

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CONSERVAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE DNAs SATÉLITES: A
DIFERENCIAÇÃO DO CROMOSSOMO W EM *TRIPORTHEUS*
(TELEOSTEI: CHARACIFORMES)**

Mariannah Pravatti Barcellos de Oliveira

São Carlos
2023

Mariannah Pravatti Barcellos de Oliveira

**CONSERVAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE DNAs SATÉLITES: A
DIFERENCIAÇÃO DO CROMOSSOMO W EM
TRIPORTHEUS (TELEOSTEI: CHARACIFORMES)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
São Carlos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello
Cioffi

São Carlos
2023

Dedico este trabalho aos meus pais,
Andrea e Fernando, por serem meus
maiores exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo incentivo e suporte necessários para tornar essa, e muitas outras conquistas possíveis. Também agradeço ao meu irmão pela amizade e carinho constante.

Agradeço aos docentes que participaram da minha formação, especialmente ao meu orientador Dr. Marcelo, pela oportunidade, apoio e dedicação durante minha iniciação científica.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio, companheirismo e por compartilharem essa trajetória comigo. Em especial aos meus amigos Ana, Barbara e Julio.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Citogenética de Peixes (LCP) pelo acolhimento e ensinamentos fundamentais para minha formação acadêmica.

Agradeço ao CNPq (processo 302928/2021-9) e à FAPESP (processo 2020/11772-8) pelo financiamento a esse projeto.

Agradeço também a todos que ajudaram, direta ou indiretamente, na construção desse trabalho.

RESUMO

A evolução dos cromossomos sexuais apresenta várias questões ainda não resolvidas, como por qual motivo as sequências repetitivas, geralmente, espécies específicas, tendem a se acumular em cromossomos sexuais? Para melhor explorar essa questão, o presente trabalho buscou estudar a dinâmica de acúmulo e eliminação de DNAs satélites (SatDNAs) ao longo do processo de diferenciação do cromossomo W, utilizando o gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes), como modelo. Esse gênero se destaca por apresentar um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW conservado em todas as espécies examinadas. Enquanto o cromossomo Z é conservado em todas as espécies, o cromossomo W é menor, e apresenta diferenças em seu tamanho e morfologia. Presumivelmente ancestral, o cromossomo W é comparável ao de *Triportheus auritus*, contendo o acúmulo de 19 famílias de SatDNAs (TauSatDNAs). No presente trabalho, os resultados encontrados a partir da análise em outras cinco espécies de *Triportheus* mostraram que a maioria destas repetições foi eliminada durante o processo de diferenciação dos cromossomos W, enquanto os cromossomos Z de algumas espécies começaram a acumular alguns TauSatDNAs. Sequências de SatDNAs espécies-específicas, que compõem a região heterocromática de cada um desses cromossomos, foram provavelmente amplificadas após esse período. Portanto, os cromossomos W das várias espécies de *Triportheus* passaram por mudanças evolutivas significativas em um curto período (15-25 milhões de anos) após sua divergência.

Palavras-chave: Citogenômica, Cromossomos sexuais, DNA repetitivo.

ABSTRACT

The evolution of sex chromosomes raises several issues that have yet to be resolved, like why are repeated sequences often species-specific on sex chromosomes prone to accumulating? To better explore this, this work aims to trace the dynamics of satellite DNAs (satDNAs) accumulation and elimination along the pathway of W chromosome differentiation using the well-known *Triportheus* fish model. This fish genus stands out due to a conserved ZZ/ZW sex chromosome system present in all examined species. While the Z chromosome is conserved in all species, the W chromosome is smaller and exhibits differences in size and morphology. The presumed ancestral W chromosome is comparable to that of *Triportheus auritus* and contains 19 different SatDNA families accumulating on it. The results found in the analysis of five additional *Triportheus* species showed that most of these repetitions were probably eliminated as speciation was taking place and the W chromosomes continued their path of differentiation, while the Z chromosomes of some species began to accumulate some TauSatDNAs. Additional species-specific SatDNAs that made up the heterochromatic region of each of these chromosomes were most likely amplified after that. Therefore, the W chromosomes of the various *Triportheus* species have undergone significant evolutionary changes in a short period of time (15–25 Myr) after their divergence.

Keywords: Cytogenomics, Sex chromosomes, repetitive DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1: Filogenia dos vertebrados mostrando a distribuição dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos em diferentes grupos de vertebrados. (Modificada de STÖCK et al., 2021).....15

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2: Relações filogenéticas entre os *Triportheidae* analisados, baseada em MARIGUELA et al. (2016) e MELO et al. (2021). (Modificada de KRETSCHMER et al., 2022).....23

CAPÍTULO 1

Figure 1: Female metaphase plates of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR) highlighting the chromosomal location of TauSat07, TauSat08, TauSat17, and TauSat22.....36

Figure 2: Female metaphase plates of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. aff. rotundatus* (TRO) and *T. trifurcatus* (TTR) highlighting the chromosomal location of TauSat29 in red.....37

Figure 3: Detailed comparison of different TauSatDNAs that hybridized on the Z and/or W chromosomes of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. aff. rotundatus* (TRO) and *T. trifurcatus* (TTR).....37

Figure 4: Phylogenetic relationships among the analyzed *Triportheus* species with the representative ideograms highlighting the distribution of the TauSatDNAs on the Z and W chromosomes of *Triportheus* (based on MARIGUELA et al., 2016; MELO et al., 2021 e KRETSCHMER et al., 2022).....39

Supplementary figure 1: Male metaphase plates of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR) highlighting the chromosomal location of TauSat07, TauSat08, TauSat17, TauSat22. and

TauSat29.....44

Supplementary figure 2: Positive results for the PCR products checked in a 2% agarose gel for all the 16 TauSatDNAs amplified in the microdissected Z chromosomes.....45

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1: Espécies de *Triportheus* analisadas, indicando as bacias hidrográficas onde foram coletadas, o número e o sexo dos indivíduos amostrados (N).....24

Tabela 2: Principais características dos 53 DNAs satélites encontrados em *T. auritus* (Modificado de KRETSCHMER et al., 2022).....25

CAPÍTULO 1

Table 1: *Triportheus* species investigated, with the respective hydrographic basins where they were collected, and the number of individuals sampled.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

CGH – Hibridização Genômica Comparativa;
DNAr – DNA Ribossômico;
FISH – Hibridização Fluorescente in situ;
GDS – Determinação Genética do Sexo;
Ma – Milhões de anos;
NGS – Sequenciamento de Nova Geração;
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase;
SatDNAs – DNAs Satélites;
TAU – *T. auritus*;
TauSatDNA – DNA Satélite de *Triportheus auritus*;
TEs – Elementos Transponíveis;
TGU – *T. guentheri*;
TNE – *T. nematurus*;
TPA – *T. pantanensis*;
TRO – *T. aff. rotundatus*;
TTR – *T. trifurcatus*;
WCP – Pintura Cromossômica Total.

LISTA DE SIGLAS

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade;

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade;

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Sobre os cromossomos sexuais.....	13
1.2 Diversidade dos cromossomos sexuais em vertebrados.....	15
1.3 Sistema ZZ/ZW em peixes – O gênero <i>Tripurtheus</i> como modelo.....	16
1.4 DNA satélite e Satelitoma.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Amostras e preparação cromossômica.....	23
3.2 Caracterização do Satelitoma e Construção de primers.....	24
3.3 Amplificação via PCR.....	26
3.4 Experimentos de FISH.....	27
3.5 Processamento e Análise das imagens.....	27
3.6 PCR usando o DOP-PCR amplificado do cromossomo Z microdissectado.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CAPÍTULO 1.....	30
Following the Pathway of W Chromosome Differentiation in <i>Tripurtheus</i> (Teleostei: Characiformes).....	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sobre os cromossomos sexuais

Os cromossomos sexuais correspondem a elementos altamente dinâmicos do genoma, apresentando-se morfologicamente diferenciados em muitas espécies de vertebrados (CHARLESWORTH, 1991; OHNO, 1967). Dessa forma, constituem excelentes modelos para estudos evolutivos comparativos. Em geral, eles surgem de um par de cromossomos autossômicos que adquire um gene determinante de sexo ligado a sequências de DNA que desempenham papéis de antagonismo sexual (BULL, 1983; BACHTROG, 2006; RICE, 1996). Esse passo é importante para levar à supressão parcial ou completa da recombinação entre os homólogos (WRIGHT et al., 2016). Em uma investigação recente, (KRATOCHVÍL et al., 2021) destacou algumas questões negligenciadas que exigiriam um ajuste fino ou remodelamento parcial desse paradigma canônico, enfatizando a necessidade de uma nova perspectiva da evolução dos cromossomos sexuais.

Os processos que norteiam a diferenciação dos cromossomos sexuais ocorreram de forma independente, mesmo em clados filogeneticamente relacionados, onde, de maneira geral, evidencia-se tanto a presença de sistema sexuais simples (sendo os sistemas XX/XY e ZZ/ZW os mais frequentes), quanto uma variedade de sistemas múltiplos frutos de rearranjos cromossômicos entre os cromossomos sexuais X, Y, Z e W e autossomos (GRAVES, 2006).

O acúmulo de alelos benéficos a um dos sexos, contribui para a resolução do conflito genético sobre a expressão de traços sexo-específicos, bem como a manutenção de proporção sexual equilibrada em uma população (CHARLESWORTH et al., 2005). No entanto, apesar desses componentes apresentaram alta adaptabilidade, as linhagens de vertebrados diferem fortemente em sua estabilidade evolutiva (JEFFRIES et al., 2018; PERRIN, 2009; POKORNÁ e KRATOCHVÍL, 2016). Certas linhagens de vertebrados mostram estabilidade no modo de determinação sexual e homologia de seus cromossomos sexuais por um tempo evolutivo significativo (dezenas de milhões de anos), enquanto outros exibem rápidas transformações. Por

exemplo, pelo menos há cerca de 166 milhões de anos (Ma), os mamíferos compartilham cromossomos sexuais homólogos herdados de um ancestral comum (VEYRUNES et al., 2008), enquanto os cromossomos sexuais de aves já estavam presentes no ancestral comum vivo cerca de 120 Ma (MANK e ELLEGREN, 2007).

Em contrapartida, rápidas mudanças nos cromossomos sexuais foram documentadas dentro de uma única família, gênero e até mesmo espécies de peixes teleósteos (KIKUCHI & HAMAGUCHI, 2013; PAN et al., 2016). Foi sugerido que diferentes taxas de renovação dos cromossomos sexuais poderiam ser causadas pela menor suscetibilidade dos vertebrados homeotérmicos (mamíferos e aves) a reversões sexuais induzidas termicamente devido à sua termorregulação eficaz (GROSSEN et al., 2011; KIKUCHI e HAMAGUCHI, 2013). No entanto, as recentes reconstruções filogenéticas da determinação dos sistemas sexuais em amniotas mostram que, uma vez surgido, a Determinação Genética do Sexo (GSD), particularmente com cromossomos sexuais bem diferenciados, é bastante estável evolutivamente mesmo em organismos ectotérmicos (GAMBLE et al., 2015; POKORNÁ e KRATOCHVÍL, 2016).

Recentemente, uma série de estudos documentou a conservação de longo prazo de cromossomos sexuais com base em evidências moleculares em várias linhagens de répteis, como iguanas (sistema XX/XY), conservadas por aproximadamente 123 Ma (ROVATSOS et al., 2014a; 2014b; 2015), cobras caenofidianas (ZZ/ZW, 80 Ma) (ROVATSOs et al., 2015), lagartos lacertideos (ZZ/ZW, 70 Ma) (ROVATSOS et al., 2016a; 2016b), lagartos monitores e outros lagartos anguimorfos (ZZ/ZW, 150 Ma) (PICARD et al., 2018) e tartarugas softshell (ZZ/ZW, 120 Ma) (ROVATSOS et al., 2017). Como resultado, as diferenças na conservação dos cromossomos sexuais em espécies de vertebrados não refletem a distinção entre endotérmicos e ectotérmicos, como sugerido pela reconstrução da idade de origem dos cromossomos sexuais diferenciados e sua extensão taxonômica entre os répteis (POKORNA et al., 2014; ROVASTOS et al., 2015).

