (2008) Molecular cloning of zebra finch W chromosome repetitive
16 sequences: evolution of the avian W chromosome. **Chromosoma**. 117(2):111–121.
- 17 Jurka J, Kapitonov VV, Smit AF (2003) Repetitive elements: detection, In: Nature Encyclope-
18 dia of the Human Genome, Cooper DN (Ed), pp 9–14, Nature Pub-lishing Group, London.
- 19 Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV (2007) Repetitive sequences in complex genomes:
20 structure and evolution. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 8: 241–259.
- 21 Katti MV, Ranjekar PK, Gupta VS (2001) Differential distribution of simple sequence repeats in
22 eukaryotic genome sequences. **Mol Biol Evol** 18(7):1161-1167.
- 23 Kawai A, Nishida-Umehara C, Ishijima J, Tsuda Y, Ota H, Matsuda Y (2007) Different origins
24 of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-
25 linked genes. **Cytogenet Genome Res** 117:92–102.
- 26 Kejnovský E, Hobza R, Čermak T, Kubat Z, Vyskot B (2009) The role of repetitive DNA in
27 structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity** 102:533-541.
- 28 Kejnovský E, Michalovova M, Steflava P, Kejnovska I, Manzano S, Hobza R, et al. (2013)
29 Expansion of Microsatellites on Evolutionary Young Y Chromosome. **PLoS ONE** 8(1):
30 e45519.
- 31 Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, et al. (1997) Cytogenetics
32 of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin
33 distribution, and sex chromosomes. **Chromosome Res** 5:12-22.
- 34
35 Kobayashi Y, Nagahama Y, Nakamura M (2013) Diversity and Plasticity of Sex Determination
36 and Differentiation in Fishes. **Sex Dev** 7:115-125
37

- 1 Kondo M, Nanda I, Hornung U, Schmid M, Scharl M (2004). Evolutionary origin of the medaka
2 Y chromosome. **Curr Biol** 14:1664–1669.
- 3 Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation in the Y
4 chromosome of *Silene Latifolia*. **Genome** 51: 350-356.
- 5 Kuzin FE, Shilova IE, Lezzi M, Gruzdev AD (2002) DNA in the centromeric heterochromatin of
6 polytene chromosomes is topologically open. **Chromosome Res** 10:201-208.
- 7 Lahn BT, Page DC (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. **Science**
8 286:964–967.
- 9 Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on
10 chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- 11 Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA
12 sequence evolution. **Mol Biol Evol** 4 (3): 203-221.
- 13 Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, et al. (2004) Role
14 of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature** 430: 471–
15 476.
- 16 López-Fernández H, Albert JS (2011) Paleogene radiations, In: Historical Biogeography of
17 Neotropical Freshwater Fishes, Albert JS, Reis RE (Eds), pp. 105–117, University of
18 California Press, Berkeley, CA.
- 19 López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012) The Repetitive DNA content of Eukaryotic
20 Genomes, In: Genome Dynamics Repetitive DNA, Garrido-Ramos MA (Ed), pp. 1-28,
21 Basel, SU, Karger.
- 22 Lowe-McConnell RH (1987) Ecological Studies in Tropical Fish Communities, Cambridge
23 University Press, Cambridge, UK.
- 24 Lundberg JG (1998) The temporal context for diversification of Neotropical fishes, In:
25 Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, Malabarba LR, Reis RE, Vari RP,
26 Lucena CAS, Lucena ZMS (Eds), pp-67–91, Edipucrs, Porto Alegre.
- 27 MacDonald AJ, Fitz Simmons NN, Chambers B, Renfree MB, Sarre SD (2014) Sex-linked and
28 autosomal microsatellites provide new insights into island populations of the tammar
29 wallaby. **Heredity** 112(3): 333–342.
- 30 Malabarba MCSL (2004) Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872
31 (Characiformes: Characidae). **Neotrop Ichthyol** 2: 167–204.
- 32 Manchado M, Zuasti E, Cross I, Merlo A, Infante C, Rebordinos L (2006) Molecular
33 characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a
34 new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome** 49:79–86.

