

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)*

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO COMPARATIVO EM PEIXES  
CICLÍDEOS UTILIZANDO SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA**

**Irani Alves Ferreira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Cesar Martins

Botucatu – SP  
Julho/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ferreira, Irani Alves.

Mapeamento cromossômico comparativo em peixes ciclídeos utilizando seqüências repetitivas de DNA / Irani Alves Ferreira. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,

Instituto de Biociências de Botucatu 2009

Orientador: César Martins  
Assunto CAPES: 20204000

1. Peixe - Genética 2. Mapeamento cromossômico

CDD 574.92

Palavras-chave: Mapeamento cromossômico; Peixes; Seqüências repetidas de DNA

***Dedicatória,***

**Aos meus pais, Wander e Antônia, que sempre me deram amor, apoio e incentivo para lutar pelos meus objetivos e sonhos.**

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, repito, que com apenas quatro letrinhas – A, C, G, T – criou uma diversidade enorme de seres, nunca iguais, mas semelhantes ao ponto de serem identificados como obras de um mesmo criador.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Cesar Martins, pela competência, por todos os ensinamentos, pela orientação, pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo em sempre conhecer e aprender mais, e pela amizade. Muito obrigada.*

*À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa e pelos recursos financeiros destinados aos projetos do laboratório.*

*Ao CNPq e a CAPES pelos recursos financeiros destinados aos projetos do laboratório.*

*Ao Prof. Thomas D. Kocher e sua equipe de laboratório da Universidade de Maryland, College Park-MD, USA, pela oportunidade de estágio, pelos ensinamentos e pelo material cedido. E aos amigos do Kocher Lab, Aimee, Jennifer, Reade e BoYoung. Thank you very much.*

*Ao Prof. David Penman da Universidade de Stirling, Stirling, Scotland, pelo material cedido.*

*À Fazenda Entre Rios e ao Sr. Arthur Antonângelo, pelo apoio nas coletas realizadas no Rio Araguaia, em São Félix do Araguaia, MT.*

*Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Vênere por ter direcionado os meus primeiros passos na vida científica, pelo incentivo em todos os momentos, pela amizade e pela colaboração nas coletas em campo e nas análises cromossômicas.*

*Aos Profs. Drs. Adriane Wasko, Cristiane Shimabukuro, Claudio Oliveira, Fausto Foresti e Ricardo Benine, pelos ensinamentos, pelo exemplo como pesquisadores, pela amizade e pelas conversas científicas e de assuntos gerais.*

*Aos funcionários da pós-graduação, pela amizade e pelos diversos esclarecimentos.*

*Aos amigos do Departamento de Morfologia, em especial aos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes. Não vou listar os amigos, mas todos sabem o quanto e como são especiais para mim. A todos muito obrigada pelas discussões sobre trabalho, as conversas, as viagens e os cafés.*

*Aos professores e, em especial, aos técnicos administrativos do Departamento de Morfologia, Renato, Ricardo, Sueli, Vicente, Dona Tera, Luciana e Zé Eduardo. E a Dona Yolanda e Vanda.*

*Aos amigos do Laboratório de Genômica Integrativa, Andréia, Bruno, Danillo, Diogo, Guilherme, Juliana, Sara e Gilberto. Vocês são muito especiais. Muito obrigada pela convivência na vida científica e pessoal.*

*À Tatiane e Andréia, que são amigas e são/foram companheiras de moradia. Muito obrigada pelas longas conversas.*

*Ao meu amor Luis, que mesmo longe sempre esteve dentro do meu coração. Você fez os meus dias nos EUA melhores e a minha vida muito mais feliz. Muito obrigada pelo incentivo, sensatez, paciência e carinho, durante a finalização deste trabalho, mesmo estando tão longe. Amo muito você.*

*Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e pais, pelo amor, apoio e o grande incentivo em realizar os meus sonhos. Eu amo vocês. Muito obrigada.*

*E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu trabalho e minha formação profissional.*

## SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
1.1. Biologia e evolução de Cichlidae	3
1.2. Mapeamento Genômico em Ciclídeos	11
1.3. Mapeamento cromossômico e seqüências repetitivas de DNA	14
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Espécies utilizadas	19
3.2. Metodologia	20
3.2.1. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos	20
3.2.2. Isolamento de elementos transponíveis através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)	21
3.2.3. Identificação de BACs ricos em seqüências repetitivas	22
3.2.4. Isolamento e purificação de BACs e plasmídeos	23
3.2.5. Isolamento de seqüências repetitivas através da técnica de $C_0t-1$ DNA	25
3.2.6. Transferência de BACs para membranas de nylon – Dot blotting	26
3.2.7. Hibridação de DNA imobilizado em membranas	27
3.2.8. Obtenção dos cromossomos mitóticos através de preparações diretas	28
3.2.9. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência – FISH	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Isolamento e mapeamento cromossômico de retrotransposons <i>Rex</i>	34
4.2. Mapeamento cromossômico de DNA satélite SATA em espécies de ciclídeos africanos	44
4.3. Mapeamento cromossômico do elemento transponível <i>ROn-1</i> em espécies de ciclídeos africanos	50
4.4. Mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas inseridas em BACs	55
4.5. Análise comparativa do mapeamento de seqüências repetidas em espécies de ciclídeos	62
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	75
Anexo 1. Manuscrito em preparação: Chromosome evolution in African Cichlidae fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs	75
Anexo 2. Manuscrito em preparação: Chromosome evolution in African and South American Cichlidae fish: contributions from the physical mapping of <i>Rex</i> retrotransposons	88

## RESUMO

A família Cichlidae tem despertado um grande interesse científico devido à rápida e extensa radiação adaptativa sofrida em alguns de seus grupos e por conter espécies com grande potencial para a aquicultura, como a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. O mapeamento físico cromossômico mostra-se promissor como ferramenta para os estudos comparativos e evolutivos entre diferentes espécies. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo realizar mapeamento cromossômico comparativo em ciclídeos utilizando seqüências repetitivas de DNA como sondas. Elementos transponíveis, DNA satélite e seqüências repetidas inseridas em BACs foram utilizados como sondas, através da técnica de FISH, em espécies de ciclídeos africanos e sul-americanos. Os retrotransposons *Rex* localizaram-se principalmente nas regiões centroméricas de espécies africanas e sul-americanas, com exceção de *O. niloticus* que demonstrou um padrão de localização disperso destes elementos. O acúmulo de *Rex* nos centrômeros destas espécies é coincidente com as regiões heterocromáticas, que representam um refúgio para seqüências repetitivas, devido à baixa taxa de recombinação. O DNA satélite SATA hibridou nos centrômeros de todas as espécies analisadas. Esta conservação centromérica mostra um papel importante destas seqüências na organização estrutural e funcional destas regiões nas diferentes espécies. Além disto, em *O. karongae*, foram observados sinais intersticiais em três pares cromossômicos, corroborando a hipótese de fusões cromossômicas que levaram à redução do número diplóide nesta espécie. O elemento transponível *RON-1* localizou-se intersticialmente no braço longo do par maior de *O. niloticus* e em posição próxima ao telômero também no braço longo do par meta-submetacêntrico (m/sm) maior dos haplocromíneos e hemicromíneos. As seqüências inseridas em BACs apresentaram-se dispersas nos cromossomos das espécies de tilapiíneos, principalmente no par cromossômico maior. Nas espécies haplocromíneas estes clones mapearam no par cromossômico m/sm maior e em alguns pares cromossômicos menores. O mapeamento comparativo de *RON-1* e dos BACs indicam uma conservação de seqüências repetitivas e a homologia entre o par cromossômico maior dos tilapiíneos e o par m/sm maior dos não-tilapiíneos. Além disto, a localização de *RON-1* mostrou que diferentes rearranjos cromossômicos podem ter ocorrido na origem destes pares cromossômicos, durante a história evolutiva dos ciclídeos.



## ABSTRACT

The Cichlidae family is one of the most species-rich families of fishes. This family has attracted the attention of the evolutionary biologists due the rapid radiation occurred in some species. Moreover, some cichlid species are important for the world aquaculture, such as Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The chromosome mapping is useful for comparative and evolutionary studies among different species. To further understand the mechanisms of chromosome evolution in cichlids, repeated sequences were used for the comparative chromosome mapping in cichlid species. Probes containing the transposable elements (TEs) *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* and *RON-1*, the SATA satellite DNA, and a BAC-clone enriched of several types of repeated DNAs were used through FISH in the chromosomes of African and South-American cichlids. The TEs *Rex* were mainly distributed in the centromeric region of all chromosomes in all cichlids, with the exception of *O. niloticus*, that presented TEs distributed overall in the chromosome arms. The localization of TEs *Rex* are in coincidence with heterochromatic regions, which can represent an perfect environment for the accumulation of repeated sequences. The satellite DNA was mapped in the centromeres of all cichlid species. The maintenance and centromeric distribution of the SATA satellite DNA in African cichlids suggest that this sequence can play an important role in the organization and function of the centromere in these species. Moreover, in *O. karongae*, the SATA have shown interstitial signals in three chromosome pairs, corroborating that chromosome fusions were involved in the reduction of diploid number in this species. The transposable element *RON-1* was localized in just one cluster in the largest chromosome of African cichlids, but in different positions, suggesting that different chromosomal rearrangements could have occurred in the origin of the largest chromosomes pairs of tilapiines and non-tilapiines. The sequences inserted in the BAC-clones were distributed overall in the chromosomes of tilapiine species, mainly in the long arm of the largest chromosome pair. In the haplochromine species, these sequences were mapped in the largest meta/submetacentric chromosome pair and in some subtelo/acrocentric pairs. The comparative chromosome mapping of *RON-1* and the BAC-clones have shown maintenance of repeated sequences and the homology of the largest chromosome pair in tilapiines and non-tilapiines species. Furthermore, the mapping of *RON-1* suggested that different chromosomal rearrangements could have occurred in the origin of the largest chromosomes pairs of tilapiines and non-tilapiines.