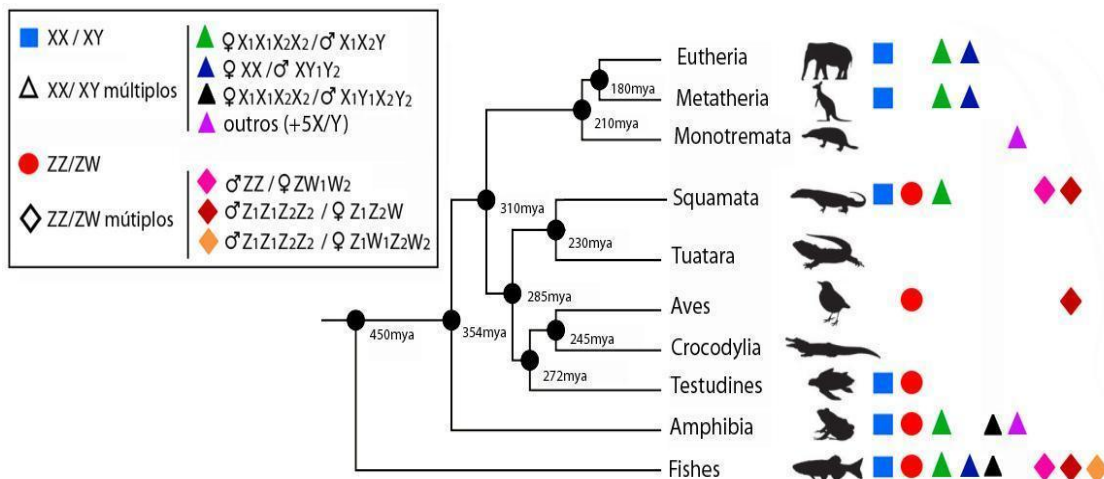
Mas por que as linhagens de vertebrados diferem na estabilidade da determinação do sexo? ROVATOS e colaboradores (2016b) sugerem que, possivelmente, a diferença na conservação dos cromossomos sexuais esteja

entre amniotas e anamniotas, ou entre as diferenças na história de vida de linhagens específicas. Infelizmente, a atual compreensão da evolução dos cromossomos sexuais em vertebrados ainda é incompleta e estudos comparativos são necessários para preencher essas lacunas no conhecimento.

1.2 Diversidade dos cromossomos sexuais em vertebrados

A **Figura 1** apresenta a distribuição dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos encontrados em vertebrados, com base em recentes revisões disponíveis (POKORNÁ, et al. 2014; SEMBER et al., 2021; TREE OF SEX CONSORTIUM, 2014). Alguns grupos, como os mamíferos da subclasse Theriae e os pássaros, apresentam sistemas $\text{♀XX}/\text{♂XY}$ e $\text{♂ZZ}/\text{♀ZW}$ bastante estáveis, encontrados na maioria das espécies e com origem comum em seus respectivos grupos (WATERS e GRAVES, 2009). Praticamente todos os clados apresentam sistemas $\text{♀XX}/\text{♂XY}$ ou $\text{♂ZZ}/\text{♀ZW}$, os quais variam entre pares de espécies intimamente relacionadas. A ordem Rhynchocephalia, répteis numerosos durante a Era Mesozóica, mas que hoje inclui apenas um único gênero vivo -*Sphenodon* - conhecido popularmente como Tuatara, e Crocodylia, são os únicos clados que não apresentam sistemas de cromossomos sexuais diferenciados (POKORNÁ e KRATOCHVÍL, 2009).

Figura 1. Filogenia dos vertebrados mostrando a distribuição dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos em diferentes grupos de vertebrados. Modificada de STÖCK et al., (2021).



1.3 Sistema ZZ/ZW em peixes – O gênero *Triportheus* como modelo

Os peixes representam um grupo bastante diversificado, incluindo cerca de 36.450 espécies válidas (FRICKE et al., 2023). Dessa forma, oferecem interessantes modelos para estudos genéticos, taxonômicos e evolutivos. Esse grupo também apresenta uma grande variabilidade cromossômica, incluindo a presença de polimorfismos, poliploidia, cromossomos supranumerários e diferentes sistemas de cromossomos sexuais (OLIVEIRA et al., 2009). É importante ressaltar que, a determinação sexual nesses animais é bastante variável e pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo ambientais, comportamentais e genéticos (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

Ambas a heterogametia masculina (XY) e feminina (ZW), apesar de não serem comuns na maioria dos peixes, podem ocorrer em algumas espécies (CIOFFI et al., 2012a; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). Aproximadamente 6% das espécies de peixes Neotropicais estudadas até agora apresentam cromossomos sexuais distintos (SEMBER et al., 2021). Dentre estes, destacam-se os gêneros *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae) e *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae), sendo as duas únicas famílias de peixes em que todas as espécies possuem um sistema cromossômico ZZ/ZW.

Segundo MALABARBA (2004), o gênero *Triportheus* é um grupo monofilético, abrangendo 16 espécies válidas. Os peixes representantes desse gênero são popularmente chamados de sardinhas de água doce, e são caracterizados pela presença de nadadeiras peitorais grandes, corpos alongados e comprimidos lateralmente, e peito expandido formando quilhas (NAKAGAWA, 2012). As diferentes espécies de *Triportheus* distribuem-se por toda América do Sul, sendo encontrados desde a Colômbia, até o Uruguai (MALABARBA, 2004).

Nesse gênero, o cromossomo Z é metacêntrico e o maior do cariótipo, enquanto o W é sempre o menor, em comparação ao Z, e apresenta variações interespecíficas no que concerne seu tamanho e morfologia (ARTONI et al., 2001; ARTONI e BERTOLLO, 2002; BERTOLLO e CAVALLARO, 1992; DINIZ

et al., 2008; SÁNCHEZ e JORGE, 1999; YANO et al., 2014). Além disso, o cromossomo W é rico em heterocromatina C-positiva e, é caracterizado por carregar um sítio de DNAr 18S nos braços longos (ARTONI e BERTOLLO, 2002; DINIZ et al., 2009; NIRCHIO et al., 2007). A relação entre a diferenciação do cromossomo W e o acúmulo de sequências repetitivas foi investigada entre diversas espécies de *Triportheus*, por YANO et al., (2016), utilizando o mapeamento citogenético de diferentes classes de microssatélites. Foi constatado o acúmulo preferencial de várias sequências repetitivas no cromossomo W, reforçando estudos prévios com outras espécies deste mesmo gênero, como *T. auritus* (CIOFFI et al., 2012b) e *T. trifurcatus* (YANO et al., 2014).

O acúmulo desigual de microssatélites no cromossomo W evidenciou que o mesmo foi submetido a processos evolutivos específicos entre as diferentes espécies, refletindo a plasticidade da evolução dos cromossomos sexuais, mesmo entre espécies relacionadas que compartilham o mesmo sistema de cromossomos sexuais (YANO et al., 2016). Assim, a distribuição de microssatélites nos cromossomos sexuais das espécies de *Triportheus* não segue uma relação direta de ancestralidade e grau de acúmulo ocorrido, evidenciando emergências evolutivas aparentemente aleatórias entre as espécies (YANO et al., 2016).

O cenário observado em *Triportheus* propiciou uma abordagem comparativa mais aprofundada sobre a dinâmica evolutiva dos cromossomos sexuais entre as espécies. Informações adicionais sobre o processo de diferenciação do par sexual puderam ser evidenciadas a partir dos experimentos de hibridização genômica comparativa (CGH) e pintura cromossômica total (WCP), possibilitando demonstrar a localização de sequências que ainda são compartilhadas pelo par sexual, bem como de sequências que são exclusivas de cada um dos cromossomos sexuais (YANO et al., 2016). Assim, a região Wq terminal apresenta uma grande concentração de sequências específicas de fêmeas, exatamente onde está localizado o cluster de DNA ribossômico (DNAr) 18S, presente em todas as espécies analisadas de *Triportheus* (ARTONI e BERTOLLO, 2002; DINIZ et al., 2009; MARQUIONI et al., 2013; NIRCHIO et al., 2007; YANO et al., 2016). A presença de DNAr 18S na região telomérica do cromossomo Z já foi constatado em algumas poucas espécies

de *Triportheus* (MARQUIONI et al., 2013; NIRCHIO et al., 2007), reforçando a proposta de que essas sequências estavam originalmente presentes em ambos os homólogos do proto par sexual, sendo subsequentemente perdidas no cromossomo Z, mas retidas no cromossomo W. A melhor explicação para tais eventos é que a manutenção e a ampliação desses sítios no cromossomo sexo-específico provavelmente possibilitaram a redução de recombinação entre o par sexual, assim como a heterocromatinização do cromossomo W.

Enquanto o cromossomo Z de *Triportheus* é notavelmente conservado (em sua morfologia) entre as espécies, o cromossomo W apresenta-se diferenciado principalmente devido a aquisição de sequências W específicas durante o processo evolutivo. A associação dos dados citogenéticos e filogenéticos forneceram evidências de que o cromossomo W em *Triportheus* evoluiu durante um tempo relativamente curto (aproximadamente 15-25 Ma), exibindo diferenças na composição genômica, tamanho e morfologia entre as espécies (YANO et al., 2016; 2021). Adicionalmente, os acúmulos diferenciais de microssatélites, elementos transponíveis (TEs) e DNAr também verificados nesse cromossomo (YANO et al., 2014), demonstram o dinamismo inerente dos DNAs repetitivos na evolução dos cromossomos sexuais. Além disso, também é notável a rápida diferenciação do cromossomo W em tamanho, forma e conteúdo de sequências, provavelmente favorecida pela redução da recombinação entre o par sexual, tendo em vista a manutenção e amplificação de sequências genômicas específicas neste cromossomo (YANO et al., 2016; 2021).

A família Triportheidae, juntamente com seus grupos irmãos Bryconidae e Gasteropelecidae, constituem um grupo monofilético. Triportheidae inclui quatro gêneros adicionais além de *Triportheus*, incluindo *Lignobrycon*, *Engraulisoma*, *Clupeacharax* e *Agoniates*, sendo *L. myersi* a espécie mais basal do grupo e irmã de todas as demais espécies de Triportheidae (MARIGUELA, et al., 2016). Análises citogenéticas recentes em *L. myersi* demonstraram que esta espécie é portadora de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, similar ao de *Triportheus* (RODRIGUES et al., 2016). Além disso, em algumas espécies de Gasteropelecidae também foi relatada a presença de um sistema sexual ZZ/ZW (TERENCIO et al., 2008; VENERE et al., 2008; YANO et al., 2021). Recentemente, experimentos de Zoo-FISH

indicaram que os cromossomos sexuais ZW de Triportheidae são homeólogos, ou seja, formam um par. Essa extensão da estabilidade dos cromossomos sexuais é quase excepcional em teleósteos e, portanto, essas linhagens oferecem uma oportunidade especial para examinar os processos que moldaram a evolução dos cromossomos sexuais em peixes e vertebrados (YANO et al., 2021).

1.4 DNA satélite e Satelitoma

Os DNAs repetitivos compõem uma grande parte do genoma de eucariotos, e vêm sendo amplamente estudados, focando especialmente no processo de surgimento e diferenciação de cromossomos sexuais (CIOFFI et al. 2011; ITOH et al. 2008; KEJNOVSKÝ et al. 2013). Os DNAs repetitivos podem ser encontrados tanto in tandem (bases nitrogenadas repetidas sequencialmente), quanto dispersos no genoma, apresentando diversos níveis de repetitividade (LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012). As repetições in tandem incluem DNAs ribossomais, histonas e genes codificadores de pequenos RNAs (WALSH e STEPHAN, 2001). Ainda, as sequências chamadas satélites, minissatélites e microssatélites também são repetições in tandem, e podem ser classificadas de acordo com o número de repetições de pares de base que apresentam (JURKA et al. 2003). Os DNAs satélites são compostos de unidades com cerca de 200 pb, enquanto os minissatélites possuem aproximadamente 9 pb (LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012), e os microssatélites variam de 1 a 6 pb (TÓTH et al. 2000).