- 1 Maneechot N, Yano CF, Bertollo LAC, Getlekha N, Molina WF, Sukhonthip D, et al. (2016)
2 Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus
3 *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). **Mol Cytogenet** 9:4.
- 4 Mangs AH, Morris BJ (2007) The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and
5 Future. **Curr Genomics** 8:129–136.
- 6 Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia R, et al. (2004) X
7 chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes.
8 **Chromosome Res** 12:767-776.
- 9 Mariguela TC, Roxo FF, Foresti F, Oliveira C (2016) Phylogeny and biogeography of
10 Triportheidae (Teleostei: Characiformes) based on molecular data. **Mol Phylogenet Evol**
11 96:130–139.
- 12 Marquioni V, Bertollo LAC, Diniz D, Cioffi MB (2013) Comparative chromosomal mapping in
13 *Triporthus* fish species. Analysis of synteny between ribosomal genes. **Micron** 45: 129–
14 135.
- 15 Martins C, Galetti Jr PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish
16 (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 7:363–367.
- 17 Martins C, Galetti Jr PM (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general
18 rule for fishes? **Genetica** 111:439–446.
- 19 Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish
20 genome, In: Focus on Genome Research, Williams CR (Ed), pp. 289-318, Nova Science
21 Publishers, Hauppauge.
- 22 Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr (2006) A tandemly repetitive
23 centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes:
24 Erythrinidae) is derived from 5 S rDNA. **Genetica** 127:133-141.
- 25 Matera AG, Weiner AM, Schmid CW (1990) Structure and evolution of the U2 small nuclear
26 RNA multigene family in primates: gene amplification under natural selection? **Mol Cell**
27 **Biol** 10:5876–5882.
- 28 Merlo MA, Cross I, Chairi H, Manchado M, Rebordinos L (2010) Analysis of three multigene
29 families as useful tools in species characterization of two closely-related species,
30 *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. **Genes Genet Syst**
31 85:341–349.
- 32 Merlo M.A, Cross I, Palazón JL, Úbeda-Manzanaro M, Sarasquete C, Rebordinos L (2012a)
33 Evidence for 5S rDNA Horizontal Transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus*
34 (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. **BMC Evol Biol**
35 12:201.
- 36 Merlo MA, Pacchiarini T, Portela-Bens S, Cross I, Manchado M, Rebordinos L (2012b) Genetic
37 characterization of *Plectorhynchus mediterraneus* yields important clues about genome
38 organization and evolution of multigene families. **BMC Genet** 13:33.

- 1 Merlo MA, Cross I, Rodríguez-Rúa A, Manchado M, Rebordinos L (2013a) First approach to
2 studying the genetics of the meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) using three
3 multigene families. **Aquac Res** 44:974–984.
- 4 Merlo MA, Cross I, Manchado M, Cárdenas S, Rebordinos L (2013b) The 5S rDNA High
5 Dynamism in *Diplodus sargus* is a Transposon-Mediated Mechanism. Comparison with
6 Other Multigene Families and Sparidae Species. **J Mol Evol** 76:83–97.
- 7 Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM (1980) Evidences for a multiple sex chromosome
8 system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**
9 33:83:91.
- 10 Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti PM (1993) Distribution of sex chromosome mechanisms
11 in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae).
12 **Caryologia** 46:115–125.
- 13 Morielle E, Varella-Garcia M (1988) Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid
14 bats. **Rev Bras Genet** 11(4):853-871.
- 15 Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2006) Harper - Bioquímica Ilustrada.
16 Editora Atheneu, São Paulo.
- 17 Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C (2012) Evolutionary
18 dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. **BMC Evol Biol** 12:198.
- 19 Nanda I, Zend-Ajusch E, Shan Z, Grützner F, Scharl M, Burt DW, et al. (2000) Conserved
20 synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes
21 the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination.
22 **Cytogenet Cell Genet** 89:67–78.
- 23 Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Granado A, Ron E (2007) Extensive polymorphism and
24 chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus*
25 *venezuelensis* (Characiformes, Characidae). **Genet Mol Biol** 30: 25–30.
- 26 Odierna G, Heulin B, Guillaume C, Vogrin N, Aprea G, Capriglione T, et al. (2001) Evolutionary
27 and biogeographical implications of the karyological variations in the oviparous and
28 viviparous forms of the lizard *Lacerta* (*Zootoca*) vivipara. **Ecography** 24: 332–340.
- 29 O’Meally D, Patel HR, Stiglec R, Sarre SD, Georges A, Graves JAM, et al. (2010) Non-
30 homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive
31 sequences. **Chromosome Res** 18:787-800.
- 32 Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to
33 populations. **Fish Physiol Biochem** 35: 81-100.
- 34 Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, et al. (2011) Phylogenetic
35 relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi:
36 Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC**
37 **Evol Biol** 11:275.