## **1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

### **1.1. Biologia e evolução de Cichlidae**

O grupo dos peixes é o mais antigo e diverso dentre os vertebrados. As espécies incluídas neste grupo representam pouco mais da metade das espécies de vertebrados, ou seja, 27,977 espécies de peixes válidas estimadas para um total de 54.711 (Nelson, 2006); porém, este número pode ser ainda maior, já que a cada ano mais espécies são descritas.

Os peixes habitam diversos ambientes aquáticos. Eles podem ser encontrados a 5.200 metros de altitude, em 1.000 metros de profundidade, em cavernas, em água doce, em lagos de água mais salgada do que o oceano, ambientes a temperaturas de 42,5 °C e de -2 °C. São organismos que possuem uma diversidade considerável de forma, cor, tamanho e comportamento. Os peixes são elementos importantes na economia de muitas populações, servindo como alimento e sendo utilizados na pesca esportiva e aquarofilia. Além disso, servem para avaliação da poluição dos ambientes aquáticos e possuem espécies modelo para estudos de comportamento, ecologia, fisiologia, genética e evolução (Nelson, 2006).

Dentre as espécies de peixes utilizadas para diversos estudos encontram-se os ciclídeos (Figura 1). A família Cichlidae, pertencente à ordem Perciformes, está incluída entre as nove famílias de peixes com maior número de espécies (Nelson 2006), sendo estimadas 3.000 espécies distribuídas pela América Central e do Sul, Madagascar, Sudeste da Índia e África (Kocher, 2004; Salzburger e Meyer, 2004). A maior diversidade de espécies é encontrada principalmente nos grandes lagos do leste da África, Lagos Tanganyika, Malawi e Victoria (Turner et al., 2001; Turner, 2007). Este grupo de peixe tem atraído grande atenção dos pesquisadores devido a

sua rápida radiação adaptativa ocorrida nos grande lagos africanos (Kocher, 2004), ao valor de várias espécies para a aquariofilia e a grande importância de algumas espécies, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), para a aqüicultura mundial.



Figura 1: Diversidade de espécies da família Cichlidae. Da esquerda para a direita e de cima para baixo: *Oxylapia polli*, *Ptychochromis insolitus*, *Ptychochromoides katria*, *Etroplus maculatus*, *Paretroplus nourissati*, *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron*, *Tilapia mariae*, *Hemichromis bimaculatus*, *Astatotilapia burtoni*, *Labeotropheus trewavasae*, *Haplochromis obliquidens*, *Metriaclima lombardoi*, *Retroculus lapidifer*, *Astronotus ocellatus*, *Cichla ocellaris*, *Symphysodon aequifasciatus*, *Pterophyllum leopoldi*, *Mesonauta festivus*, *Heros efasciatus*, *Geophagus brasiliensis*.

Análises filogenéticas, baseadas em genes mitocondriais, nucleares e caracteres morfológicos de espécies de ciclídeos representantes das diferentes regiões geográficas, indicam que a família Cichlidae pode ser subdividida em quatro subfamílias: (1) Etroplinae (ciclídeos de Madagascar e sul da Ásia – Índia e Sri Lanka), (2) Ptychochrominae (ciclídeos dos gêneros *Oxylapia*, *Ptychochromis* e *Ptychochromoides* endêmicos da Ilha de Madagascar), (3) Cichlinae (espécies americanas) e (4) Pseudocrenilabrinae (ciclídeos africanos) (Sparks e Smith, 2004) (Figura 2a).

A divisão dos ciclídeos em quatro subfamílias torna-se também informativa do ponto de vista biogeográfico. A família Cichlidae parece ter surgido há mais de 130 milhões de anos na Gondwana, antes da separação dos continentes asiático, africano e americano. No entanto, a separação das quatro subfamílias é congruente com as hipóteses de fragmentação da Gondwana (Sparks e Smith, 2004), tendo primeiro ocorrido uma separação entre a região contendo Madagascar/Índia da região África/América, e posteriormente a separação dentro destas regiões. Esta fragmentação da Gondwana está de acordo com os dados filogenéticos para a família Cichlidae, pois os ciclídeos do Sul da Ásia e Madagascar são parafiléticos, sendo Etroplinae o grupo irmão de todos os ciclídeos, e Ptychochrominae o grupo irmão do clado monofilético formado pelas espécies da África (Pseudocrenilabrinae) e Região Neotropical (Cichlinae) (Sparks e Smith, 2004) (Figura 2).

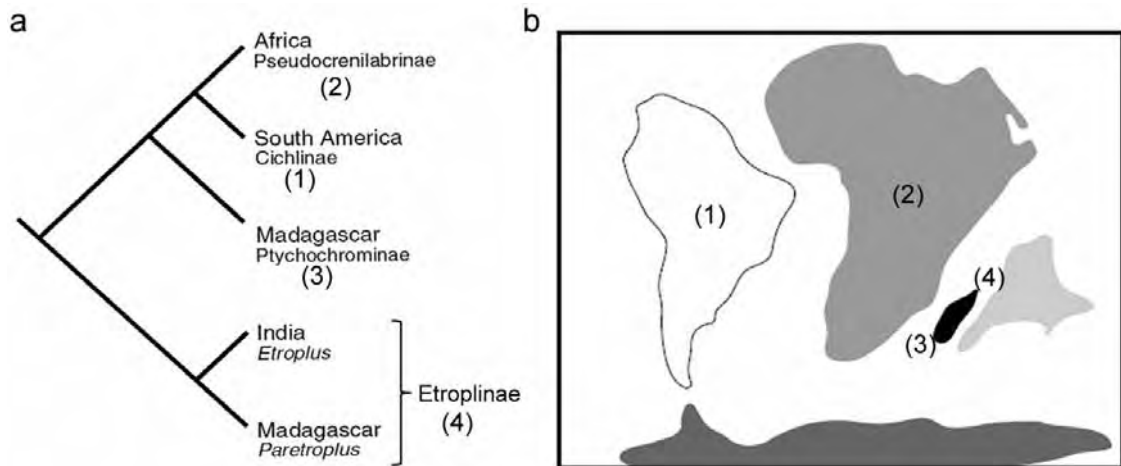


Figura 2: Cladograma táxon-área de Cichlidae (a), e mapa representando a separação da Gondwana a aproximadamente 85-80 milhões de anos atrás (b), mostrando a relação entre a divisão da família e a fragmentação da Gondwana. Os números representam a localização das subfamílias de Cichlidae no mapa. Adaptado de Sparks e Smith (2004).

Apesar da distribuição da família Cichlidae ocorrer nos diferentes continentes, o maior número de espécie está presente na região dos grandes lagos no leste da África (Kocher, 2004). O lago Tanganyika, o mais antigo dos lagos desta região, com uma idade de 9-12 milhões de anos, possui um número estimado de 250 espécies de ciclídeos (Turner et al., 2001; Salzburger e Meyer, 2004). O lago Malawi, com 2-5 milhões de anos, possui cerca de 700 espécies. E o lago Victoria, formado entre 250-750 mil anos atrás, contém cerca de 500 ou mais espécies de ciclídeos, sendo estimado que a radiação de espécies neste lago ocorreu entre 98-137 mil anos atrás (Turner et al., 2001; Verheyen et al., 2003; Salzburger e Meyer, 2004). Análises moleculares demonstraram que o lago Tanganyika consiste de várias linhagens de ciclídeos que invadiram o lago independentemente. Uma destas linhagens é grupo irmão das espécies que se dispersaram para os rios e lagos do leste da África (principalmente no Victoria e Malawi). Portanto, tem sido proposto que o lago

Tanganyika serviu como reservatório e *hotspot* para diferenciação e dispersão de algumas espécies para os outros lagos (Salzburger et al., 2002; Verheyen et al., 2003; Kocher, 2004; Salzburger et al., 2005).

Apesar da existência de diversas tribos dentro do clado dos ciclídeos africanos, dois grupos têm se destacado, os tilapiíneos e os haplocromíneos, devido a presença de espécies utilizadas na aquicultura e espécies que apresentam uma rápida radiação adaptativa (Turner, 2007). Os tilapiíneos incluem os gêneros *Sarotherodon*, *Oreochromis*, *Tilapia*, e um quarto gênero, *Danakilia*, que compreende uma única espécie. Estes peixes, comumente denominados de tilápias, são endêmicos de rios e lagos africanos e do vale do rio Jordão no Oriente Médio (Trewavas, 1983), sendo introduzidos em diversos países com o objetivo de cultivo.

Embora os gêneros de tilapiíneos contenham cerca de 100 espécies, somente *S. melanotheron*, *T. rendalli*, *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *O. aureus* e os híbridos de *Oreochromis* têm grande importância na piscicultura mundial (Cnaani e Hulata, 2008). A tilápia do Nilo é um dos peixes de água doce mais cultivado em todo o mundo atualmente, com uma produção anual de aproximadamente 1,9 milhões de toneladas (FAO, 2006). No Brasil, a produção de tilápia representa 37% das espécies de peixes de água doce cultivadas (IBAMA, 2006). Além da alta produção em água doce, sua alta capacidade adaptativa a ambientes de diferentes salinidades vem permitindo o seu cultivo também em águas salobras e salgadas (Kubitza, 2005). Porém, por causa da seleção e reprodução de indivíduos aparentados ou pelo uso de um pequeno número de reprodutores, as práticas de aquicultura têm levado a um decréscimo da variabilidade genética presente nos estoques cultivados, e uma perda das espécies puras (Watanabe et al., 2002).

Os haplocromíneos da África Central e Leste, especialmente aqueles dos lagos do Rift Valley, têm passado por um evento de especiação extraordinário e atualmente são considerados como um exemplo clássico de radiação adaptativa (Liem, 1991; Kocher, 2004). Acredita-se que existam 500-700 espécies adaptadas a nichos específicos somente no Lago Malawi (Stiassny, 1991), as quais apresentam uma diversidade morfológica maior do que as espécies, mais recentes, do Lago Victoria (Danley e Kocher, 2001). Análises da história evolutiva dos haplocromíneos do lago Malawi têm demonstrado uma radiação caracterizada por três etapas sequenciais de diversificação (Danley e Kocher, 2001). Primeiro ocorreu uma adaptação de algumas espécies a habitats arenosos e de outras a ambientes rochosos. A segunda etapa foi caracterizada pela radiação da morfologia trófica dentro de cada habitat, o que pode ser visualizado nas das diferentes formas da mandíbula. Por último, teria ocorrido a diferenciação na coloração dos machos, em resposta à seleção sexual exercida pelas fêmeas. O padrão de coloração dos machos parece ter contribuído significativamente para a radiação tanto das espécies do Lago Malawi quanto do lago Victoria (Danley e Kocher, 2001; Kocher, 2004). Estes haplocromíneos, que parecem representar a mais ampla radiação de ciclídeos, apresentam adaptações ecológicas e de comportamento que estão associadas à ampla diversidade morfológica observada (Turner, 2007).