Embora existam muitos estudos que tratem dos cromossomos sexuais, apenas recentemente, com o advento da tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), os pesquisadores começaram a investigar mais profundamente o DNA repetitivo desses cromossomos e as suas funções no processo de diferenciação cromossômica. Assim, o satelitoma, que compreende todo o conjunto de DNAs satélites (satDNAs) do genoma, oferece uma excelente oportunidade para elucidar a dinâmica desses componentes na formação e manutenção dos cromossomos sexuais heteromórficos (RUIZ-RUANO et al., 2016).

Em análise recente, a partir da integração de dados genômicos e cromossômicos, KRETSCHMER et al., (2022) realizou o isolamento, a caracterização e o mapeamento do satelitoma de *Triportheus auritus* (Cope, 1872), focando especialmente nos satDNAs altamente abundantes e com tendência de acúmulo em fêmeas, ou seja, no cromossomo W. O satelitoma de *T. auritus* compreendeu 53 famílias de satDNA, das quais 24 também foram mapeadas por FISH (Hibridização Fluorescente in situ). A maioria dos satDNAs diferiu significativamente entre os sexos, com 19 das 24 acumulando-se no cromossomo W de *T. auritus*.

Quando mapeados em duas outras espécies de *Triportheus*, *T. signatus* (Garman, 1890) e *T. albus* (Cope, 1872), o número de satDNAs nos cromossomos W diminuiu para seis e quatro, respectivamente, de acordo com o tamanho de seus cromossomos W. (KRETSCHMER et al., 2022). Assim, fica evidente o grande dinamismo ocorrido no processo de diferenciação do cromossomo sexo-específico (W). Além de destacar o envolvimento da heterocromatina na diferenciação do par sexual, destaca-se que DNAs repetitivos desempenham um papel diferencial no processo de heterocromatinização. A acumulação diferencial de repetições no cromossomo W de espécies próximas reflete o dinamismo inerente dos DNAs satélites, bem como a plasticidade que molda a evolução dos cromossomos sexuais.

Portanto, a fim de investigar a dinâmica dos satDNAs durante a diferenciação dos cromossomos sexuais em um contexto mais amplo, neste trabalho, foram mapeadas as 19 famílias de TauSatDNAs acumuladas no cromossomo W de *T. auritus* (KRETSCHMER et al., 2022) em outras cinco espécies congênicas: *T. guentheri* (Garman, 1890), *T. nematurus* (Kner, 1858), *T. pantanensis* (Malabarba, 2004), *T. aff. rotundatus* (Jardine in Schomburgk, 1841) e *T. trifurcatus* (Castelnaud, 1855). Dessa forma, foi possível abranger praticamente todas as espécies de *Triportheus* com dados cromossômicos disponíveis até o momento, com exceção de *T. venezuelensis* (MALABARBA, 2004).

A partir das análises evidenciou-se tanto a amplificação, quanto a eliminação de sequências repetitivas ao longo do processo de diferenciação do cromossomo W, destacando o dinamismo do cromossomo sexo-específico.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho buscou analisar a dinâmica de acúmulo ou eliminação de famílias de DNAs satélites no cromossomo W presente em diferentes espécies do gênero *Triportheus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras e preparação cromossômica

Além da espécie *T. auritus*, cinco outras espécies representativas de Triportheidae foram analisadas: *T. guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. aff. rotundatus* (TRO) e *T. trifurcatus* (TTR) (**Figura 2**). As amostras foram obtidas conforme especificado na **Tabela 1**, de modo que, tanto o material de macho, quanto o de fêmea, foram analisados em todas as espécies, com exceção do TPA, na qual apenas cromossomos de fêmeas encontravam-se disponíveis. É importante ressaltar que as coletas contaram com autorização do órgão ambiental brasileiro ICMBio/SISBIO (Licença nº 48290-1) e SISGEN (A96FF09).

Figura 2. Relações filogenéticas entre os Triportheidae analisados. Espécies baseadas em MARIGUELA et al. (2016) e MELO et al. (2022). A caixa à esquerda indica diagramas esquemáticos destacando os cromossomos Z morfologicamente conservados em quase todas as espécies e as extensas variações de tamanho e morfologia dos cromossomos W. As espécies selecionadas usadas neste estudo estão indicadas em vermelho. Modificada de KRETSCHMERER al. (2021).

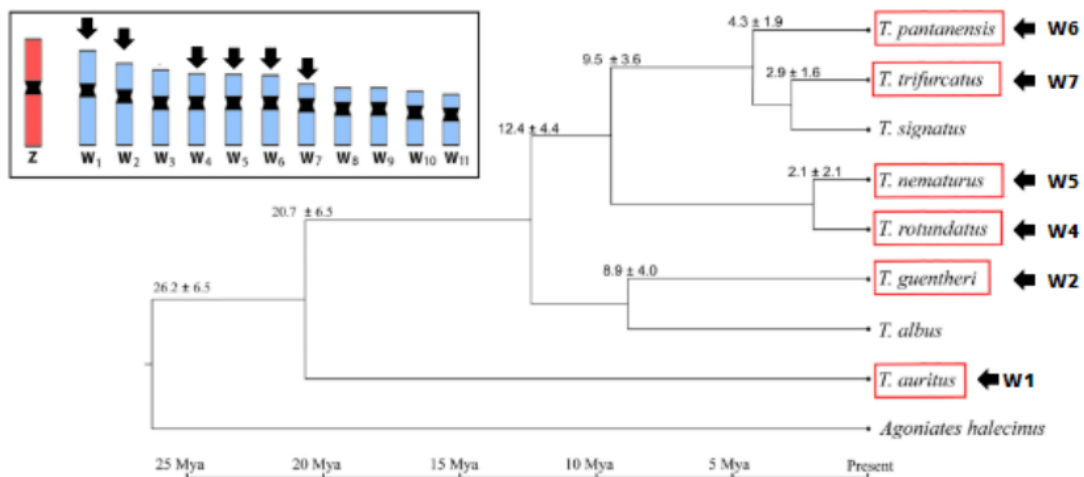


Tabela 1. Espécies de *Triportheus* analisadas, indicando as bacias hidrográficas onde foram coletadas, o número e o sexo dos indivíduos amostrados (N).

Espécies	Bacia hidrográfica	N
<i>Triportheus guentheri</i>	São Francisco, MG	(12 ♀ ; 06 ♂)
<i>Triportheus nematurus</i>	Paraguai, MT	(09 ♀ ; 07 ♂)
<i>Triportheus pantanensis</i>	Paraguai, MT	(05♀ ; -- ♂)
<i>Triportheus aff. rotundatus</i>	Paraguai, MT	(19 ♀ ; 21 ♂)
<i>Triportheus trifurcatus</i>	Araguaia-Tocantins, MT	(04 ♀ ; 11 ♂)

MG = Minas Gerais e MT = Mato Grosso (Estados brasileiros).

As preparações cromossômicas foram previamente realizadas por YANO et al., (2016), seguindo o protocolo de BERTOLLO et al. (2015). Assim, primeiramente os animais foram colocados em uma solução de colchicina a 0,005% (1 ml por 100g de peso do animal) por 30 min. Segundamente, as amostras foram retiradas do rim anterior, lavadas e colocadas em solução hipotônica de KCl 0,075M, possibilitando sua fragmentação (com o auxílio de uma seringa) e formação de uma suspensão celular homogênea. Então, essa suspensão foi incubada a 37°C por 20 minutos e posteriormente transferida para um tubo de centrifuga, com adição de fixador (metanol + ácido acético em proporção 3:1). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o processo de fixação foi repetido por mais duas vezes. Por fim, adicionou-se fixador ao sedimento celular e o produto foi armazenado em tubos Eppendorf (1,5 ml) colocados em refrigeração.

3.2 Caracterização do Satelitoma e Construção de primers

O isolamento do genoma e a caracterização do satelitoma de *T. auritus* foi feita por KRETSCHMER et al. (2022), utilizando respectivamente a plataforma de sequenciamento Illumina HiSeq4000 e o software RepeatExplorer. Assim, no satelitoma, foram obtidas 53 famílias de satDNA, denominadas TauSatDNA. Dessas 53 sequências, foram selecionadas para construção de primers e posterior experimentos de FISH, as 19 que se

mostraram acumuladas no cromossomo W de TAU (**Tabela 2**). A seleção dos DNAs satélites dependeu também da viabilidade de construção de primers para os mesmos.

Tabela 2. Principais características dos 53 DNAs satélites encontrados em *T. auritus*. A abundância é dada como a proporção do DNA satélite nas bibliotecas analisadas. Em cinza estão indicados os 19 satDNAs escolhidos para produção de primers e realização dos experimentos de FISH. Modificado de KRETSCHEMER et al. (2021).

Família de DNA Satélite	RUL	Abundância (M)	Abundância(F)	Abundância (F/M)	Divergência (M)	Divergência (F)	A+T (%)
TauSat01	119	3.49E-02	0.034673938	0.993516003	3.83	3.8	61.3
TauSat02	918	3.52E-03	0.003487261	0.988822351	19.03	17.31	59.8
TauSat03	99	2.31E-05	0.002511917	1.087.802.526	19.89	9.22	62.6
TauSat04	2229	1.6E-03	0.001528202	0.943431046	3.8	4.15	61
TauSat05	75	1.10E-03	0.001328926	1.201.698.628	3.2	3.16	62.7
TauSat06	42	1.33E-03	0.001230775	0.923847119	15.66	15.65	57.1
TauSat07	98	6.22E-05	0.001045719	1.681.247.823	10.41	4.35	59.2
TauSat08	64	1.2E-04	0.000863679	6.910.153.323	2.91	4.06	60.9
TauSat09	56	1.5E-04	0.000741806	4.924.800.832	17.63	9.51	60.7
TauSat10	21	1.2E-04	0.000683809	1.101.037.636	12.48	11.39	52.4
TauSat11	72	2.4E-04	0.000647282	262.617.237	6.82	6.9	55.6
TauSat12	66	4.19E-04	0.000509975	1.215.353.598	4.14	7.2	65.2
TauSat13	27	1.25E-06	0.000457581	3.662.598.719	24.81	8.04	63
TauSat14	41	2.35E-05	0.000420139	1.786.153.388	18.69	8.07	65.9
TauSat15	39	4.48 E-04	0.000392021	0.87456525	3.47	3.68	48.7
TauSat16	29	4.17 E-04	0.000380985	0.912483484	15.22	14.92	44.8
TauSat17	110	6.80E-07	0.000377568	5.555.188.818	3.32	1.8	62.7
TauSat18	63	1.10E-05	0.00037273	3.374.445.484	17.47	3.69	69.8
TauSat19	76	0.000348439	0.000356821	1.024.056.817	4.7	4.69	64.5
TauSat20	73	0.000338306	0.000356391	1.053.458.506	9.15	9.12	68.5
TauSat21	22	0.000203	0.000322718	1.589.742.874	5.91	5.81	72.7
TauSat22	44	1.96E-06	0.00031952	162.688.391	7.85	1.69	61.4
TauSat23	20	5.81E-06	0.000298757	5.140.642.386	16.83	7.52	50
TauSat24	38	8.78E-06	0.00027646	3.148.269.056	7.41	3.5	42.1
TauSat25	120	0.000196898	0.000275633	1.399.877.771	16.91	15.75	62.5
TauSat26	82	0.000292126	0.000261762	0.896056387	7.85	8.34	56.1
TauSat27	44	4.27E-07	0.000257076	6.025.226.562	30.5	4.8	47.7
TauSat28	34	8.37E-06	0.000255067	3.047.156.738	20.26	8.93	50
TauSat29	62	3.29E-05	0.000253182	7.694.186.412	13.86	10.01	67.7
TauSat30	30	1.96E-05	0.000250842	1.279.499.779	16.97	10.41	60