- 1 Oliveira EA, Bertollo LAC, Yano CF, Liehr T, Cioffi MB (2015) Comparative cytogenetics in
2 the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) highlights contrasting karyotype
3 evolution among congeneric species. **Mol Cytogenet** 8:56.
- 4 Ohno S (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- 5 Olmo E, Odierna G, Capriglione T (1987) Evolution of sex chromosomes in lacertid lizards.
6 **Chromosoma** 96(1):33Y38.
- 7 Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C (2004) Genome dynamics and
8 chromosomal localization of the non-LTR retro-transposons *Rex1* and *Rex3* in
9 Antarctic fish. **Antarctic Sci** 16: 51–57.
- 10 Pansonato-Alves JC (2010) Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* (Teleostei,
11 Characiformes, Chrenuchidae), com análise estrutural e molecular do sistema ZZ-ZW
12 de cromossomos sexuais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Instituto
13 de Biociências de Botucatu, SP.
- 14 Parise-Maltempi PP, da Silva EL, Rens W, Dearden F, O'Brien P, Trifonov V, et al. (2013)
15 Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei,
16 Characiformes) using chromosome painting. **BMC Genet** 14:60.
- 17 Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2013)
18 Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes,
19 Crenuchidae). **Genetica** 141:1–9.
- 20 Peichel CL, Nereng KS, Ohgi KA, Cole BLE, Colosimo PF, Buerkle AC, et al. (2001) The
21 genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. **Nature**
22 414:901–905.
- 23 Peichel CL, Ross JA, Matson CK, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, et al. (2004) The master
24 sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome.
25 **Curr Biol** 14:1416-1424.
- 26 Phillips RB, Ráb P (2001) Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. **Biol**
27 **Rev** 76:1-25.
- 28 Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein JD (2001) Chromosome painting supports lack of
29 homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus*. **Genetica**
30 111:119-123.
- 31 Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E (2011) Microsatellite distribution on sex chromosomes at
32 different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species
33 (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC**
34 **Genet** 12: 90.
- 35 Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, et al. (2014)
36 Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species
37 (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W Chromosomes.
38 **Cytogenet Genome Res** 142: 40-45.

- 1 Ráb P, Rabova M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikanova S (2008) Chromosome studies of
2 European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker
3 the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting.
4 **Chromosome Res** 16:863-873.
- 5 Rebordinos L, Cross I, Merlo A (2013) High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State
6 of the Art. **Cytogenet Genome Res** 141:103–113.
- 7 Reed KM, Phillips RB (1997) Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the
8 putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related.
9 **Chromosome Res** 5:221–227.
- 10 Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (2003) Check list of the freshwater fishes of South
11 America. Edipucrs, Porto Alegre.
- 12 Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the
13 coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a
14 divergent continental margin. **Neotropical Ichthyol** 4:225–246.
- 15 Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends Ecol Evol** 16:351–
16 358.
- 17 Rodrigues AS, Diniz D, Affonso PRAM (2013) Análise citogenética preliminar da piaba-facão
18 *Lignobrycon myersi* (Osteichthyes, Characiformes), espécie ameaçada do estado da
19 Bahia. XV Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Jequié, BA.
- 20 Rodrigues AS, Medrado AS, Diniz D, Oliveira C, Affonso PRAM (2016). ZZ/ZW sex
21 chromosome system in the endangered fish *Lignobrycon myersi* (Teleostei:
22 Characiformes: Triportheidae). **Comp Cytogenet** 10:245-254.
- 23 Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. (2005) The DNA
24 sequence of the human X chromosome. **Nature** 434:325–337.
- 25 Ruffino ML, Soares EC, Silva CO, Barthem RB, Batista V, Estupiñán G, et al. (2006) Estatística
26 Pesqueira do Amazonas e Pará, 2003. IBAMA, ProVárzea, Manaus.
- 27 Rutkowska J, Lagisz M, Nakagawa S (2012) The long and the short of avian W chromosomes: no
28 evidence for gradual W shortening. **Biol Lett** 8:636-638.
- 29 Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor
30 Laboratory Press, New York.
- 31 Sánchez S, Jorge LC (1999) A new report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus
32 *Triportheus* (Pisces, Triportheinae). **Cytologia** 64: 395–400.
- 33 Santos U, Volcker CM, Belei FA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Paiva R, et al. (2009) A. Molecular
34 and karyotypic phylogeography in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias*
35 *malabaricus* (Bloch, 1794). **J Fish Biol** 75: 2326–2343.