Os ciclídeos da região Neotropical, subfamília Cichlinae, também apresentam uma grande diversidade de formas, comportamento e especializações relacionadas a estratégias tróficas particulares ou à vida em condições ambientais especiais (Lowe-McConnell, 1991). A maioria das espécies habita ambientes lênticos dentro de rios e córregos, com exceção de algumas espécies reofílicas do gênero *Retroculus*, *Crenicichla* e *Teleocichla*. Em relação à alimentação, os ciclídeos

neotropicais alimentam-se de uma variedade de invertebrados, peixes e plantas (Lowe-McConnell, 1991; Kullander, 2003).

Entre as espécies de ciclídeos neotropicais merecem destaque as espécies de *Cichla*, *Astronotus*, *Pterophyllum* e *Symphysodon*. Os tucunarés (*Cichla* sp) e apaiaris ou oscar (*Astronotus* sp), popularmente conhecidos, são muito utilizados para a pesca de subsistência e aquicultura. Além disto, as espécies de tucunaré são utilizadas também na pesca esportiva em diferentes regiões do Brasil. Já os acarás-bandeira ou *angelfish* (*Pterophyllum*) e os discos (*Symphysodon*) são muito utilizados para a aquariofilia (Goldstein, 1988; Kullander, 2003) devido ao seu colorido fascinante (Axelrod, 1996).

Kullander (1998) propôs uma filogenia para a família Cichlidae baseado em 91 caracteres morfológicos de 43 espécies sul-americanas e sete espécies do Velho mundo, sendo os ciclídeos sul-americanos subdivididos em cinco subfamílias. Em um trabalho mais recente, os ciclídeos americanos foram incluídos dentro de uma única subfamília, Cichlinae, formando um agrupamento monofilético com aproximadamente 480 espécies (Smith et al., 2008). A subfamília Cichlinae está dividida em sete tribos: Cichlini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchini, Geophagini, Cichlasomatini e Heroini. Cichlini, composto por *Cichla* e *Retroculus*, é grupo irmão de todos os outros ciclídeos da Região Neotropical (Figura 3) (Smith et al., 2008). Segundo Farias et al., (2000), as espécies neotropicais apresentam níveis significativamente maiores de variação genética do que os africanos, apesar da menor diversidade em espécies.

Apesar da grande importância para aquicultura e estudos evolutivos, poucos estudos citogenéticos e genéticos têm sido direcionados aos ciclídeos frente à grande diversidade de espécies existentes. Desta forma, o emprego de



metodologias que visam estabelecer as relações entre o genoma e sua organização cromossômica é de extrema valia na compreensão da história evolutiva desta família de peixes.

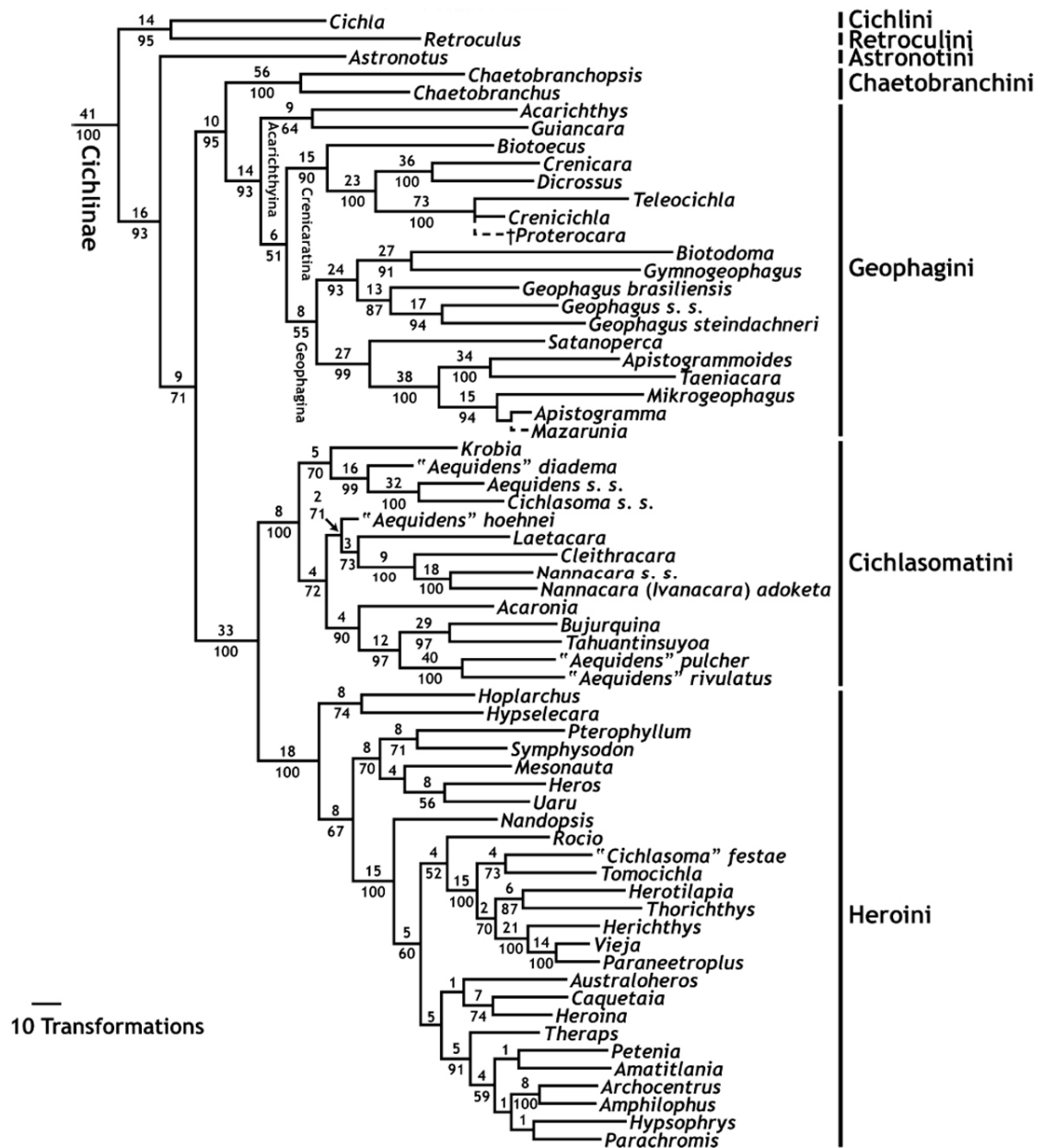


Figura 3: Relações filogenéticas da subfamília Cichlinae. Adaptado de Smith e colaboradores (2008).

## 1.2. Mapeamento Genômico em Ciclídeos

Do ponto de vista genético, o conhecimento do genoma de espécies de ciclídeos é ainda preliminar e aquém do conhecimento já acumulado para outras espécies de peixes, como o baiacu (*Tetraodon nigroviridis*) (Jaillon et al., 2004), o paulistinha (*Danio rerio*) (Meli et al., 2008) e o medaka (*Oryzias latipes*) (Kasahara et al., 2007), organismos considerados modelos para estudos genômicos. Devido a sua importância científica, tanto para a biologia fundamental quanto aplicada, e ao grande número de espécies existentes, estudos citogenéticos e genéticos relacionados ao mapeamento do genoma de espécies de ciclídeos são oportunos e certamente necessários.

Os estudos citogenéticos já realizados em 135 espécies da família Cichlidae demonstram que a distribuição do número diplóide está relacionada à distribuição geográfica das espécies. Os ciclídeos africanos têm um número diplóide modal igual a 44 cromossomos, enquanto que os da região Neotropical tem um número modal  $2n=48$  cromossomos, com algumas variações dentro dos grupos (Feldberg et al., 2003). Dentre as 135 espécies, 106 pertencem à subfamília Cichlinae, 27 à Pseudocrenilabrinae e 2 espécies são da subfamília Etroplinae, não havendo nenhuma descrição cariotípica para as espécies de Ptychochrominae. Embora a subfamília da região africana seja a mais especiosa dentro de Cichlidae, os estudos cariotípicos estão mais concentrados nas espécies do grupo neotropical. Por outro lado, os estudos genéticos e genômicos envolvendo principalmente a aplicação de ferramentas de análise molecular, estão focados em poucas espécies africanas.

As análises envolvendo citogenética molecular realizadas em ciclídeos mostram a localização cromossômica de seqüências de DNAs ribossomais 5S e 18S (Martins et al., 2000, 2002; Vicari et al., 2006), diversos DNAs repetitivos não-

codificantes (Oliveira e Wright, 1998; Oliveira et al., 1999; Chew et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Harvey et al., 2003; Ferreira e Martins, 2008; Mazzuchelli e Martins, 2009; Teixeira et al., *in press*) e seqüências inseridas em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) (Cnaani et al., 2008; Ferreira e Martins, 2008). O mapeamento cromossômico destas seqüências tem contribuído para um melhor conhecimento do genoma de algumas espécies, além da sua aplicação como marcadores em estudos de evolução cromossômica.

Marcadores citogenéticos e genéticos baseados no DNA têm sido desenvolvidos para emprego na aqüicultura com o objetivo de melhorar traços importantes dos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. Diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados para construção de mapas genéticos, que podem fornecer benefícios particulares para a aqüicultura, especialmente para identificação de estoques, análise de características quantitativas, cruzamentos seletivos e acesso à variabilidade genética das populações. Os mapas genéticos são de grande importância também para estudos comportamentais, morfológicos, filogeográficos e evolutivos, entre outros (Martins et al., 2004; Cnaani e Hulata, 2008).