TauSat31	29	9.71E-05	0.000244391	2.516.995.149	6.27	4.98	55.2
TauSat32	122	5.94E-06	0.000240801	4.055.715.248	23.73	8.46	56.6
TauSat33	67	2.97E-06	0.000225381	7.582.628.687	4.63	2.88	56.7
TauSat34	244	0.000219941	0.000225363	1.024.652.028	15.79	14.99	66.4
TauSat35	103	6.41E-06	0.000224043	3.496.119.636	2.74	1.4	55.3
TauSat36	81	0.000254303	0.000212866	0.837056582	5.64	6.69	55.6
TauSat37	32	5.60E-06	0.000209345	3.739.645.111	11.66	5.17	56.2
TauSat38	88	3.46E-05	0.000190433	5.501.521.513	11.38	3.68	50
TauSat39	50	2.02E-05	0.000184819	9.149.304.467	23.39	6.79	56
TauSat40	41	0.000182553	0.000161101	0.882488921	9.26	8.89	48.8
TauSat41	61	0.000126406	0.000159611	1.262.685.316	4.5	3.84	47.5
TauSat42	213	0.000195317	0.000158055	0.809226043	3.51	3.37	65.3
TauSat43	32	0.00015456	0.000153142	0.990827726	5.76	5.95	56.2
TauSat44	18	0.00012626	0.000150149	1.189.204.316	10.82	10.75	66.7
TauSat45	42	0.000162341	0.000148087	0.912201092	5.36	5.37	54.8
TauSat46	67	0.000117321	0.000128215	1.092.862.298	10.87	10.2	50.7
TauSat47	29	6.74E-05	0.000126335	1.875.162.652	6.55	5.92	55.2
TauSat48	104	6.22E-05	0.000124479	2.001.951.366	8.81	8.23	67.3
TauSat49	68	5.87E-05	0.000115383	1.964.584.693	2.48	2.18	64.7
TauSat50	37	0.000107585	8.57E-05	0.796412139	3.99	4.73	54.1
TauSat51	16	5.47E-05	8.46E-05	1.547.003.443	6.94	6.8	62.5
TauSat52	32	0.000131801	6.82E-05	0.517757832	6.45	7.59	59.4
TauSat53	37	8.47E-05	5.53E-05	0.652616256	4.63	4.5	59.5

3.3 Amplificação via PCR

Após o isolamento da biblioteca de DNA satélites, e a construção dos primers, as 19 sequências foram amplificadas através de reações de PCR, com temperaturas de anelamento e concentrações de DNA template ótimas para cada satDNA de acordo com KRETSCHMER et al., (2021). Assim, para cada sequência, foi realizado o seguinte ciclo: **1.** Desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, **2.** 30 ciclos com uma etapa de desnaturação de 95°C – 20s; uma etapa de anelamento que variou de 52°C a 60°C - 40s, dependendo do sat

DNA; e uma etapa de extensão de 72°C por 30s, **3.** extensão final de 72°C por 10 min.

Para a confirmação da amplificação e verificação da integridade dos satDNAs, os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2%, e posteriormente quantificados pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (ThermoFisher Scientific).

3.4 Experimentos de FISH

Por meio da técnica de *Nick-translation* foram feitas as marcações das amplificações selecionadas, utilizando o Kit da Jena Bioscience (Jena, Alemanha), no qual o fluoróforo Atto488-dUTP (fluorescência verde) e Atto550-dUTP (fluorescência vermelha) foram incorporados nas sequências de satDNAs conforme as instruções do manual do fabricante. Em seguida, os experimentos de hibridização fluorescente *in situ*, foram esquematizados utilizando as sondas previamente marcadas, nos cromossomos de machos e fêmeas das cinco espécies alvo do trabalho, seguindo o protocolo de (YANO et al., 2017).

Para a correta identificação do cromossomo W, concomitantemente, nos experimentos de hibridização dos SatDNAs, também foram utilizadas sondas de DNAr 18S, uma vez que estes cromossomos apresentam um grande cluster destas sequências ocupando toda região heterocromática de seus braços longos.

3.5 Processamento e Análise das imagens

Ao todo foram analisadas no mínimo 30 metáfases por indivíduos para a confirmação do número diplóide ($2n = 52$), estrutura cariotípica e dos resultados da hibridização fluorescente *in situ* (FISH). As imagens obtidas foram capturadas utilizando-se o microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão) associado ao sistema de captura CoolSNAP. Posteriormente as imagens foram processadas pelo software ISIS (MetaSystems GmbH, Jena, Germany).

3.6 PCR usando o DOP-PCR amplificado do cromossomo Z microdissectado

Para checar, nos cromossomos Z, a presença de monômeros repetidos em tandem de TauSatDNA, que foram mapeados exclusivamente no cromossomo W do *T. auritus*, foram feitas reações de PCR com todos os 19 TauSatDNA primers, usando como molde o DOP-PCR amplificado do cromossomo Z microdissectado, previamente obtido por YANO et al. (2016). As condições de amplificação para cada satDNA foram retiradas de KRETSCHMER et al (2022) (Tabela suplementar 1). O resultado da PCR foi analisado em gel de agarose 2%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão deste trabalho encontram-se compilados no a forma de um capítulo que corresponde ao artigo denominado “Following the Pathway of W Chromosome Differentiation in *Triportheus* (Teleostei: Characiformes)”, o qual foi publicado em agosto de 2023 no periódico Biology (doi: [12081114](https://doi.org/10.1093/bioadv/abac114)).

CAPÍTULO 1

Following the Pathway of W Chromosome Differentiation in *Triportheus* (Teleostei: Characiformes)

Mariannah Pravatti Barcellos de Oliveira, Rafael Kretschmer, Geize Aparecida Deon, Gustavo Akira Toma, Tariq Ezaz, Caio Augusto Gomes Goes, Fábio Porto-Foresti, Thomas Liehr, Ricardo Utsunomia, Marcelo de Bello Cioffi

ABSTRACT

In this work, we trace the dynamics of satellite DNAs (SatDNAs) accumulation and elimination along the pathway of W chromosome differentiation using the well-known *Triportheus* fish model. *Triportheus* stands out due to a conserved ZZ/ZW sex chromosome system present in all examined species. While the Z chromosome is conserved in all species, the W chromosome is invariably smaller and exhibits differences in size and morphology. The presumed ancestral W chromosome is comparable to that of *T. auritus*, and contains 19 different SatDNA families. Here, by examining five additional *Triportheus* species, we showed that the majority of these repetitive sequences were eliminated as speciation was taking place. The W chromosomes continued degeneration, while the Z chromosomes of some species began to accumulate some TauSatDNAs. Additional species-specific SatDNAs that made up the heterochromatic region of both Z and W chromosomes were most likely amplified in each species. Therefore, the W chromosomes of the various *Triportheus* species have undergone significant evolutionary changes in a short period of time (15–25 Myr) after their divergence.

Keywords: Cytogenomics; Sex chromosomes; Satellite DNA; FISH.

INTRODUCTION

Sex chromosomes represent important and dynamic components of the genome (BACHTROG, 2006; BULL, 1983; CHARLESWORTH, 1991; OHNO, 1967). They are characterized by specific morphology, genomic content, and evolutionary mechanisms (CHARLESWORTH, 1991). In general, they arise from an autosomal pair that acquires a putative sex-determining gene linked to DNA sequences that play sexual antagonistic roles (BACHTROG, 2006; BULL, 1983; RICE, 1996). This step is important to lead to partial or complete recombination suppression between the homologs (WRIGHT et al., 2016). In a recent investigation, (KRATOCHVÍL et al, 2021) highlighted some neglected questions that would require a fine-tuning or partial remodeling of this canonical paradigm, emphasizing the need for a new perspective of sex chromosome evolution. Among vertebrates, although mammals and birds contain, respectively, stable XX/XY and ZZ/ZW sex chromosome systems in most species, in the majority of reptiles, frogs, and fishes, no distinct sex chromosomes can be found (GRAVES e SHETTY, 2001). In fishes, although only 6% of fish species studied so far exhibit heteromorphic sex chromosomes, its species show both female (ZZ/ZW) or male (XX/XY) heterogamety and almost all their multiple derived forms (SEMBER et al., 2021). A ZZ/ZW sex chromosomal system is present in roughly 115 species, with the Triportheidae family standing out among all reported cases (SEMBER et al., 2021). Triportheidae is a monophyletic fish family composed of five genera: *Lignobrycon*, *Engraulisoma*, *Clupeacharax*, *Agoniates*, and *Triportheus* (MARIGUELA, 2016). According to YANO et al. (2021), the ZW sex chromosome system, shared by all Triportheidae species and some Gasteropelecidae members, had a common origin and most likely evolved from the last common ancestor of these two lineages. Therefore, the ZW sex chromosome system should be at least 40 My old. The genus *Triportheus* (the focus of this work) is the most specious in the family, currently comprising 21 species (FRICKE et al., 2023), standing out by their conserved ZZ/ZW sex chromosome system present in all analyzed species (ARTONI et al., 2001; DE ALMEIDA TOLEDO, 2001; YANO et al., 2021). Their Z chromosome is metacentric and is the largest in the karyotype, but the W chromosome is

usually smaller and varies in size and form (ARTONI et al., 2001; ARTONI e BERTOLLO, 2002; BERTOLLO e CAVALLARO, 1992; SÁNCHEZ e JORGE, 1999; SCHARTL et al., 2016; YANO et al., 2014). Additionally, the W chromosome of all species is rich in heterochromatin and carries an 18S rDNA site specifically on the long arms (ARTONI e BERTOLLO, 2002; DINIZ et al., 2009; NIRCHIO et al., 2007; YANO et al. 2016). Previous studies analyzed the relationship between W chromosome differentiation and the accumulation of repetitive DNA sequences by mapping different microsatellite motifs in various species. The results showed a preferential (but divergent among species) accumulation of repetitive sequences on the W chromosome (CIOFFI et al., 2012b; YANO et al., 2014; 2016).

With the development of Next-Generation Sequencing (NGS) technology, researchers have only recently started to delve deeply into the repetitive DNA found in these chromosomes and their impact on the mechanisms that lead to sex chromosome differentiation (CREPALDI et al., 2021; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017). The satellitome, which is made up of the whole collection of satellite DNAs (SatDNAs) in a genome, offers an excellent opportunity to elucidate the dynamics of such components in the formation and upkeep of heteromorphic sex chromosomes (LOWER et al., 2018; RUIZ-RUANO et al., 2016). Recent data provided a significant source of information for characterizing the satellitome of a variety of organisms, from insects (CABRAL-DE-MELO e MAREC, 2021; DE LIMA, et al. 2021; FERRETTI et al., 2020; MONTIEL et al., 2022; PEREIRA et al., 2021) to fishes (CREPALDI et al., 2021; SILVA et al., 2017; SERRANO-FREITAS et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2021; KRETSCHMER et al., 2022; UTSUNOMIA et al., 2019), frogs (SILVA et al., 2020; 2023), lizards (LISACHOV et al., 2023), birds (PEONA et al., 2023), and mammals (GUTIÉRREZ et al., 2023; SENA et al., 2020; VALERI et al., 2021; VOZDOVA et al., 2021). In general, SatDNAs are typically found in the centromeric, telomeric, and heterochromatic regions (ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ E PLOHL, 2023). In general, the male (Y) or female (W) specific chromosomes highly accumulate SatDNAs, which results in significant disparities in sizes and genetic composition between the sex pair (KRETSCHMER et al., 2022; MONTIEL et al., 2022; TYLER-SMITH e BROWN, 1987; UTSUNOMIA et al., 2019).