- 1 Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, et al.
2 (2015). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei,
3 Characiformes): Genomic Organization and Diversification of ZW Sex Chromosomes.
4 **Cytogenet Genome Res** 146:136-143.
- 5 Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, Artoni RA, et al.
6 (2012) Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal
7 closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**
8 139:1499–1508.
- 9 Schlötterer C (2000) Microsatellite analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex
10 chromosomes in *Drosophila americana americana*. **Heredity** 85:610–616.
- 11 Schmid M, Haaf T, Geile B, Sims S (1983) Chromosome banding in Amphibia. VII. An unusual
12 XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae).
13 **Chromosoma** 88:69-82.
- 14 Schmid M, Steinlein C, Yano CF, Cioffi MB (2015) Hypermethylated Chromosome Regions in
15 Nine Fish Species with Heteromorphic Sex Chromosomes. **Cytogenet Genome Res**
16 147:169–178.
- 17 Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard H (2001) Genomic and genetic
18 definition of a functional human centromere. **Science** 294: 109-115.
- 19 Schweizer D, Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band
20 patterns. **Chromosomes Tod** 9:61-74.
- 21 Sene VF (2011) Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia*
22 (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Dissertação de Mestrado. Universidade
23 Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, SP.
- 24 Shetty S, Griffin DK, Graves JAM (1999) Comparative painting reveals strong chromosome
25 homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome Res** 7:289-295.
- 26 Silva DS, Milhomem SSR, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2009) Cytogenetic studies in
27 *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the
28 origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. **BMC Genet** 10: 74.
- 29 Silva DMZA, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2015) Chromosomal
30 Mapping of Repetitive DNA Sequences in Five Species of *Astyanax* (Characiformes,
31 Characidae) Reveals Independent Location of U1 and U2 snRNA Sites and Association of
32 U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenet Genome Res** 146:144–152.
- 33 Splendore de Borba R, Lourenço da Silva E, Parise-Maltempi PP (2013) Chromosome mapping
34 of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* Spix, 1829 species
35 (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and
36 W sex chromosome. **Mob Genet Elements** 3(6):e27460.
- 37 Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell**
38 **Res** 75: 304–306.

- 1 Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pinthong K, et al (2013)
2 Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the
3 naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Mol Cytogenet** 6:1–7.
- 4 Stiglec R, Ezaz T, Graves JAM (2007) A new look at the evolution of avian sex chromosomes.
5 **Cytogenet Genome Res** 117, 103 – 109.
- 6 Symonová R, Sember A, Majtánová Z, Ráb P (2015) Characterization of Fish Genomes by GISH
7 and CGH, In: Fish Cytogenetic Techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans, Ozouf-
8 Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (Eds), pp 118 -131, CCR Press: Boca
9 Raton.
- 10 Tautz D, Trick M, Dover GA (1986) Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic
11 variation. **Nature** 322:652–656.
- 12 Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate
13 oligonucleotideprimed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate
14 primer. **Genomics** 13:718–725.
- 15 Thorgaard GH (1983) Chromosomal differences among rainbow trout populations. *Copeia*.
16 3:650–662.
- 17 Toder R, Wienberg J, Voullaire L, Maccarone P, Graves JAM (1997) Shared DNA sequences
18 between the X and Y chromosomes in the tammar wallaby-evidence for independent
19 additions to eutherian and marsupial sex chromosomes. **Chromosoma** 106:94–98
- 20 Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000) Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and
21 Analysis. **Genome Res** 10(7):967–981.
- 22 Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes
23 probed by comparative genomic hybridization. **Chromosoma** 108:173–180.
- 24 Traut W, Winking H (2001) Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in
25 fish: zebrafish, platyfish and guppy. **Chromosome Res** 9:659–672.
- 26 Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Serasquete C, Rebordinos L (2010)
27 Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2
28 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**
29 138:787–794.
- 30 Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2014) Comparative
31 Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species
32 (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in
33 *G. pantanal*. **Cytogenet Genome Res** 142:286–292.
- 34 Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BE, Martins C (2011) Cytogenetic
35 Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New Insights on
36 the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. **Cytogenet Genome Res**
37 133:34–42.