Atualmente, os mapas genéticos podem ser construídos de três maneiras: (1) mapeamento físico citogenético, que localiza segmentos de DNA nos cromossomos das espécies por metodologias citogenéticas; (2) mapas genéticos de ligação, que se destinam a ordenar os marcadores moleculares nos cromossomos baseando-se na freqüência de recombinação entre os locos gênicos; e (3) o último tipo de mapa que é o seqüenciamento completo de nucleotídeos do genoma de uma espécie (Martins et al., 2004).

A maioria dos estudos que visam a construção de bibliotecas genômicas para o mapeamento genético e físico de espécies de ciclídeos está voltada para as espécies africanas, como por exemplo, *Oreochromis niloticus* (Katagiri et al., 2001), *Haplochromis chilotes* (Watanabe et al., 2003) e *Metriaclima zebra* (DiPalma et al., 2007). Somente seis espécies, todas do grupo africano, possuem projetos de seqüenciamento de genoma mitocondrial ou nuclear em andamento (NCBI – National Center for Biotechnology Information; Cichlid Genome Consortium).

Para *O. niloticus*, já existem descritos na literatura dois mapas genéticos de ligação construído a partir de microssatélites, AFLPs (Anonymous Fragment Length Polymorphisms) e seqüências gênicas, (Kocher et al., 1998; Lee et al., 2005) e um primeiro mapa cromossômico que reúne as seqüências repetitivas já isoladas do genoma de tilápia do Nilo e mapeadas nos seus cromossomos (Martins et al., 2004). Além disso, um mapa físico de restrição enzimática de biblioteca genômica de BACs encontra-se disponível para esta espécie (Katagiri et al., 2005).

Os mapas genéticos representam o ponto de partida para identificação de QTLs (Quantitative Trait Loci) em diferentes linhagens de tilápia, os quais poderiam ser combinados para produzirem um peixe melhor comercialmente. Além disso, o mapa genético em tilápia poderia permitir a identificação de QTLs de características associadas com a especiação e radiação adaptativa destes peixes (Kocher et al., 1998). Um mapa cromossômico que reúna um número acentuado de marcadores poderá representar uma ferramenta poderosa para detectar rearranjos cromossômicos na tilápia do Nilo e espécies relacionadas. Porém, a função principal do mapa cromossômico é ancorar o mapa genético de ligação e o mapa físico de BACs, unindo dados genéticos e físicos do genoma, o que permitirá o desenvolvimento de ferramentas e estratégias para investigar uma série de

questões, tais como a evolução do genoma, filogeografia, determinação sexual e genes envolvidos na diversidade morfológica e de comportamento não só de tilápia como das diferentes espécies de ciclídeos (Martins et al., 2004). Porém, em relação aos ciclídeos sul-americanos, não existe nenhum tipo de mapeamento genômico que envolva dados cromossômicos e/ou moleculares, sendo a maioria das informações genéticas existentes para este grupo, relacionada a dados cariotípicos, localização de poucas seqüências repetitivas e análises da filogenia das espécies (Feldberg et al., 2003; Kullander, 1998; Smith et al., 2008; Teixeira et al., *in press*, entre outros).

### **1.3. Mapeamento cromossômico e seqüências repetitivas de DNA**

Os primeiros estudos com genomas completamente seqüenciados foram focados nas seqüências de cópia única ou com pequeno número de cópias e pouca atenção foi dada aos DNAs repetitivos e segmentos duplicados. Na maioria dos organismos, as seqüências repetitivas compreendem uma grande porção do genoma. Em cebola elas representam 95% do genoma (Flavell et al., 1974) e em humanos 50% ou mais do genoma (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). A diferença na quantidade de seqüências repetitivas dentro de diferentes espécies de eucariotos parece ser um dos fatores responsáveis pela variação no tamanho do genoma (Kidwell, 2002).

Os DNAs repetitivos incluem as seqüências organizadas em cadeia como as seqüências satélites, minissatélites e microssatélites e as seqüências dispersas como os transposons (que se transpõem através da excisão de sua seqüência de DNA e inserção em outra região) e retrotransposons, que se inserem em outras regiões do genoma através da cópia de sua seqüência através de um intermediário

de RNA (Charlesworth et al., 1994). Além dessas classes, há também as famílias multigênicas compostas por centenas ou milhares de cópias de seqüências que codificam importantes moléculas, por exemplo, os RNAs ribossômicos (RNAr) e as histonas (Martins et al., 2004)

Ainda não se sabe ao certo qual a função das seqüências repetitivas não-codificantes, as quais foram consideradas por muitos anos como DNA “egoísta” (Doolittle e Sapienza, 1980; Orgel e Crick, 1980) ou como DNA “lixo” (Nowak, 1994). Por outro lado, alguns trabalhos têm sugerido o envolvimento de retrotransposons em algumas doenças (Biémont e Vieira, 2006); na regulação e reparo de alguns genes (Medstrand et al., 2005; Shapiro e Sternberg, 2005), assim como na diferenciação de cromossomos sexuais (Harvey et al., 2002; Steinemann e Steinemann, 2005). Recentemente, tem sido demonstrado que tanto as seqüências repetidas em tandem quanto dispersas podem ser extremamente importantes na organização estrutural e funcional dos genomas (Schueler et al., 2001). Porém, uma das funções mais significativa destas seqüências parece estar relacionada aos segmentos repetitivos dos centrômeros, telômeros e outras regiões heterocromáticas dos cromossomos dos eucariotos (Shapiro e Sternberg, 2005)

Os minissatélites e microssatélites, organizados em pequenos arranjos, são altamente variáveis dentro de uma população e geralmente estão localizados em regiões eucromáticas. Já as seqüências de DNA satélite localizam-se principalmente em regiões heterocromáticas, nos centrômeros e em regiões terminais dos cromossomos de diferentes organismos (Ramel, 1997; Plohl et al., 2008). A presença de pelo menos uma família de DNA satélite no centrômero de vários eucariotos indica que estas seqüências podem desempenhar um papel importante na organização cromossômica e na correta segregação dos mesmos durante o

processo de divisão celular (Plohl et al., 2008). Muitos DNAs satélites centroméricos, tanto em plantas quanto em animais, possuem um comprimento de cerca 150-180 pares de bases (pb) e estão organizados em arranjos com centenas de cópias. Estas duas características parecem ideais para um centrômero funcional, uma vez que a seqüência necessária para a formação dos nucleossomos corresponde ao tamanho de uma repetição e o comprimento mínimo para um centrômero funcional corresponde a centenas de repetições de um DNA satélite (Henikoff et al., 2001).

A distribuição de elementos transponíveis dentro de regiões heterocromáticas e/ou eucromáticas é bastante variável entre as espécies. Nos genomas humano e de rato esta distribuição é relativamente uniforme na eucromatina e heterocromatina. Porém, em alguns organismos os transposons e retrotransposons tendem a se acumular em regiões terminais, pericentroméricas e em outras regiões heterocromáticas, onde a taxa de recombinação é reduzida. Uma alta taxa de recombinação parece estar negativamente correlacionada com a distribuição de elementos transponíveis (Kidwell, 2005).

Na maioria dos genomas seqüenciados até o momento, as regiões ricas em elementos repetitivos permanecem como *gaps* por causa da dificuldade em determinar a correta posição e número de cópias das seqüências repetitivas presentes nestas regiões, como no caso dos centrômeros (Dunham et al., 1999; Plohl et al., 2008). A integração dos dados sobre seqüenciamento completo do genoma e mapeamento cromossômico, principalmente das seqüências repetitivas, pode promover um incremento no conhecimento desses genomas.

Embora nas duas últimas décadas estudos citogenéticos tenham sido realizados em um grande número de espécies de peixes, tais análises foram principalmente direcionadas para o conhecimento básico da estrutura cariotípica e

poucos trabalhos foram realizados visando a caracterização e mapeamento cromossômico pela citogenética molecular.

Em ciclídeos, a espécie *Oreochromis niloticus* é a que mais tem recebido atenção dos pesquisadores em relação à organização e localização de seqüências de DNA nos seus cromossomos (Martins, 2007; Cnaani et al., 2008). Dados sobre mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas de DNA foram reunidos por Martins et al., (2004) em uma primeira tentativa em construir um mapa físico para esta espécie. Em relação aos outros ciclídeos são poucas as informações disponíveis.

Estudos das seqüências repetitivas de DNA são úteis para o esclarecimento de uma miríade de questões, incluindo estrutura centromérica e telomérica, origem e evolução de cromossomos sexuais e cromossomos B e evolução do genoma como um todo. As seqüências repetitivas de DNA podem ser úteis também no mapeamento físico do genoma, contribuindo para o desenvolvimento de marcadores genéticos de importância significativa na biologia básica e aplicada das espécies (Martins et al., 2004). Uma vez que as espécies de ciclídeos possuem uma grande importância biológica e econômica, torna-se de grande valia os estudos que visam um melhor conhecimento do seu genoma. A análise cromossômica comparativa entre ciclídeos africanos e sul-americanos mostra-se promissora no fornecimento de respostas sobre diversas questões que norteiam a intrigante história evolutiva dos ciclídeos. A construção e integração de mapas físicos e genéticos representam a melhor estratégia para o entendimento da estrutura e evolução do genoma destas espécies.



## 2. OBJETIVOS

Devido a importância científica e econômica dos ciclídeos africanos, a escassez de informações para os ciclídeos sul-americanos e a diversidade cariotípica encontrada nas diferentes espécies já estudadas, tornam-se necessários estudos que visam um melhor entendimento do genoma destas espécies. Dessa forma este trabalho teve por objetivos:

- Identificar e isolar famílias repetitivas de DNA do genoma de *Oreochromis niloticus*, conhecidamente conservadas em peixes e vertebrados.
- Mapear as seqüências repetitivas conservadas nos cromossomos de *Oreochromis niloticus*, de outras espécies africanas, e em espécies representantes das tribos da subfamília Cichlinae, pela técnica de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization).
- Construir um mapa cromossômico comparativo para espécies de ciclídeos africanas e sul-americanas, pelos padrões de hibridação cromossômica de famílias de sequências repetitivas isoladas, para se identificar os possíveis mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica das espécies.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Espécies utilizadas

Para a realização do presente trabalho foram utilizados ciclídeos da subfamília Pseudocrenilabrinae (grupo africano) e Cichlinae (grupo da Região Neotropical) (Tabela 1) (permissão para coleta, SISBIO/15729-1). As preparações cromossômicas utilizadas para o mapeamento de seqüências repetitivas conservadas entre os diferentes grupos foram obtidas de exemplares de diferentes localidades, como mostra a Tabela 1. Os exemplares foram fixados em formol 4% e conservados em álcool 70% para armazenamento no laboratório.