In a recent analysis, KRETSCHMER et al. (2022) characterized and mapped the satellitome of *T. auritus*, integrating genomic and chromosomal data with a particular focus on the SatDNAs accumulating on the ZW chromosomes. The *T. auritus*' satellitome had 53 SatDNA families (named TauSatDNAs), 24 of which were also mapped by FISH in three *Triportheus* species (*T. auritus*, *T. albus*, and *T. signatus*) and in the sister group *Agoniates halecinus*. Most TauSatDNAs differed significantly between the sexes, with 19 and 3 of them being accumulated in the *T. auritus*' W and Z chromosomes, respectively. However, there were only six and four SatDNAs found in the W chromosomes of *T. signatus* and *T. albus*, respectively (KRETSCHMER et al., 2022). For all TauSatDNAs hybridized on the chromosomes of *A. halecinus*, no FISH signal was observed. As a result, it is clear that there was a significant dynamic involved in the differentiation of the sex-specific chromosome (W) in relation to this major class of repetitive DNA.

Here, to investigate the dynamics of SatDNAs during the path of ZW sex chromosomes differentiation in a larger phylogenetic context, we mapped the 19 TauSatDNA families accumulated in the W chromosome of *T. auritus* (TAU) in five additional *Triportheus* species, covering almost all species (except *T. venezuelensis*) with available chromosomal data up to date. The results evidenced both the amplification and elimination of SatDNA repeats during the pathway of W chromosome differentiation, without a direct relationship of ancestry.

MATERIALS AND METHODS

Samples and Chromosomal preparations

Five *Triportheus* species, including *T. guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. aff. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR) were examined (**Table 1**). Except for TPA, where only female chromosomal preparations were available, both male and female specimens of all species were examined. The experiments complied with ethical standards set by the Federal University of São Carlos Ethics Committee on Animal Experimentation (Process number CEUA 7994170423). Mitotic chromosomes were acquired using cells from the anterior portion of the kidney, as described in Moreira-Filho

et al. (1991). Briefly, the animals were treated with a colchicine solution for 40–50 min. After this period, the kidney fragments were transferred to a hypotonic solution, dissociated, and incubated at 37 °C for 20 min. The cell suspension was fixed with Carnoy’s solution (3:1 methanol/glacial acetic acid) and dropped onto cleaned microscope slides.

Table 1. *Triportheus* species investigated, with the respective hydrographic basins where they were collected, and the number of males and females sampled.

Species	Location	N
<i>Triportheus guentheri</i>	São Francisco, MG	(12 ♀ ; 06 ♂)
<i>Triportheus nematurus</i>	Paraguai, MT	(09 ♀ ; 07 ♂)
<i>Triportheus pantanensis</i>	Paraguai, MT	(05♀ ; -- ♂)
<i>Triportheus aff. rotundatus</i>	Paraguai, MT	(19 ♀ ; 21 ♂)
<i>Triportheus trifurcatus</i>	Araguaia-Tocantins, MT	(04 ♀ ; 11 ♂)

MG = Minas Gerais and MT = Mato Grosso Brazilian states.

Probe labeling and fluorescence in situ hybridization (FISH)

We selected the 19 TauSatDNAs (GenBank access number OL351494-OL351546) that were accumulated on the W chromosome of TAU previously described by KRETSCHMER et al. (2022). We labeled them using the Nick translation mix kit (Jena Bioscience, Jena, Germany) with Atto550-dUTP (red) or Atto488-dUTP (green) following the manufacturer’s manual. After that, target satellite probes were hybridized in the investigated species following the protocol described by Pinkel et al. (1986). Briefly, the slides containing metaphasic chromosome spreads were initially treated with RNase solution for 1 h at 37 °C and pepsin solution (0.005%) for 10 min at 37 °C. Then, the slides were denatured in 70% formamide solution at 72 °C for 3 min. The probe mixture composed of 50% formamide, 2× SSC, dextran sulfate, and the target labeled probe, was denatured for 10 min and applied onto denatured chromosome slides. Hybridization was performed for at least 16 h in

a moist chamber at 37 °C. After this period, post-hybridization washes consisted of 1× SSC at 65 °C, 4× SSC/Tween solution, and 1× phosphate-buffered saline at room temperature, respectively. The slides were dehydrated in an ethanol series, and after complete drying, the chromosomes were counterstained with DAPI/Antifading (Vector Laboratories, Newar, CA, USA).

Microscopy analysis

In order to corroborate the diploid count and FISH data, we evaluated at least 30 metaphase spreads per species, which were consistent and exhibited the same results in all experiments. The photos were captured using the CoolSNAP system software, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), and the Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan). Chromosomes were classified as acrocentric (a), metacentric (m), and submetacentric (sm), according to their arm ratios (LEVAN et al., 1964).

Polymerase Chain Reaction (PCR) using the DOP-PCR amplified microdissected Z chromosomes

Using the microdissected Z chromosomes previously obtained by YANO et al. (2016) as a template, we conducted PCR reactions with all 19 TauSatDNA primers in order to also verify their presence in the Z chromosomes. The following amplification conditions were used: initial denaturation during 5 min at 95 °C, 30 cycles at 95 °C during 5 min, variable annealing temperature (39.1–54.2 °C) during 40 s, and 72 °C during 30 s, and a final extension step of 10 min. Details of the PCR conditions for the amplification of each SatDNA can be found in KRETSCHMER et al. (2022) (Supplementary Table S1). The resulting PCR products were checked in a 2% agarose gel.

RESULTS

Chromosomal location of TauSatDNAs

Only 5 of the 19 SatDNAs mapped on the W chromosome of TAU (KRETSCHMER et al., 2022) were found to be present in the Z and/or W chromosomes of the herein investigated *Triportheus* species. Among them,

TauSat07 and TauSat08 were clustered in the W chromosomes of all species, with the latter being accumulated the most, taking up the entire Wq in the TGU, TPA, TRO, and TTR (**Figures 1, 2 and 3**). Contrarily, TauSat17 and TauSat29 were restricted to the W chromosomes of TTR, TGU, and TNE, respectively (**Figure 1, 2 and 3**).

Some SatDNAs were shown to be located on the Z chromosome. The Z chromosomes of all the analyzed species exhibited FISH signals for TauSat29, except for TPA and TauSat08. On the other hand, TauSat07 and TauSat22 were only mapped on the Z chromosomes of TGU and TRO, respectively. Except for TauSat07, which mapped the interstitially on Zq, they were all centromeric (**Figures 1, 2 and 3**).

Figure 1. Female metaphase plates of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR) highlighting the chromosomal location of TauSatDNAs. While TauSat07 and TauSat08 showed positive hybridization signals in all species, TauSat17 and TauSat22 were exclusively mapped in TTR and TRO. The SatDNA family names are indicated on the right bottom, in green (Atto488 labeled) or red (Atto550 labeled). The ZW sex chromosomes are indicated. Bar = 5 μ m.

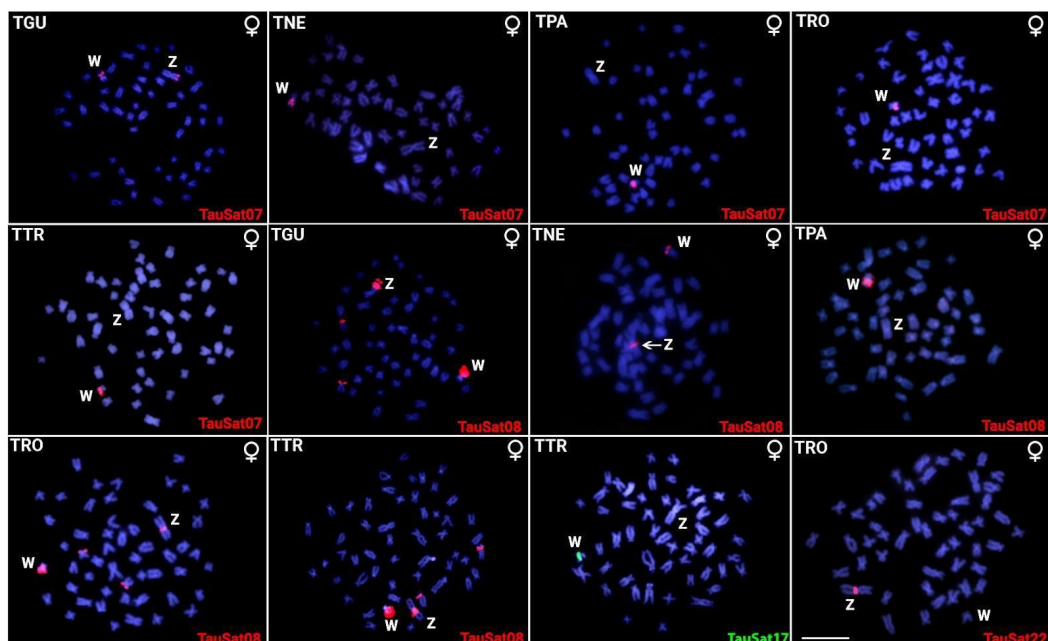


Figure 2. Female metaphase plates of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *T. aff. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR) highlighting the chromosomal location of TauSat29 in red (Atto550 labeled). The ZW sex chromosomes are indicated. Bar = 5 μ m.

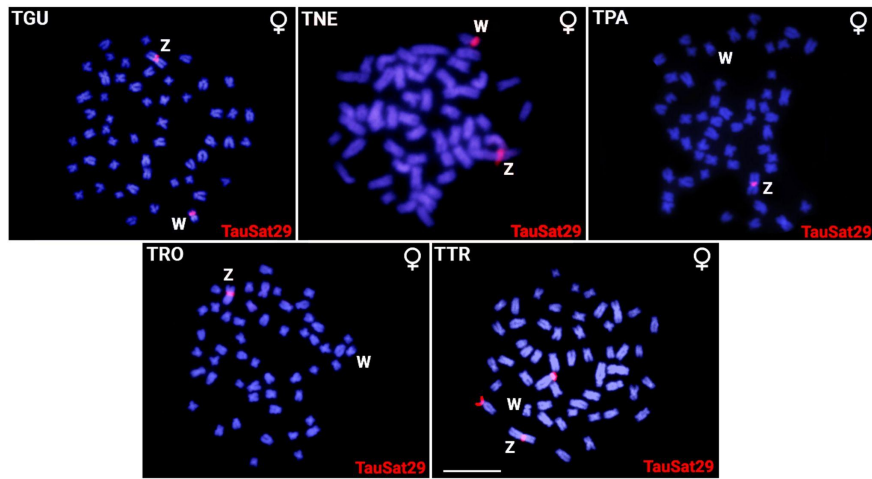
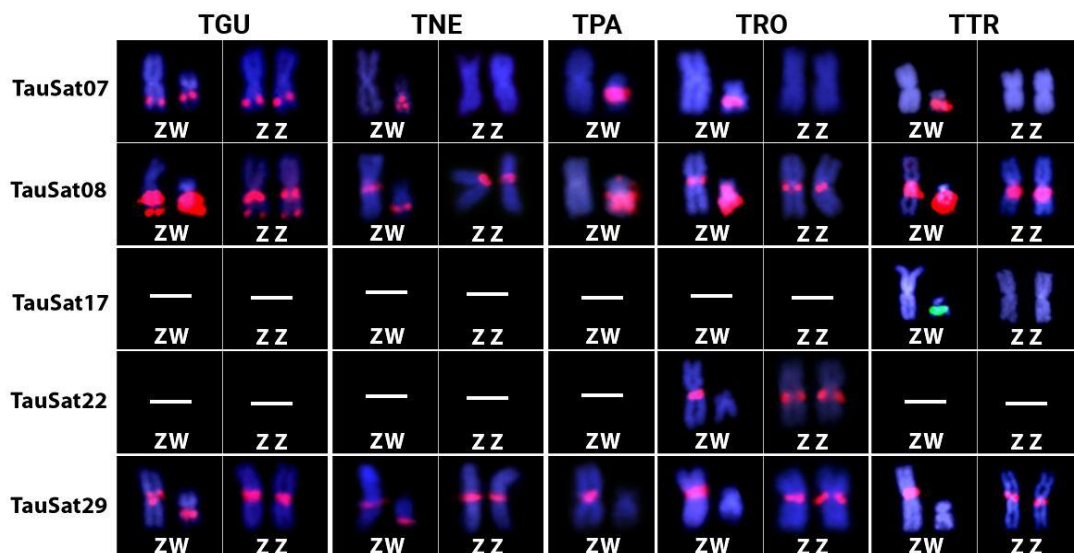


Figure 3. Detailed comparison of different TauSatDNAs that hybridized on the Z and/or W chromosomes of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. pantanensis* (TPA), *Triportheus aff. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR). The ZW chromosomes were extracted from **Figure 1**, **Figure 2** and **Figure S1**.