- 1 Vallender EJ, Lahn BT (2004) How mammalian sex chromosomes acquired their peculiar gene
2 content. **BioEssays** 26: 159–169.
- 3 Vari RP, Malabarba LR (1998) Neotropical ichthyology: an overview, In: Phylogeny and
4 classification of Neotropical fishes, Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS,
5 Lucena CAS (Eds), pp. 1-12, Edipucrs, Porto Alegre.
- 6 Veerappa AM, Padakannaya P, Ramachandra NB (2013) Copy number variation-based
7 polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-
8 transposed region (XTR) in the Y chromosome. **Funct Integr Genomics** 13:285–293.
- 9 Venere PC, Ferreira IA, Martins C, Galetti PM Jr (2004) A novel ZZ/ZW sex chromosome
10 system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica** 121:
11 75–80.
- 12 Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Diversification of a ZZ/ZW sex
13 chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**
14 134:311–317.
- 15 Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Origin and differentiation of
16 sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-
17 banding. **Genetica** 119:115-120.
- 18 Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W
19 chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). **Chromosome Res** 15:917–930.
- 20 Volff JN, Korting C, Sweeney K, Schartl M (1999) The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the
21 fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Mol Biol Evol** 16: 1427–1438.
- 22 Volff JN, Korting C, Schartl M (2000) Multiple Lineages of the Non-LTR Retrotransposon *Rex1*
23 with Varying Success in Invading Fish Genomes. **Mol Biol Evol** 17:1673–1684.
- 24 Volff JN, Korting C, Froschauer A, Sweeney K, Schartl M (2001) Non-LTR Retrotransposons
25 Encoding a Restriction Enzyme-Like Endonuclease in Vertebrates. **J Mol Evol** 52:351–
26 360.
- 27 Volff JN, Nanda I, Schmid M, Schartl M (2007) Governing Sex Determination in Fish:
28 Regulatory Putsches and Ephemeral Dictators. **Sex Dev** 1:85–99.
- 29 Walsh JB, Stephan W (2001) Multigene Families: Evolution, In: Encyclopedia Life Sci (Ed), pp.
30 1–6, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- 31 Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP (2009) Generation of paint probes by
32 flow-sorted and microdissected chromosomes, In: Fluorescence In Situ Hybridization
33 (FISH) –Application Guide, Liehr T (Ed), pp. 35-52, Springer, Berlin.
- 34 Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB (2014a) Chromosomal
35 Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes):
36 Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. **PLoS ONE** 9(3): e90946.

- 1 Yano CF, Carlos Bertollo LA, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB (2014b) Genomic organization of
2 repetitive DNAs and its implications for male karyotype and the neo-Y chromosome
3 differentiation in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comp Cytogenet**
4 8(2):139–151.
- 5 Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Cioffi MB (2016) W Chromosome Dynamics in
6 *Triportheus* Species (Characiformes, Triporthidae) - An Ongoing Process Narrated by
7 Repetitive Sequences. **J Hered** 107:342-348.
- 8 Yano CF, Bertollo LAC, Rebordinos L, Merlo MA, Portela-Bens S, Liehr T, et al. (submitted)
9 Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 snDNAs in *Triportheus* (Characiformes,
10 Triporthidae): high variability and particular syntenic organization.
- 11 Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S, L'Abbate M, Souza MJ (1983) Nucleolar
12 organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity
13 of rDNA genes in both X chromosomes of females. **Cytogenet Cell Genet** 35:143-147.
- 14 Zhou Q, Zhang J, Bachtrog D, An N, Huang Q, Jarvis ED, et al. (2014) Complex evolutionary
15 trajectories of sex chromosomes across bird taxa. **Science** 346:1246338.
- 16 Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Islam-Faridi MH, Stelly DM, Wing RA, et al. (1997) A
17 rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. **Genome** 40:138-142.