Tabela 1: Relação das espécies utilizadas no presente trabalho e seus locais de origem.

Espécies analisadas	Local de Coleta
<b>Ciclídeos sul-americanos</b>	
<i>Chaetobranchius flavescens</i>	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Córrego Jacutinga, Bofete, SP
<i>Heros efasciatus</i>	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT
<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT
<b>Ciclídeos africanos</b>	
<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio Tietê, Botucatu/SP. Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Oreochromis aureus</i>	Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Oreochromis karongae</i>	Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Oreochromis mortimeri</i>	Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Tilapia rendalli</i>	Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Tilapia zilli</i>	Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling/Escócia.
<i>Tilapia mariae</i>	Tropical Aquaculture Facility, University of Maryland, USA
<i>Astatotilapia burtoni</i>	Tropical Aquaculture Facility, University of Maryland, USA
<i>Haplochromis obliquidens</i>	Loja de Aquário, Botucatu/SP.
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	Loja de Aquário, Botucatu/SP.
<i>Labeotropheus trewavasae</i>	Loja de Aquário, Botucatu/SP.
<i>Melanochromis auratus</i>	Loja de Aquário, Botucatu/SP.

## **3.2. Metodologia**

### **3.2.1. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos**

A extração de DNA de tecidos fixados em etanol seguiu basicamente o protocolo apresentado por Sambrook e Russel (2001) que consiste nos seguintes passos:

- a) em um cadinho, colocar o tecido fixado e uma pequena quantidade de nitrogênio líquido, macerando o material o máximo possível;
- b) acrescentar 5 ml da solução de digestão (NaCl 0,4 M; EDTA 0,1 M pH 8,0; Proteinase K 100 µg/ml e SDS 0,1 %);
- c) após homogeneização na solução de digestão, passar o material para tubos Falcon de 15 ml (manter as tampas semi-abertas) e levar ao banho-maria a 50 °C por 4 horas, homogeneizando o material periodicamente;
- d) acrescentar a cada tubo um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) igual ao da solução homogeneizada. Fechar bem os tubos e agitar suavemente por 30 minutos;
- e) centrifugar o material a 5.000 rpm por 10 minutos e passar o sobrenadante para um tubo limpo;
- f) acrescentar NaCl para uma concentração final de 1 M e 2 volumes de etanol (100 %) gelado e inverter suavemente o tubo para que o DNA precipite;
- g) centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar álcool etílico 70 % (3 ml);
- h) centrifugar novamente a 5.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e secar o DNA em estufa a 37 °C;

- i) eluir o DNA em TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e tratar a amostra com RNase (100 mg/ml) a 37 °C por 1 hora;
- j) reextrair o DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e precipitar em NaCl e álcool como já realizado anteriormente. Secar e ressuspender em TE como descrito anteriormente.

Para verificar a qualidade do DNA extraído dos tecidos, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 %, preparado em solução de TAE 1× (Tris-acetato-EDTA). Para a análise da concentração do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

### **3.2.2. Isolamento de elementos transponíveis através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Para amplificação de elementos transponíveis já identificados e caracterizados como conservados em outras espécies de peixes, foram utilizados os primers de *Rex1* (RTX1-F1 5' TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC e RTX1-R3 5' TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC) (Volf et al. 2000), *Rex3* (RTX3-F3 5' CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG e RTX3-R3 5' TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volf et al. 1999, 2001a) e *Rex6* (6-Medf1 5' TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC e Rex6-Medr1 5' GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG) (Volf et al. 2001b).

A amplificação dos elementos transponíveis foi realizada de acordo com o procedimento abaixo:

- a) colocar em tubo do tipo eppendorf, para cada amostra a ser amplificada, os seguintes componentes:
  - 100-200 ng de DNA genômico;

- 0,5 µl de dNTPs (8 mM);
  - 0,5 µl de cada primer (10 µM);
  - 2,5 µl de tampão 10x;
  - 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
  - 0,1 µl de DNA polimerase (5U/µl);
  - água ultra-pura estéril q.s.p. 25 µl.
- b) Agitar levemente a reação, centrifugar rapidamente e colocar no Termociclador.

*Ciclos da reação:*

- aquecimento inicial com temperatura de 95 °C (5 min)
  - desnaturação com temperatura de 95 °C (40 s)
  - anelamento com temperatura de 55 °C (40 s)
  - elongação com temperatura de 72 °C (2 min)
  - extensão final de 72 °C (5 min)
- 34 ciclos

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1 %, sendo que alguns fragmentos foram seqüenciados em um aparelho ABI prism 377, para confirmação das seqüências amplificadas.

### **3.2.3. Identificação de BACs ricos em seqüências repetitivas**

Katagiri et al., (2005) construíram um mapa físico a partir de restrição enzimática de uma biblioteca em BACs contendo 35.000 clones (que cobre 5x o genoma) do genoma da tilápia do Nilo (Katagiri et al., 2001). Este banco de dados está disponível no site <http://hcgs.unh.edu> do Hubbard Center for Genome Studies (HCGS) da University of New Hampshire, USA. Este mapa físico permitiu ordenar os milhares de clones da biblioteca em grupos que representam grandes segmentos

contínuos do genoma (*contigs*). Através do banco de dados deste mapa físico foi possível verificar a sobreposição de muitos BACs em alguns dos *contigs* formados. A explicação para esta sobreposição está na presença de seqüências repetitivas nestes BACs. Entre diversos BACs candidatos a conterem seqüências repetitivas, 18 deles foram doados pelo HCGS, através do pesquisador Thomas Kocher, ao Laboratório de Genômica Integrativa. Esses clones pertencem a três *contigs*, denominados C2, C4 e C5. Experimentos de *dot blot* e hibridação possibilitaram checar que a maioria dos BACs realmente contém seqüências repetitivas de DNA. Dentre os 18 BACs selecionados, dois clones, hibridados previamente nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (Ferreira e Martins, 2008), foram selecionados para mapeamento cromossômico comparativo em outras espécies de ciclídeos africanos e em espécies americanas.

#### **3.2.4. Isolamento e purificação de BACs e plasmídeos**

O isolamento dos BACs e plasmídeos, contendo seqüências repetitivas do genoma da tilápia do Nilo, foi realizado de acordo com a técnica descrita em Sambrook e Russel (2001), conforme detalhado abaixo.

- a) inocular os clones de BACs ou plasmídeos em meio LB (peptona 1 %/NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5 %, pH 7,5) líquido, contendo respectivamente cloranfenicol (1 µl – 20 mg/ml- para 1 ml de meio líquido) ou ampicilina (2 µl – 50 mg/ml- para 1 ml de meio líquido), deixar crescer durante toda a noite (cerca de 14 horas) a 37 °C sob agitação constante a 250 rpm;
- b) após este tempo, passar o material para um tubo do tipo eppendorf e centrifugar a 3.000 rpm por 10 minutos a 4 °C;

- c) descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 100 µl de solução 1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0 e 10 µg/ml de RNase);

OBS.: O próximo passo não pode passar de 5 minutos, ou o DNA iniciará processo de desnaturação;

- d) adicionar 110 µl da solução 2 (SDS 1 % e 200 mM NaOH); cuidadosamente rotacionar os tubos em um ângulo de 80° exatamente 20 vezes, acrescentando em seguida 110 µL da solução 3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,5);
- e) rotacionar completamente os tubos (em um ângulo de 360°) 15 vezes, não agitar; centrifugar rapidamente e deixar a 4 °C por 10 minutos;
- f) centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos;
- g) passar o líquido para um novo tubo, evitando o precipitado, e adicionar 2 volumes de etanol 100 % gelado;
- h) inverter os tubos 20 vezes e colocar no freezer com temperatura a 70 °C negativos por 1 hora;
- i) centrifugar a 6.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando-se em seguida o sobrenadante;
- j) adicionar 200 µl de etanol 70 % e centrifugar a 6.000 rpm por 3 minutos a 4 °C;
- k) descartar o sobrenadante e colocar os tubos para secarem a temperatura de 42 °C por aproximadamente 15 minutos, ressuspensando em seguida em 30 µl de água ultra-pura estéril e estocar no freezer.

Para verificar a qualidade dos clones purificados contendo as seqüências repetitivas, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 %, preparado em solução de TAE 1× (Tris-acetato-EDTA). Para a análise da concentração do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

### 3.2.5. Isolamento de seqüências repetitivas através da técnica de $C_0t-1$ DNA

Os procedimentos utilizados nesta técnica de  $C_0t-1$  DNA (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas), estão baseados na cinética de reassociação do DNA (Zwick et al., 1997; Ferreira e Martins, 2008). O procedimento consiste basicamente em:

- a) diluir o DNA genômico a 100-500 ng/ $\mu$ l em 0,3 M NaCl;
- b) colocar 500  $\mu$ l de DNA em tubos de 1,5 ml;
- c) autoclavar por 30 minutos a 1.4 atm/120 °C;
- d) aplicar 3  $\mu$ l do DNA autoclavado em gel de agarose 1 % para checar o tamanho dos fragmentos obtidos (ideal obter fragmentos entre 100 e 1.000 pb);
- e) desnaturar 3 alíquotas (tubos 0, 1 e 5) com 50  $\mu$ l do DNA autoclavado em banho a 95 °C por 10 minutos;
- f) passar os tubos para gelo por 10 segundos: tratar imediatamente o tubo 0 com S1 nuclease e colocar os tubos 1 e 5 em banho a 65 °C para renaturação;
- g) após 1 minuto, retirar o tubo 1 e tratar com S1 nuclease e após 5 minutos, retirar o tubo 5 e tratar com S1 nuclease;
- h) para o tratamento com S1 nuclease, utilizar 1U da enzima para 1  $\mu$ g de DNA e 5,5  $\mu$ l tampão 10 $\times$  para o volume final de 50  $\mu$ l. Incubar a 37 °C por 8 minutos;
- i) congelar imediatamente em nitrogênio líquido;
- j) adicionar igual volume de fenol/clorofórmio (1:1);
- k) centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm. Coletar a fase aquosa e passar para um tubo novo;
- l) precipitar o DNA com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;
- m) deixar no freezer a 75 °C negativos por 30 minutos;



- n) centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4 °C. Secar e ressuspender em 50 µl de água ultra-pura estéril autoclavada;
- o) checar o DNA em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x.