SatDNA content of TAU Z chromosome

All 19 TauSatDNAs that were exclusively mapped using FISH on the TAU W chromosome were amplified in the microdissected Z chromosomes, demonstrating that this chromosome also contains these SatDNAs, although probably in lower copy numbers, impairing their FISH location. Agarose gel images of PCR amplifications can be found in **Supplementary Figure S2**.

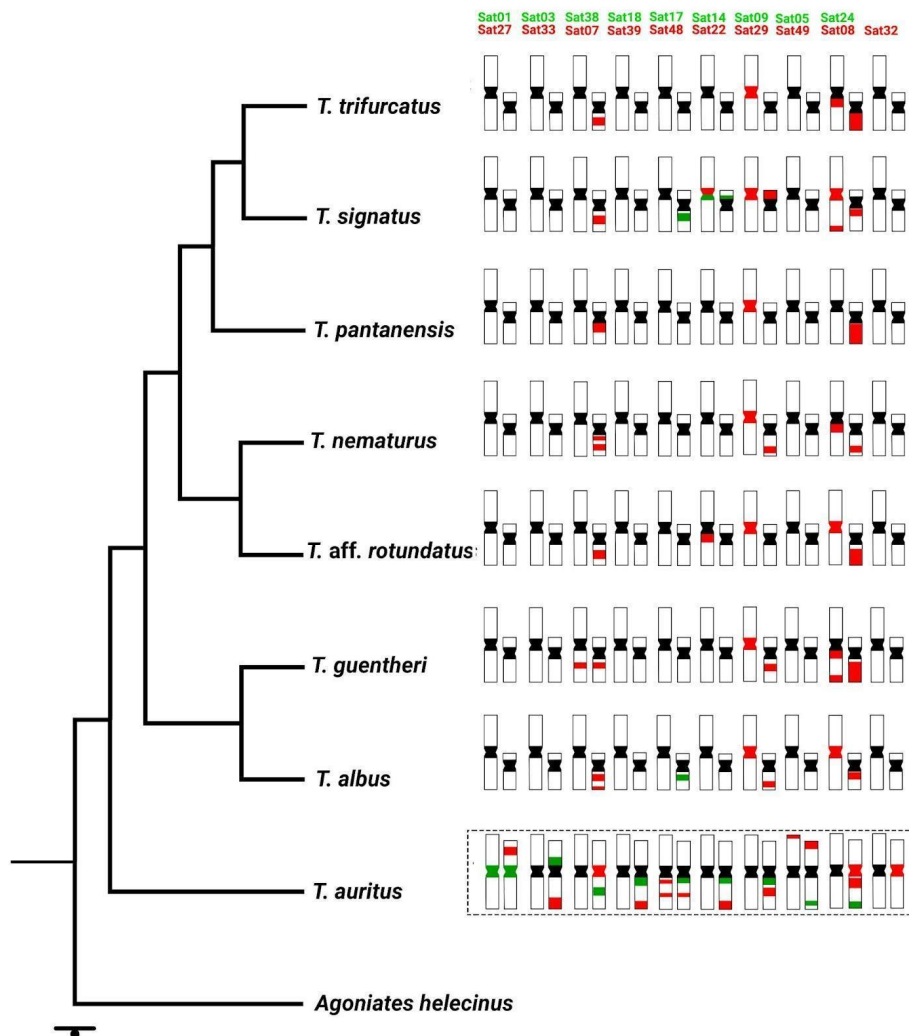
DISCUSSION

In this work, we reconstruct the likely evolutionary pathways that led to the SatDNA patterns currently observed, which took place after the diversification of several *Triportheus* species. The combined findings from previous studies (DINIZ et al., 2008; KRETSCHMER et al., 2022; YANO et al., 2014; 2016; 2017) and those from the present research further show the plasticity that affects the evolutionary history of *Triportheus* ZW sex chromosomes and the remarkably dynamic differentiation process of the female-specific W chromosome.

The W chromosome differentiation

To date, all *Triportheus* species exhibit a highly differentiated ZW sex chromosome system (YANO et al., 2014, 2021). Despite the overall chromosomal similarities, our cross-hybridization experiments using TAU SatDNAs revealed distinct accumulation patterns among the analyzed W chromosomes. The largest W chromosome among all *Triportheus* species, with a similar size and shape to the Z, is found in TAU (sister species of all *Triportheus* that diverged approximately 20.7 ± 6.5 Myr) [10,22]. In this species, 19 TauSatDNA families are accumulated on the W, predominantly on its heterochromatic long arms (KRETSCHMER et al., 2021), which are also home to a major 18S rDNA cistron (ARTONI et al., 2001). From these, only two of them (TauSat07 and TauSat08) were ubiquitously accumulated in the W chromosome of all the other *Triportheus* species (**Figure 4**).

Figure 4. Phylogenetic relationships among the analyzed *Triporthesus* species based on MARIGUELA et al. (2016) and MELO et al. (2021) with the representative ideograms highlighting the distribution of the TauSatDNAs on the Z (on the left) and W (on the right) chromosomes of *Triporthesus*. Some data came from KRETSCHMER et al. (2022).



Recently, GOES et al. (2023) characterized the satellitomes of the characiform fishes *Colossoma macropomum* and *Piaractus mesopotamicus*, and four TauSatDNAs were detected (TauSat06-42, TauSat19-76, TauSat16-29, and TauSat12-66) in these species; however, none of them were located on the sex chromosomes of any *Triporthesus* species (KRETSCHMER et al., 2021, present data). This assertion is supported by the fact that despite having a ZW sex system, like *C. gomesi* (SERRANO-FREITAS et al., 2020) and *M. macrocephalus* (UTSUNOMIA et al., 2019), our analyses do not show any similarities between the SatDNAs found in the sex chromosomes of

Triportheidae and other satellitomes of Characiforms. Therefore, the SatDNAs implicated in the evolution of their sex chromosomes are either species-specific or exclusively shared only by phylogenetically closely related species. As ZOO-FISH and CGH experiments demonstrated the correlation of the repetitive portion of sex chromosomes of Triportheidae and Gasteropelecidae (YANO et al., 2021) and given the close evolutionary relationship of these two families (MELO et al., 2021), future studies can examine the association between the SatDNAs accumulated in Triportheidae and Gasteropelecidae sex chromosomes.

From W to Z chromosomes

The evolution of a sex chromosome is assumed to take place via a progressive stopping of recombination between homologous autosomes (BACHTROG, 2006). Following that, gene degradation and repetitive DNA accumulation occur (CHARLESWORTH et al., 1996; RICE et al., 1987). However, the dynamic changes in repetitive DNA content that affects the Z (or X) and the W (or Y) chromosomes are completely different (CHARLESWORTH et al., 1996). Here, only 3 (TauSat01 (which makes up the centromere of all chromosomes of TAU), TauSat48, and TauSat49) out of the 19 TauSatDNAs investigated exhibit a detectable FISH signal on the Z chromosomes of TAU (KRETSCHMER et al., 2022, **Figure 4**). Interestingly, as speciation processes take place, the Z chromosomes of some species began to accumulate some TauSatDNAs while the W chromosomes lost most of the TauSatDNA repeats (**Figure 4**). Although unusual in various animal species, including fishes (CIOFFI et al., 2012 and in our work) and birds (WEISSENSTEINER E SUH, 2019), repetitive sequence accumulation on the Z chromosome has been observed. In fact, these frameworks of SatDNA homogenization may act as a possible dosage mechanism, compensating for the losses of such sequences in one of the sex chromosomes, and maintaining the subdued recombination between the sex-determining and autosome regions, as the recombination loop may still form (MCKEE e HANDEL, 1993). On the other hand, when SatDNAs accumulate in both the Z and the W chromosomes, they could promote a short homologous area, which would slow down the differentiation of the W chromosome and stop the turnover processes. In this context, we can assume

that TauSat29 may be located in the pseudoautosomal regions (PARs) since it is present on the Z and W sex chromosomes of several species (TAL, TGU, TNE, and TSI). During male meiosis, PARs enable a proper sex chromosomal segregation (COTTER et al., 2016; GABRIEL-ROBEZ et al., 1990). In humans, the PAR1 region has been characterized, uncovering the presence of at least two satellite DNAs (*kalyke* and *pasiphae*) that map the telomeres of the short arms of the X and Y chromosomes (HOYT et al., 2022; PAGE et al., 1987). Therefore, given that species with a common ancestor frequently retain genetic features that have been conserved over time, the similar origin of the sex chromosome system in *Triportheus* species suggests that the PAR may be a conserved region in all species

It is important to recapture that SatDNAs are very dynamic, and their evolution is mediated by molecular drive (DOVER, 1982). They are capable of experiencing quick changes in their nucleotide sequences, copy numbers, monomer lengths, and chromosomal positions (GARRIDO-RAMOS, 2017; PLOHL et al., 2012). OHNO'S hypothesis (1967) states that sex chromosomes are descended from a pair of formerly identical autosomes that stopped recombining and therefore became distinct. Accordingly, although not detectable by FISH, our current results confirmed the Z chromosome of TAU also contains low-copy numbers of all TauSatDNAs accumulated on the W chromosome (**Supplementary Figure S1**). Therefore, these sequences were already present in the proto-sex ancestral ZW chromosomal pair but were nevertheless highly amplified only in the W chromosome. Additionally, from the bulk of SatDNAs analyzed, only six TausatDNAs (namely TauSat07, TauSat08, TauSat14, TauSat17, TauSat22, and TauSat29) have also accumulated in the Z and/or W chromosome of at least one other *Triportheus* species (**Figures 1, 2, 3 and 4**). Therefore, as the speciation process was taking place and the W chromosomes followed their differentiation path, the majority of TauSatDNAs copies originally present on the ancestral form were deleted, most likely followed by the amplification and rise of additional species-specific SatDNAs that subsequently made up the heterochromatic portion of each of these chromosomes. Future investigations focusing on the characterization and isolation of additional *Triportheus* satellitomes (i.e., other than *T. auritus*) should help verify these hypotheses.

The advent of NGS technologies has opened up new possibilities for genomic comparisons of sex chromosomes throughout the evolutionary range. With numerous species having their genomes being sequenced, comparisons on a variety of issues relating to the structure, operation, and evolution of sex chromosomes had been possible (SINGCHAT et al., 2018). However, studies aimed at discovering genes on the Y or W chromosome are highly uncommon because of the many repetitive sequences on the sex-specific chromosomes, which restrict the effectiveness of genome sequence assembly (TOMASZKIEWICZ et al., 2017). Even in groups like birds and mammals that share a conserved ZW and XY sex system, respectively, the sex-specific chromosomes are, in fact, regarded as the most variable part of the genomes and the most difficult ones to assemble. Among mammals, only the Y chromosomes of humans, chimpanzees, and Rhesus monkeys have been fully sequenced, and their structure and gene content differ substantially (HUGHES et al., 2010). Accordingly, only four genes on the human Y are also located on the small marsupial Y, and there are not many shared SatDNA sequences among mammals (GRAVES, 2008). In birds, the W chromosomes are even more variable, differing in size and gene content even among closely related species (WANG et al., 2014). The W chromosome of snakes shows the largest heterogeneity in terms of gene content and the amplification of different repetitive sequences, even within closely related species (MATSUBARA et al., 2016). Accordingly, our current results also point to such a rapid and divergent genomic content of the sex-specific chromosome in a short span of time (~15–25 Myr).

CONCLUSIONS

The analysis and comparison of SatDNAs in the studied *Triportheus* species helped to elucidate the dynamics of these elements in the differentiation of sex chromosomes. We demonstrated that the W female-specific chromosome in this group has undergone fast and diverse genomic evolution. In fact, the genomic composition and shape of the W chromosomes in the several studied species have undergone significant modifications throughout time. The unequal accumulation of SatDNAs on this chromosome shows that, despite their homology, *Triportheus* W chromosomes have experienced unique

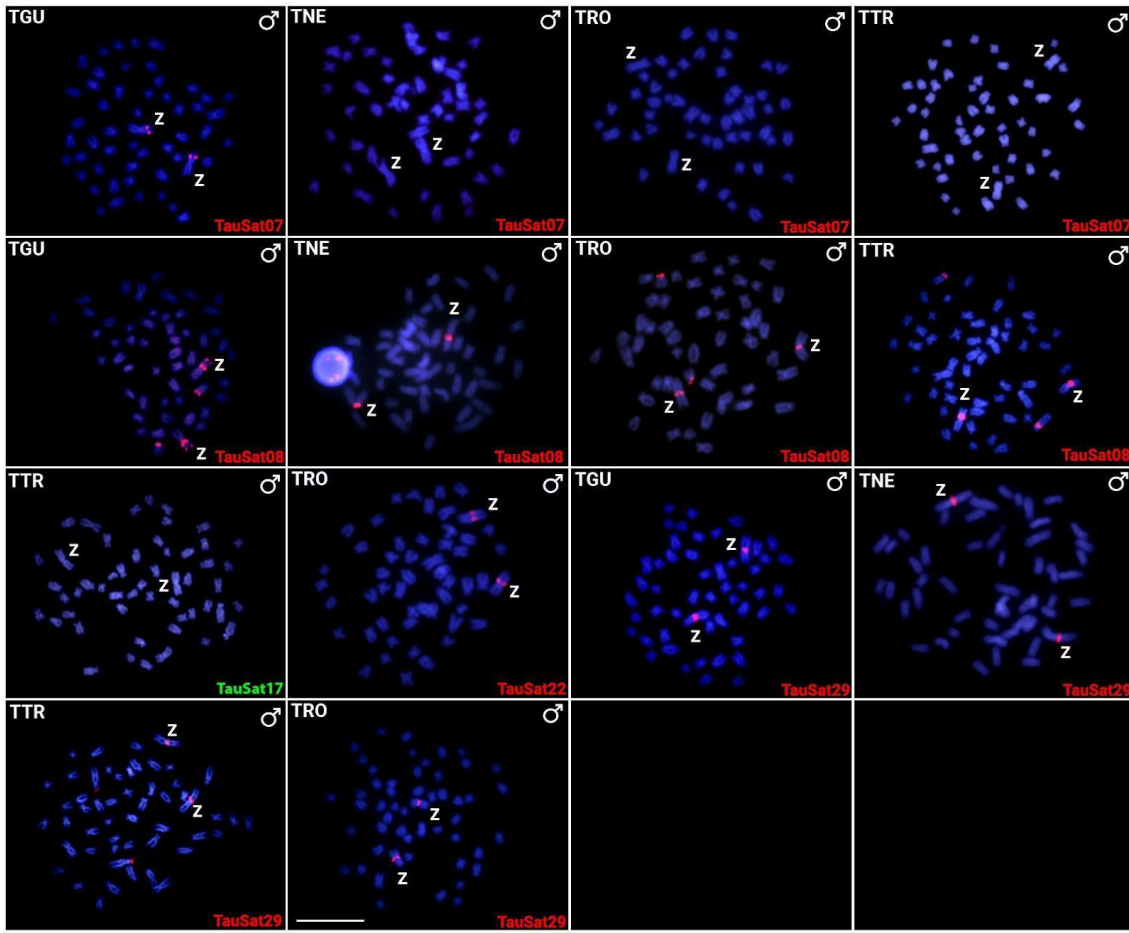
evolutionary processes among different species and do not follow a direct relationship of ancestry.

FUNDING

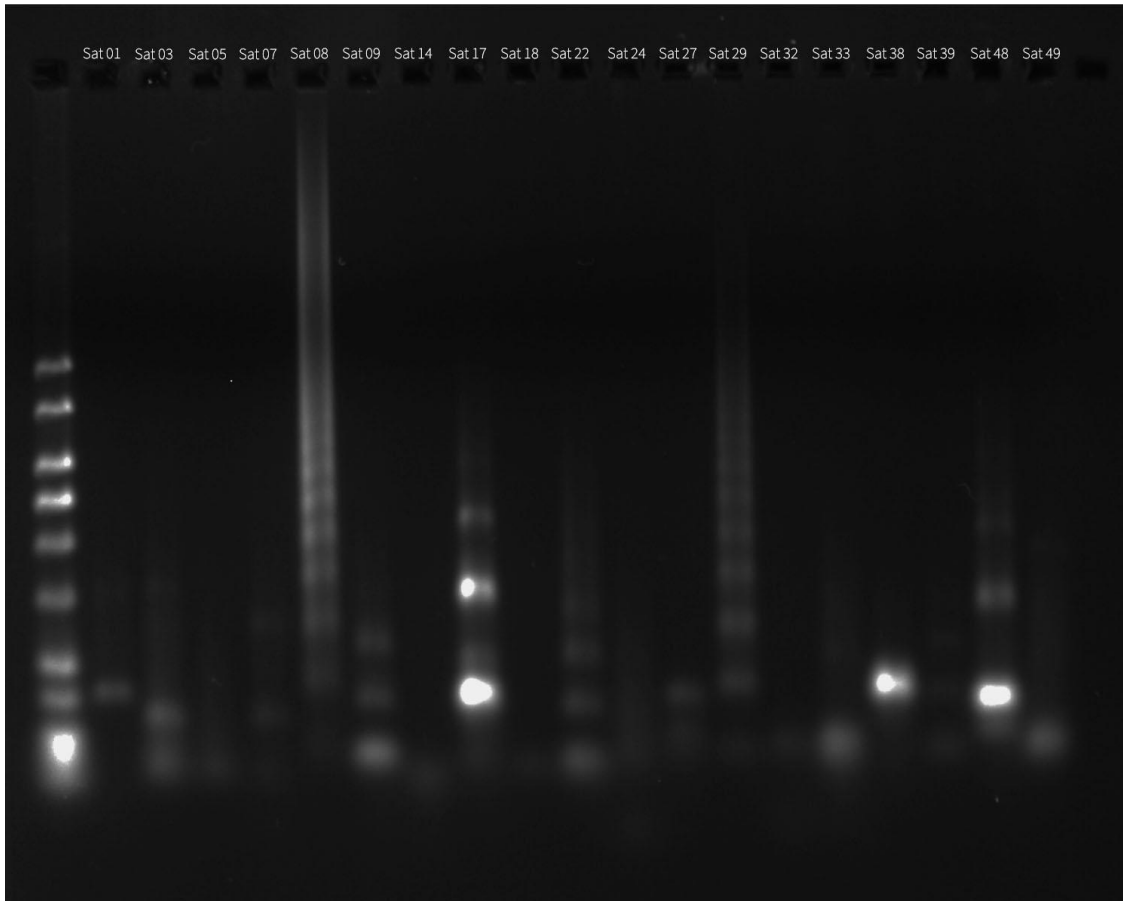
This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant number 2020/11772-8 (M.d.B.C.); 2022/00427-3 (G.A.T.), and by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant number 302928/2021-9 (M.d.B.C.). This study was supported by INCT-Peixes, funded by MCTIC/CNPq (proc. 405706/2022-7). We acknowledge the support from the German Research Foundation Projekt-Nr. 512648189 (T.L.) and the Open Access Publication Fund of the Thueringer Universitaets und Landesbibliothek Jena. All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript.

REFERÊNCIAS

As referências deste artigo encontram-se compiladas no final do presente trabalho.



Supplementary Figure S1: Male metaphase plates of *Triportheus guentheri* (TGU), *T. nematurus* (TNE), *T. rotundatus* (TRO), and *T. trifurcatus* (TTR) highlighting the chromosomal location of TauSat07, TauSat08, TauSat17, TauSat22, and TauSat29. The satDNA family names are indicated on the right bottom, in green (Atto488 labeled) or red (Atto550 labeled). The Z chromosomes are indicated. Bar=5 μ m



Supplementary Figure S2: Positive results for the PCR products checked in a 2% agarose gel for all the 16 TauSatDNAs amplified in the microdissected Z chromosomes. TauSat01 which previously also showed FISH -signals on the Z chromosome of TAU (Kretschmer et al., 2022) was used as a positive control.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise e comparação das sequências de DNA satélites nas espécies de *Triportheus* estudadas ajudaram a esclarecer a dinâmica desses elementos e o seu papel na diferenciação dos cromossomos sexuais. Conforme os resultados obtidos neste trabalho, o cromossomo W, nesse grupo de peixes, passou por uma rápida e diversa evolução genômica. A composição genômica e a estrutura dos cromossomos W nas várias espécies estudadas sofreram modificações significativas ao longo do tempo. O acúmulo desigual de DNAs satélites nesse cromossomo mostra que, apesar de possuírem uma origem comum, os cromossomos W de *Triportheus* passaram por processos evolutivos particulares entre diferentes espécies que não seguiram uma relação direta de ancestralidade.

6. REFERÊNCIAS

- ARTONI, R. F. et al. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research**, v. 9, p. 449-456, 2001.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity**, v. 89, n. 1, p. 15-19, 2002.
- BACHTROG, D. A dynamic view of sex chromosome evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 16, n. 6, p. 578-585, 2006.
- BERTOLLO, L.A.C.; CAVALLARO, Z.I. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. **Cytogenetic and genome research**, v. 60, n. 1, p. 60-63, 1992.
- BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. **Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes**. Em OZOUF-COSTAZ, C. et al. **Fish cytogenetic techniques (Chondrichthyans and Teleosts)**. 1ª ed. CRC Press: Boca Raton, 2015; pp. 21–26.
- BULL, J.J. et al. **Evolution of sex determining mechanisms**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1983.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 296, n. 3, p. 513-526, 2021.
- CHARLESWORTH, B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. **Current Biology**, v. 6, n. 2, p. 149-162, 1996.
- CHARLESWORTH, B. The evolution of sex chromosomes. **Science**, v. 251, n. 4997, p. 1030-1033, 1991.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, Gabriel. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.
- CIOFFI, M. B. et al. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 80, n. 6, p. 2125-2139, 2012a.
- CIOFFI, M.B. et al. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **Molecular cytogenetics**, v. 5, p. 1-7, 2012.
- CIOFFI, M.B.; CAMACHO, J.P.M.; BERTOLLO, L.A.C. Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 3, p. 188-194, 2011.
- COTTER, D.J.; BROTMAN, S.M.; SAYRES, M.A.W. Genetic diversity on the human X chromosome does not support a strict pseudoautosomal boundary. **Genetics**, v. 203, n. 1, p. 485-492, 2016.
- CREPALDI, C. et al. Genomic differences between the sexes in a fish species seen through satellite DNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 728670, 2021.
- DA SILVA, M.J. et al. Analysis in *Proceratophrys boiei* genome illuminates the satellite DNA content in a frog from the Brazilian Atlantic forest. **Frontiers in Genetics**, v. 14, p. 1101397, 2023.

DA SILVA, M.J. et al. Great abundance of satellite DNA in Proceratophrys (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 3, p. 141-147, 2020.

DE ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica**, v. 111, p. 91-100, 2001.]

DE LIMA, L.G.; RUIZ-RUANO, F.J. In-depth satellitome analyses of 37 Drosophila species illuminate repetitive DNA evolution in the Drosophila genus. **Genome Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. evac064, 2022.

DEVLIN, R.H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 91-364, 2002.

DINIZ, D.; LAUDICINA, A.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in Triportheus fish species (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 37-41, 2009.