### 3.2.6. Transferência de BACs para membranas de nylon – Dot blotting

Os 18 BACs selecionados inicialmente para hibridação cromossômica em *Oreochromis niloticus* (Ferreira e Martins, 2008) foram fixados em uma membrana de nylon e hibridados com o *C<sub>o</sub>t-1* DNA de uma espécie de ciclídeo sul-americano (*Geophagus brasiliensis*), para uma busca de clones contendo seqüências repetitivas conservadas no genoma de espécies sul-americanas.

Após a purificação dos clones, estes foram transferidos para uma membrana de nylon para hibridação utilizando-se como sonda DNA repetitivo de *G. brasiliensis*.

O procedimento de *Dot blotting* consiste dos seguintes passos:

- a) marcar em uma membrana de nylon as posições onde serão colocadas as amostras para hibridação;
- b) umedecer a membrana em 2x SSC e transferir para um suporte forrado com filme plástico;
- c) aplicar 1 µl da amostra de DNA (100 ng/µl) de forma que sua orientação na membrana fique conhecida;
- d) transferir a membrana para um suporte contendo papel de filtro saturado de NaOH 0,5 M para desnaturação por 2 minutos;
- e) lavar em 5x SSC por 1 minuto e fixar a 80 °C por 1 hora e 40 minutos.

A hibridação foi realizada como descrito no item abaixo.

### 3.2.7. Hibridação de DNA imobilizado em membranas

Para marcação da sonda, hibridação e detecção quimioluminescente foi utilizado o *kit ECL direct nucleic acid labelling and detection system* (Amersham Life Science), seguindo as recomendações do fabricante:

- a) colocar a membrana contendo o DNA imobilizado em uma solução de pré-hibridação (NaCl 0,5 M, agente de bloqueio 5 % e tampão de hibridação) a 42 °C com leve agitação por 1 hora;
- b) desnaturar 300 ng do DNA a ser utilizado como sonda a 95 °C por 5 minutos (geralmente em uma concentração de 10 ng/μl), e colocar no gelo por 5 minutos;
- c) adicionar igual volume do reagente de marcação e glutaraldeído (ambos do Kit) ao DNA sonda desnaturado, misturar brevemente, centrifugar rapidamente e incubar a 37 °C por 20 minutos;
- d) adicionar a sonda marcada ao tampão de hibridação (evitar colocar a sonda sobre a membrana) e deixar hibridando durante a noite com agitação;
- e) lavar a membrana em 100 ml tampão de lavagem primário (uréia 6 M/SDS 0,4 %/0,5× SSC) a 42 °C por 20 minutos e mais 2 vezes por 10 minutos cada, com agitação;
- f) em seguida, lavar em 2× SSC por 2 vezes (5 minutos cada). Escorrer a membrana e passar para uma cuba limpa;
- g) misturar igual volume (3 ml) de reagente de detecção 1 e 2, despejar sobre a face da membrana que contém o DNA fixado e fazer movimentos com a cuba durante 1 minuto para que a solução de detecção atinja toda a membrana;
- h) escorrer e envolver em filme PVC e expor ao filme de raio-X por 30 minutos;
- i) revelar e fixar o filme.

### **3.2.7. Obtenção dos cromossomos mitóticos através de preparações diretas**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a metodologia adaptada para peixes por Bertollo et al., (1978), descrita a seguir:

- a) injetar intraperitonealmente colchicina 0,025 % na proporção de 0,1 ml para cada 100g de peso do animal;
- b) deixar o peixe em aquário bem aerado por 40 minutos. Em seguida sacrificá-lo e retirar a porção anterior do rim transferindo-a para uma solução hipotônica de KCl 0,075 M (6-8 ml);
- c) dissociar bem o tecido com o auxílio de uma seringa de vidro, sem agulha. Retirar o sobrenadante (suspensão celular) com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocar em tubo de centrífuga;
- d) incubar a suspensão celular obtida em estufa a 37 °C por 23 minutos;
- e) pré-fixar com 6 gotas de metanol:ácido acético (3:1) e ressuspender o material pipetando bem devagar por 100 vezes;
- f) deixar descansar por 5 minutos, adicionar fixador (6-8 ml, o mesmo volume da solução no tubo de centrífuga) e ressuspender;
- g) centrifugar por 10 minutos a 900 rpm. Desprezar o sobrenadante e completar para 6 ml com fixador pipetando por mais 100 vezes;
- h) centrifugar por 10 minutos a 1.000 rpm, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 6 ml de fixador, repetindo essa lavagem por mais duas vezes;
- i) após a última lavagem, diluir o material acrescentando fixador (geralmente 0,5-1,0 ml), de forma que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada; após esta etapa o material pode se armazenado em tubos do tipo Ependorf e estocados em freezer a 20 °C negativos, ou fixado em lâminas;

- j) em lâminas previamente aquecidas em banho-maria a 60 °C pingar uma ou duas gotas do material por lâmina.

### 3.2.9. Hibridação *in situ* por fluorescência – FISH

#### *Sondas*

Foram utilizados como sondas nos experimentos de FISH clones contendo seqüências de DNA satélite isolado previamente através da técnica de *C<sub>0</sub>t-1* DNA (Ferreira e Martins, 2008); clones plasmidiais contendo o elemento transponível *ROn-1* (Bryden et al., 1998); produtos de PCR dos elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*. Além disto, foram também utilizados como sondas BACs contendo seqüências repetitivas do genoma da tilápia do Nilo (Katagiri et al. 2001; Ferreira e Martins, 2008).

Todas as seqüências foram marcadas com biotina por *nick translation* de acordo com instruções do fabricante (*BioNick labelling system*, Invitrogen), e a hibridação cromossômica das mesmas, nas diferentes espécies de ciclídeos, seguiu-se o protocolo descrito em Pinkel et al., (1986) com modificações apresentadas por Martins e Galetti (2001).

#### *Marcação da sonda*

A sonda foi marcada pelo método de *nick translation* utilizando o Kit *BioNick<sup>TM</sup> Labeling System* (Invitrogen).

- a) Preparar um mix contendo:
- 1 µl 10× dNTP mix;
  - 1 µl do DNA sonda (200 ng/µl);
  - 1 µl do mix de enzima;

- 6 µl de água ultra-pura estéril.
- b) Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar a 16 °C por duas horas;
- c) adicionar 1 µl de stop buffer, 1 µl de acetato de sódio 3 M e 22 µl de etanol 100 % gelado;
- d) misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer a 70 °C negativos por 1 hora;
- e) centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4 °C;
- f) Descartar o sobrenadante e adicionar 50 µl de etanol 70 % gelado;
- g) centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4 °C;
- h) descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
- i) ressuspender em 6 µl de água ultra-pura estéril.

#### *Tratamento das lâminas*

As lâminas podem ser preparadas com os cromossomos com um dia de antecedência ou no momento do uso. Para cada lâmina:

- a) colocar 100 µl de RNase 40 µg/ml (0,4 µl de RNase 10 mg/ml e 99,6 µl de 2× SSC) sobre a lamínula, aderir a lâmina sobre esta lamínula e deixar em câmara úmida (umidecida com 2× SSC) a 37 °C por 1 hora e 30 minutos;
- b) lavar a lâmina duas vezes em 2× SSC durante 10 minutos cada;
- c) desidratá-las em série alcoólica 70 %, 85 % e 100 % gelado durante 10 minutos cada;
- d) mergulhar a lâmina em formamida 70 % em 2× SSC por 4 minutos a 70 °C (guardar a formamida para reutilizá-la no dia seguinte);
- e) desidratar em série alcoólica 70 %, 85 % e 100 % a 20 °C negativos por 5 minutos cada (este passo é muito importante, pois as lâminas devem ser passadas rapidamente da formamida para o álcool). Deixar secar ao ar.

### *Solução de hibridação*

Em um tubo do tipo eppendorf contendo 6 µl da sonda adicionar 15 µl de formamida (concentração final 50 %), 6 µl de sulfato de dextrano 50 % (concentração final 10 %) e 3 µl de 20x SSC (concentração final de 2x SSC). Desnaturar a sonda a 95 °C por 10 minutos e passar imediatamente ao gelo.

### *Hibridação*

Colocar 30 µl de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2x SSC) a 37 °C *overnight*.

### *Lavagens*

Lavar em 2x SSC em temperatura ambiente apenas para tirar a lamínula e escorrer bem a lâmina sem deixar secar. Deste momento em diante as lâminas não podem secar:

- a) lavar em formamida 50 %/2x SSC por 15 minutos a 37 °C (utilizar a mesma solução do dia anterior – formamida 70 % e transformá-la para 50 %);
- b) lavar em 2x SSC por 15 minutos a 37 °C por uma vez;
- c) lavar em 2x SSC por 15 minutos à temperatura ambiente;
- d) lavar em 4x SSC à temperatura ambiente (só para enxaguar).

### *Detecção e amplificação do sinal da sonda*

- a) Sobre uma lamínula colocar 0,1 µl de avidina-FITC 0,07 % (Sigma®) em 70 µl de tampão C (0,1 M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15 M de NaCl);

- b) inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 1 hora em câmara úmida com 2x SSC a 37 °C;
- c) após este tempo, lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos cada, com agitação, em tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 1,26 %/citrato de sódio 0,018 %/Triton 0,0386 % em água destilada pH 8,0 e leite em pó desnatado 1 %) recém-preparado a 42 °C. Escorrer a lâmina e secá-la por baixo;
- d) sobre uma lamínula colocar 80 µl de anti-avidina biotina-conjugada 2,5 % (Sigma®) (2 µl de anti-avidina estoque em 78 µl de tampão de bloqueio), inverter a lâmina sobre a lamínula e deixar em câmara úmida com 2x SSC a 37 °C por 30 minutos;
- e) novamente lavar em tampão de bloqueio três vezes por 5 minutos cada, com agitação a 42 °C;
- f) repetir os passos de (a) até (e);
- g) aplicar novamente o FITC e fazer as lavagens como descrito no passo (e);
- h) lavar em 4x SSC/Triton 2 % duas vezes por 3 minutos cada com agitação;
- i) lavar em 4x SSC/Triton 0,2 % duas vezes por 3 minutos cada com agitação;
- j) escorrer as lâminas e deixar secando ao ar.

#### *Montagem das lâminas*

Secar a lâmina e montar com iodeto de propídio na proporção de 20 µl de meio de montagem *antifading* com 0,7 µl de solução de iodeto de propídio a 50 µg/ml.

### *Processamento das imagens*

Os cromossomos metafásicos foram analisados em um fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX 61. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital (Olympus DP70) e do programa Image-Pro MC 6.0 e processadas através do programa Adobe Photoshop 7.0. Os cariótipos foram organizados utilizando-se o programa Adobe Photoshop 7.0.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento e mapeamento cromossômico de retrotransposons *Rex*

Os elementos transponíveis compreendem grandes porções do genoma da maioria dos organismos. Em humanos, por exemplo, 40% do genoma é constituído de somente um tipo de seqüências repetidas de DNA, os transposons (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Estes elementos são fontes de mutações e doenças genéticas causadas pelos vários tipos de rearranjos originados de sua transposição e recombinação dentro do genoma. Por este motivo, os elementos transponíveis são também considerados como um reservatório dinâmico de seqüências responsáveis pela evolução estrutural e funcional de muitos genes. Além disso, os elementos móveis desempenham outras funções importantes, como na regulação epigenética recrutando fatores de remodelamento da cromatina, e na estrutura do cromossomo (Böhne et al., 2008).

Os elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* (Retroelementos caracterizados pela primeira vez no genoma do peixe *Xiphophorus*, número 1, 3 e 6) estão presentes no genoma de diferentes espécies de peixes teleósteos, os quais foram ativos durante a evolução do genoma destes peixes e sofreram várias retrotransposições, algumas delas sendo relativamente recentes (Voff et al., 2000, 2001b; Fischer et al., 2004; Ozouf-Costaz et al., 2004). Algumas cópias de *Rex3* estão associadas a regiões codificantes, o que poderia ser um fator importante para a evolução do genoma em teleósteos, uma vez que estas cópias podem modificar os níveis de expressão gênica ou especificidade dos genes vizinhos a estas cópias (Voff et al., 1999). O retrotransposon *Rex6* possui um alto nível de identidade inter-

elemento dentro de algumas espécies de teleósteos sugerindo uma atividade relativamente recente deste elemento no genoma dos peixes (Volf et al., 2001b).

No presente trabalho seqüências parciais do gene da transcriptase reversa dos retrotransposons *Rex1* e *Rex3* (Volf et al., 1999, 2000), e uma seqüência da região C-terminal da endonuclease do elemento *Rex6* (Volf et al., 2001b) foram isoladas, através da técnica de PCR, do genoma de espécies de ciclídeos africanos (subfamília Pseudocrenilabrinae) e ciclídeos sul-americanos (Cichlinae) (Tabela 2). A amplificação dos retroelementos demonstrou bandas entre 400 e 600 pb para os três elementos transponíveis amplificados nas diferentes espécies. Os produtos de PCR de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* das espécies listadas na Tabela 2, foram utilizados como sondas para mapeamento nos cromossomos das respectivas espécies (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Tabela 2: Espécies de ciclídeos utilizadas para amplificação e mapeamento cromossômico das seqüências dos retroelementos *Rex*.

<b>Espécies</b>	<b>Seqüências utilizadas para hibridação</b>		
<b>Subfamília Pseudocrenilabrinae</b>			
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>
<i>Haplochromis obliquidens</i>	<i>Rex1</i>	-	-
<i>Melanochromis auratus</i>	<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>
<b>Subfamília Cichlinae</b>			
<i>Heros efasciatus</i>	<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>
<i>Chaetobranchus flavescens</i>	<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>
<i>Satanoperca jurupari</i>	<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>

Em *Oreochromis niloticus*, as três seqüências mostraram sinais de hibridação nos centrômeros de poucos cromossomos, e nas regiões pericentromérica, telomérica, e intersticial no braço longo do par cromossômico maior (Figuras 4a, b e

c). Em *Hemichromis bimaculatus*, *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* e nas espécies de ciclídeos sul-americanos, subfamília Cichlinae, todos os elementos transponíveis mapeados mostraram localização na região centromérica, além de sinais fracos em algumas regiões intersticiais das espécies *Chaetobranchus flavescens* e *Satanoperca jurupari* (Figuras 5, 6 e 7).

Nas espécies *H. bimaculatus* e *M. auratus* o elemento *Rex3* apresentou sinais mais fracos quando comparado a *Rex1* e *Rex6*, o que pode ter ocorrido devido ao menor número de cópias deste DNA repetitivo presente no genoma destas espécies (Figuras 4d, e, f, g, h, i). Já nas espécies *Chaetobranchus flavescens* e *Satanoperca jurupari*, este mesmo elemento mostrou sinais mais intensos do que *Rex1* e *Rex6* (Figuras 5, 6 e 7). Por outro lado, em *Heros efasciatus*, *Rex6* mostrou sinais mais intensos quando comparado com as outras espécies americanas (Figura 7c), mostrando que este elemento pode possuir um maior número de cópias nesta espécie.

Dentro do grupo dos africanos, a tilápia do Nilo foi a única espécie que apresentou um padrão de distribuição disperso dos elementos transponíveis *Rex* (Figuras 4a, b, c). Torna-se interessante observar, que esta espécie apresenta na região centromérica outro tipo de seqüência repetitiva, o DNA satélite SATA (Ferreira e Martins, 2008 e Figura 8a), que também está presente nos centrômeros das espécies *Haplochromis obliquidens* e *Melanochromis auratus* (Figuras 8g, h), porém em menor intensidade que as espécies de *Oreochromis*, e não está presente em *Hemichromis bimaculatus*. Isto poderia indicar um acúmulo preferencial de um tipo de seqüência repetitiva na região do centrômero ou a compartimentalização destas seqüências dentro desta região, já que as espécies que apresentam um acúmulo do DNA satélite na região centromérica não apresentam sinais tão intensos de

hibridação dos elementos transponíveis *Rex*. A heterocromatina centromérica possivelmente serve como um refúgio para o acúmulo de elementos repetitivos, pois a presença dos mesmos nesta região pode representar um efeito não deletério para o hospedeiro (Burt e Trivers, 2006). Na planta *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado que elementos transponíveis e seqüências repetidas em tandem, em regiões heterocromáticas, são os responsáveis pelo recrutamento de proteínas responsáveis pela formação da heterocromatina, mostrando o papel destas seqüências em determinadas regiões do genoma (Lippman et al., 2004).

O padrão de hibridação disperso dos elementos transponíveis *Rex* observados em *Oreochromis niloticus* são semelhantes aos obtidos para estes mesmos elementos em *Cichla kelberi* (Teixeira et al., *in press*), *Tetraodon nigroviridis* (Fischer et al., 2004) e peixes antárticos da subordem Notothenioidei (Ozouf-Costaz et al., 2004). Na espécie *Chionodraco hamatus*, o retrotransposon *Rex3* localizou-se também no braço longo do cromossomo Y, o que poderia corresponder ao braço curto de um dos autossomos envolvidos na fusão que originou este cromossomo (Ozouf-Costaz et al., 2004). Segundo os mesmos autores, isto poderia indicar que o acúmulo de elementos transponíveis já existia nos autossomos antes da fusão ter ocorrido. Este fato mostra que estes transposons poderiam estar influenciando na diferenciação molecular dos cromossomos sexuais da espécie de peixe *C. hamatus* (Ozouf-Costaz et al., 2004). Em *O. niloticus* também se observou um acúmulo destes elementos no par maior, que se originou por possíveis fusões cromossômicas (Chew et al., 2002), indicando que estes elementos, assim como observado em *C. hamatus*, poderiam estar presentes nos autossomos que deram origem ao par maior.

Por outro lado, estudos meióticos realizados em *O. niloticus* identificaram o par cromossômico maior como sendo o possível par sexual desta espécie (Foresti et al., 1993; Carrasco et al., 1999), que possui um sistema sexual do tipo XY. Em um trabalho mais recente, este sistema sexual foi confirmado, porém as seqüências gênicas determinantes do sexo parecem estar presentes em outro par cromossômico (Cnaani et al., 2008). Por outro lado, seqüências de determinação de sexo mapearam no par de maior tamanho de *Oreochromis aureus*, que possui um sistema sexual do tipo ZW. De acordo com estes resultados, Cnaani et al., (2008) propuseram que a supressão de recombinação e o pareamento incompleto do par cromossômico maior de *O. niloticus* representa vestígios da história evolutiva ancestral deste par como cromossomos sexuais. No entanto, o acúmulo dos elementos transponíveis *Rex*, assim como outras seqüências repetidas que estão presentes no par cromossômico maior desta espécie (Harvey et al., 2003; Ferreira e Martins, 2008), poderia ser resultado das fusões cromossômicas ocorridas e da perda da função ou das seqüências determinantes do sexo.