DOS SANTOS, R.Z. et al. A long-term conserved satellite DNA that remains unexpanded in several genomes of Characiformes fish is actively transcribed. **Genome biology and evolution**, v. 13, n. 2, p. evab002, 2021.

DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 111-117, 1982.

FERRETTI, Ana BSM et al. High dynamism for neo-sex chromosomes: satellite DNAs reveal complex evolution in a grasshopper. **Heredity**, v. 125, n. 3, p. 124-137, 2020.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Genera/Species by Family/Subfamily in Eschmeyer's catalog of fishes**. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.a.sp>. Acessado em 10 Jun. 2023.

GABRIEL-ROBEZ, O. et al. Deletion of the pseudoautosomal region and lack of sex-chromosome pairing at pachytene in two infertile men carrying an X; Y translocation. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 54, n. 1-2, p. 38-42, 1990.

GAMBLE, T. et al. Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 5, p. 1296-1309, 2015.

GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.

GOES, C.A.G. et al. The Satellite DNA Catalogues of Two Serrasalminae (Teleostei, Characiformes): Conservation of General satDNA Features over 30 Million Years. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 91, 2022.

GRAVES, J.A.M. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 901-914, 2006.

GRAVES, J.A.M. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 565-586, 2008.

GRAVES, J.A.M.; SHETTY, S. Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, n. 5, p. 449-462, 2001.

GROSSEN, C.; NEUENSCHWANDER, S.; PERRIN, N. Temperature-dependent turnovers in sex-determination mechanisms: a quantitative model. **Evolution**, v. 65, n. 1, p. 64-78, 2011.

GUTIÉRREZ, J. et al. Satellitome Analysis on Talpa aquitania Genome and Inferences about the satDNAs Evolution on Some Talpidae. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 117, 2022.

- HOYT, S.J. et al. From telomere to telomere: The transcriptional and epigenetic state of human repeat elements. **Science**, v. 376, n. 6588, 2022.
- HUGHES, J.F. et al. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 536-539, 2010.
- ITOH, Y.; KAMPF, K.; ARNOLD, A.P. Molecular cloning of zebra finch W chromosome repetitive sequences: evolution of the avian W chromosome. **Chromosoma**, v. 117, n. 2, p. 111-121, 2008.
- JEFFRIES, D.L. et al. A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 4088, 2018.
- JURKA J.; KAPITONOV V.V.; SMIT A.F. **Repetitive elements: detection**. Em: COOPER D.N. **Nature Encyclopedic of the Human Genome**. 1^a ed. Londres: Nature Publishing Group, 2003. p 9–14.
- KEJNOVSKÝ, E. et al. Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. **PLoS one**, v. 8, n. 1, p. e45519, 2013.
- KIKUCHI, K.; HAMAGUCHI, S. Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 4, p. 339-353, 2013.
- KRATOCHVÍL, L. et al. Expanding the classical paradigm: what we have learnt from vertebrates about sex chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1833, p. 20200097, 2021.
- KRETSCHMER, R. et al. Satellitome analysis illuminates the evolution of ZW sex chromosomes of Triportheidae fishes (Teleostei: Characiformes). **Chromosoma**, v. 131, n. 1-2, p. 29-45, 2022.
- LEVAN, Albert; FREDGA, Karl; SANDBERG, Avery A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- LISACHOV, Artem et al. Conservation of Major Satellite DNAs in Snake Heterochromatin. **Animals**, v. 13, n. 3, p. 334, 2023.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. **The Repetitive DNA content of Eukaryotic Genomes**. Em: GARRIDO-RAMOS, M.A. 1^a ed. **Genome Dynamics Repetitive DNA**. Basel: Karger, 2012. p. 1-28.
- LOWER, Sarah Sander et al. Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. **Current opinion in genetics & development**, v. 49, p. 70-78, 2018.
- MALABARBA, M.C.S.L. Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 2, p. 167-204, 2004.
- MANK, J.E.; ELLEGREN, H. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 8, p. 389-391, 2007.
- MARIGUELA, T. C. et al. Phylogeny and biogeography of Triportheidae (Teleostei: Characiformes) based on molecular data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 96, p. 130-139, 2016.
- MARQUIONI, V. et al. Comparative chromosomal mapping in *Triportheus* fish species. Analysis of synteny between ribosomal genes. **Micron**, v. 45, p. 129-135, 2013.
- MATSUBARA, K. et al. Sex chromosome evolution in snakes inferred from divergence patterns of two gametologous genes and chromosome distribution of sex chromosome-linked repetitive sequences. **Zoological Letters**, v. 2, p. 1-16, 2016.
- MCKEE, B.D.; HANDEL, M.A. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. **Chromosoma**, v. 102, n. 2, p. 71-80, 1993.
- MELO, B.F. et al. Accelerated diversification explains the exceptional species richness of tropical characoid fishes. **Systematic Biology**, v. 71, n. 1, p. 78-92, 2022.

MONTIEL, E.E. et al. Satellitome of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), the most diverse among insects. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 826808, 2022.

MOREIRA-FILHO, O. Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish. Brazil. J. **Genet.**, v. 14, n. 4, p. 1085-1090, 1991.

NAKAGAWA, R.K. **O gênero *Triportheus* Cope 1872 (Teleostei; Characiformes; Characidae): aspectos taxonômicos, distribuição geográfica e estudo da musculatura cefálica.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NIRCHIO, Mauro et al. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 25-30, 2007.

OHNO, S. **Sex chromosomes and sex-linked genes.** Springer Berlin, 1967.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, Fausto; HILSDORF, A.W.S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 81-100, 2009.

PAGE, D.C. et al. Linkage, physical mapping, and DNA sequence analysis of pseudoautosomal loci on the human X and Y chromosomes. **Genomics**, v. 1, n. 3, p. 243-256, 1987.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M. et al. High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 6422, 2017.

PAN, Q. et al. Vertebrate sex-determining genes play musical chairs. **Comptes Rendus Biologies**, v. 339, n. 7-8, p. 258-262, 2016.

PEONA, V. et al. Satellite DNA evolution in Corvoidea inferred from short and long reads. **Molecular Ecology**, v. 32, n. 6, p. 1288-1305, 2023.

PEREIRA, J.A. et al. The extensive amplification of heterochromatin in *Melipona* bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. **Chromosoma**, v. 130, p. 251-262, 2021.

PERRIN, N. Sex reversal: a fountain of youth for sex chromosomes?. **Evolution**, v. 63, n. 12, p. 3043-3049, 2009.

PICARD, Marion AL et al. Evolution of gene dosage on the Z-chromosome of schistosome parasites. **Elife**, v. 7, p. e35684, 2018.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Genome Dyn**, v. 7, p. 126-152, 2012.

POKORNÁ, J.M. et al. Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates. **Chromosome Research**, v. 22, p. 35-44, 2014.

POKORNÁ, J.M.; KRATOCHVÍL, L. What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates?. **Biological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2016.

POKORNA, J.M; KRATOCHVÍL, L. Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 1, p. 168-183, 2009.

RICE, W.R. Evolution of the Y sex chromosome in animals. **Bioscience**, v. 46, n. 5, p. 331-343, 1996.

RICE, W.R. The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. **Evolution**, v. 41, n. 4, p. 911-914, 1987.

RODRIGUES, A.S., et al. ZZ/ZW sex chromosome system in the endangered fish *Lignobrycon myersi* Miranda-Ribeiro, 1956 (Teleostei, Characiformes, Triportheidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 2, p. 245, 2016.

ROVATSOS, M. et al. Conserved sex chromosomes across adaptively radiated Anolis lizards. **Evolution**, v. 68, n. 7, p. 2079-2085, 2014a.

ROVATSOS, M. et al. Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. **Biology Letters**, v. 10, n. 3, p. 20131093, 2014b.

ROVATSOS, M. et al. Evolutionary stability of sex chromosomes in snakes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, p. 20151992, 2015.

ROVATSOS, M. et al. Stable Cretaceous sex chromosomes enable molecular sexing in softshell turtles (Testudines: Trionychidae). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42150, 2017.

ROVATSOS, M.; VUKIĆ, J.; KRATOCHVÍL, L. Mammalian X homolog acts as sex chromosome in lacertid lizards. **Heredity**, v. 117, n. 1, p. 8-13, 2016a.

ROVATSOS, Michail et al. Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. **Molecular ecology**, v. 25, n. 13, p. 3120-3126, 2016b.

RUIZ-RUANO, F.J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28333, 2016.

SÁNCHEZ, S.; JORGE, L.C. A new report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus *Triportheus* (Pisces, Triporthinae). **Cytologia**, v. 64, n. 4, p. 395-400, 1999.

ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E.; PLOHL, M. Satellite DNAs—From Localized to Highly Dispersed Genome Components. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 742, 2023.

SCHARTL, M.; SCHMID, M.; NANDA, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, p. 553-571, 2016.

SEMBER, A. et al. Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1833, p. 20200098, 2021.

SENA, R.S. et al. Identification and characterization of satellite DNAs in two-toed sloths of the genus *Choloepus* (Megalonychidae, Xenarthra). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 19202, 2020.

SILVA, D.M.D.A. et al. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12726, 2017.

SINGCHAT, W. et al. Chromosome map of the Siamese cobra: did partial synteny of sex chromosomes in the amniote represent “a hypothetical ancestral super-sex chromosome” or random distribution?. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2018.

TERENCIO, M.L. et al. Comparative cytogenetics of *Carnegiella marthae* and *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) and description of a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 231-234, 2008.

TOMASZKIEWICZ, M.; MEDVEDEV, P.; MAKOVA, K.D. Y and W chromosome assemblies: approaches and discoveries. **Trends in genetics**, v. 33, n. 4, p. 266-282, 2017.

TREE OF SEX CONSORTIUM et al. Tree of sex: a database of sexual systems. **Scientific Data**, v. 1, 2014.

TYLER-SMITH, C.; BROWN, W.R. Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. **Journal of molecular biology**, v. 195, n. 3, p. 457-470, 1987.

UTSUNOMIA, R. et al. Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5856, 2019.

VALERI, M. P. et al. First description of a satellite DNA in manatees' centromeric regions. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 694866, 2021.

VENERE, P.C. et al. Occurrence of ZZ/ZW sex chromosomes in *Thoracocharax stellatus* fish (Characiformes, Gasteropelecidae) from the Araguaia River, South America. **Genetica**, v. 133, p. 109-112, 2008.

VEYRUNES, F. et al. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. **Genome research**, v. 18, n. 6, p. 965-973, 2008.

VOZDOVA, M. et al. Satellite DNA in neotropical deer species. **Genes**, v. 12, n. 1, p. 123, 2021.

WALSH, J.B.; STEPHAN, W. **Multigene Families: Evolution**. Em: **Encyclopedia Life Sci**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2001. pp. 30 1–6.

WANG, Z. et al. Temporal genomic evolution of bird sex chromosomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 1-12, 2014.

WATERS, P.D.; GRAVES, J.A.M. Monotreme sex chromosomes—implications for the evolution of amniote sex chromosomes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 8, p. 943-951, 2009.

WEISSENSTEINER, M.H.; SUH, A. Repetitive DNA: The dark matter of avian genomics. **Avian genomics in ecology and evolution: From the lab into the wild**, p. 93-150, 2019.

WRIGHT, A.E. et al. How to make a sex chromosome. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 12087, 2016.

YANO, C.F. et al. Against the mainstream: exceptional evolutionary stability of ZW sex chromosomes across the fish families Triportheidae and Gasteropelecidae (Teleostei: Characiformes). **Chromosome Research**, v. 29, n. 3-4, p. 391-416, 2021.

YANO, C.F. et al. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90946, 2014.

YANO, C.F. et al. Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 small nuclear DNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae): high variability and particular syntenic organization. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 146-154, 2017.

YANO, C.F. et al. W chromosome dynamics in *Triportheus species* (Characiformes, Triportheidae): an ongoing process narrated by repetitive sequences. **Journal of Heredity**, v. 107, n. 4, p. 342-348, 2016.