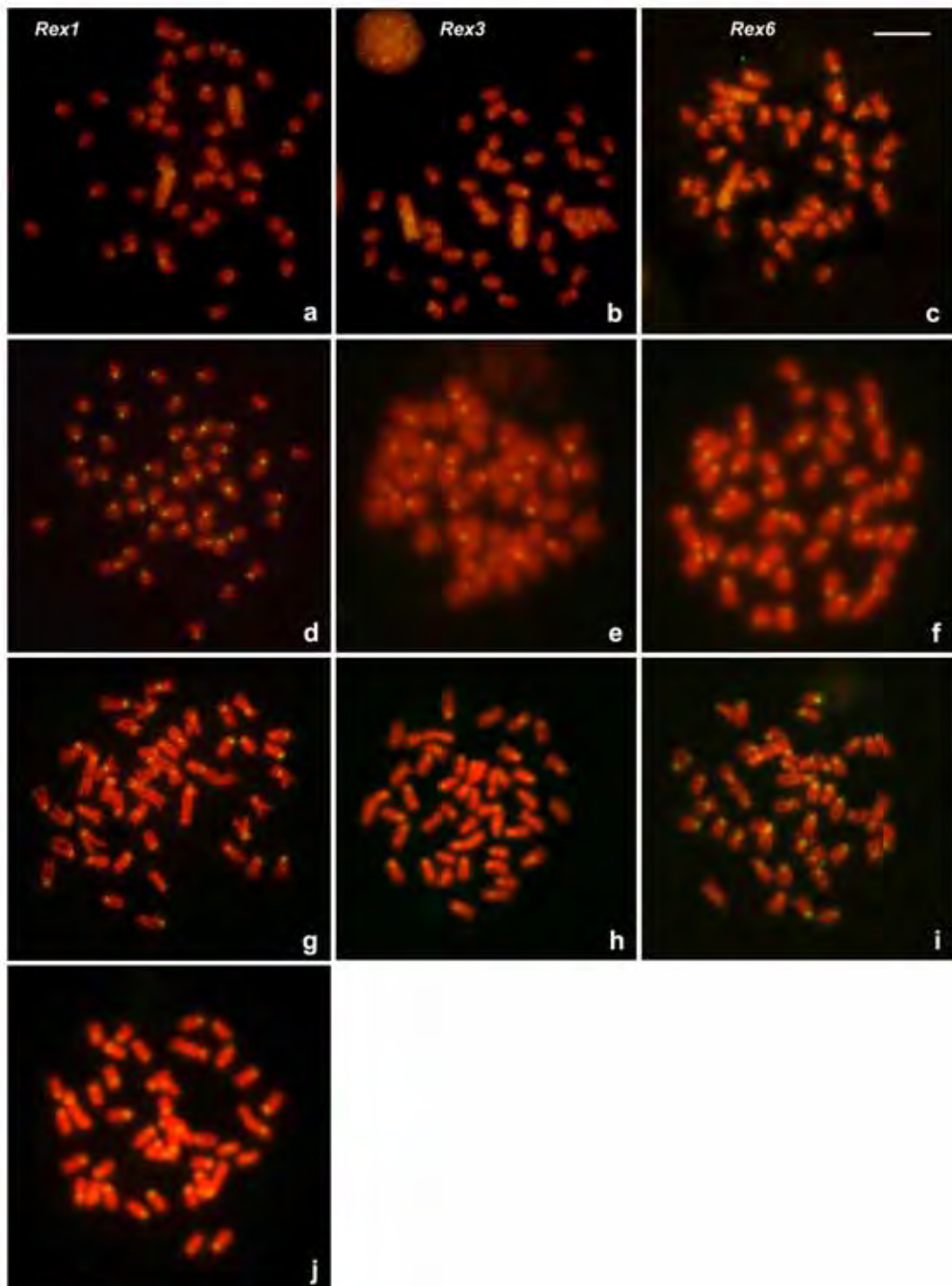


Figura 4: Hibridação *in situ* fluorescente dos elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, respectivamente, nas espécies *Oreochromis niloticus* (a, b, c), *Hemichromis bimaculatus* (d, e, f), *Melanochromis auratus* (g, h, i) e *Haplochromis obliquidens* (j). A barra representa 5 $\mu$ m.

As espécies de ciclídeos africanos e americanos analisadas, com exceção de *Oreochromis niloticus*, demonstraram um padrão de hibridação (em regiões centroméricas) similar ao encontrado para a seqüência repetida *AoRex3* da espécie *Astronotus ocellatus* (Mazzuchelli e Martins, 2009) e para *Rex1* e *Rex3* em *Cichla kelberi* (Teixeira et al., *in press*), ambas pertencentes a subfamília Cichlinae. Por outro lado, foram observados sinais de *Rex1* e *Rex3* em regiões eucromáticas do braço longo de dois pares cromossômicos de *Cichla kelberi*, sugerindo que este acúmulo pode ser resultado da supressão de recombinação nesta região (Teixeira et al., *in press*). Já o elemento transponível *Rex6* mostrou um padrão difuso e não compartimentalizado na heterocromatina centromérica de *C. kelberi*, (Teixeira et al., *in press*).

Todas as espécies de ciclídeos americanos (subfamília Cichlinae) já estudadas em relação à localização de *Rex*, com exceção de *Heros efasciatus*, mostraram sinais intersticiais menos intensos destes elementos nos cromossomos (Teixeira et al., *in press* e Figuras 5, 6 e 7). De acordo com as relações de parentesco apresentadas por Smith et al., (2008), *H. efasciatus* (Tribo Heroini) parece representar uma condição derivada quando comparado com as espécies dos gêneros *Cichla*, *Chaetobranchus* e *Satanoperca*. Esta condição derivada pode ser visualizada através das modificações ocorridas com a morfologia dos cromossomos desta espécie, que possui mais cromossomos do tipo meta/submetacêntricos (m/sm). As espécies *Chaetobranchus flavescens* e *Satanoperca jurupari* possuem um cariótipo com menos modificações e mais relacionados com o cariótipo de 48 cromossomos subtelo/acrocêntricos (st/a), que representa a possível forma basal para o grupo dos ciclídeos (Thompson, 1979; Teixeira et al., *in press*). Provavelmente, o acúmulo de elementos *Rex* somente nos centrômeros, de *Heros*

*efasciatus*, pode ser um resultado desta condição derivada, sendo que o seu genoma poderia ter sofrido mais modificações e eliminou estes elementos transponíveis das regiões intersticiais.

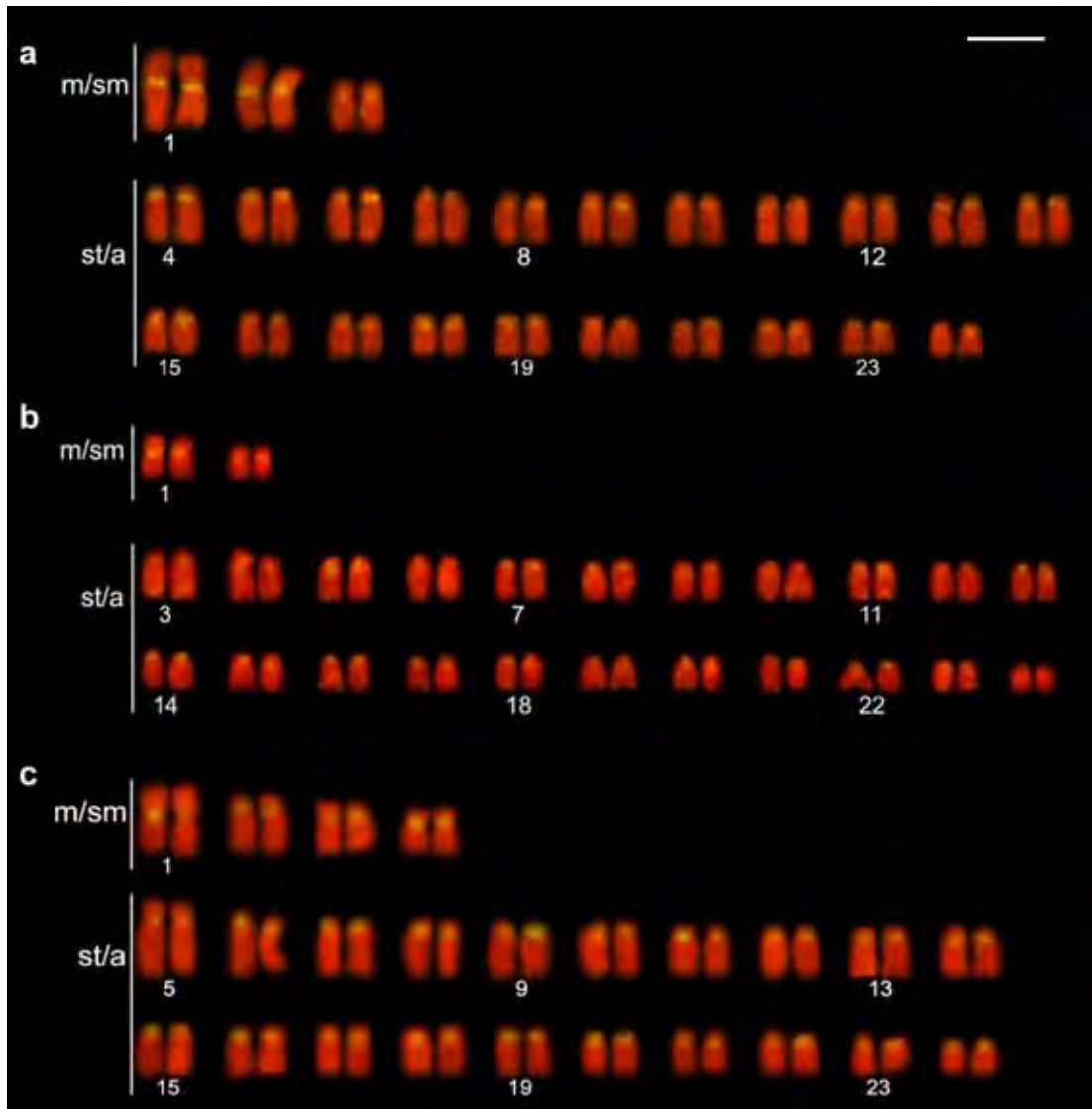


Figura 5: Hibridação *in situ* fluorescente do elemento transponível *Rex1* nos cromossomos de *Chaetobranchius flavescens* (a), *Satanoperca jurupai* (b) e *Heros efasciatus* (c). m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico. A barra representa 5 $\mu$ m.



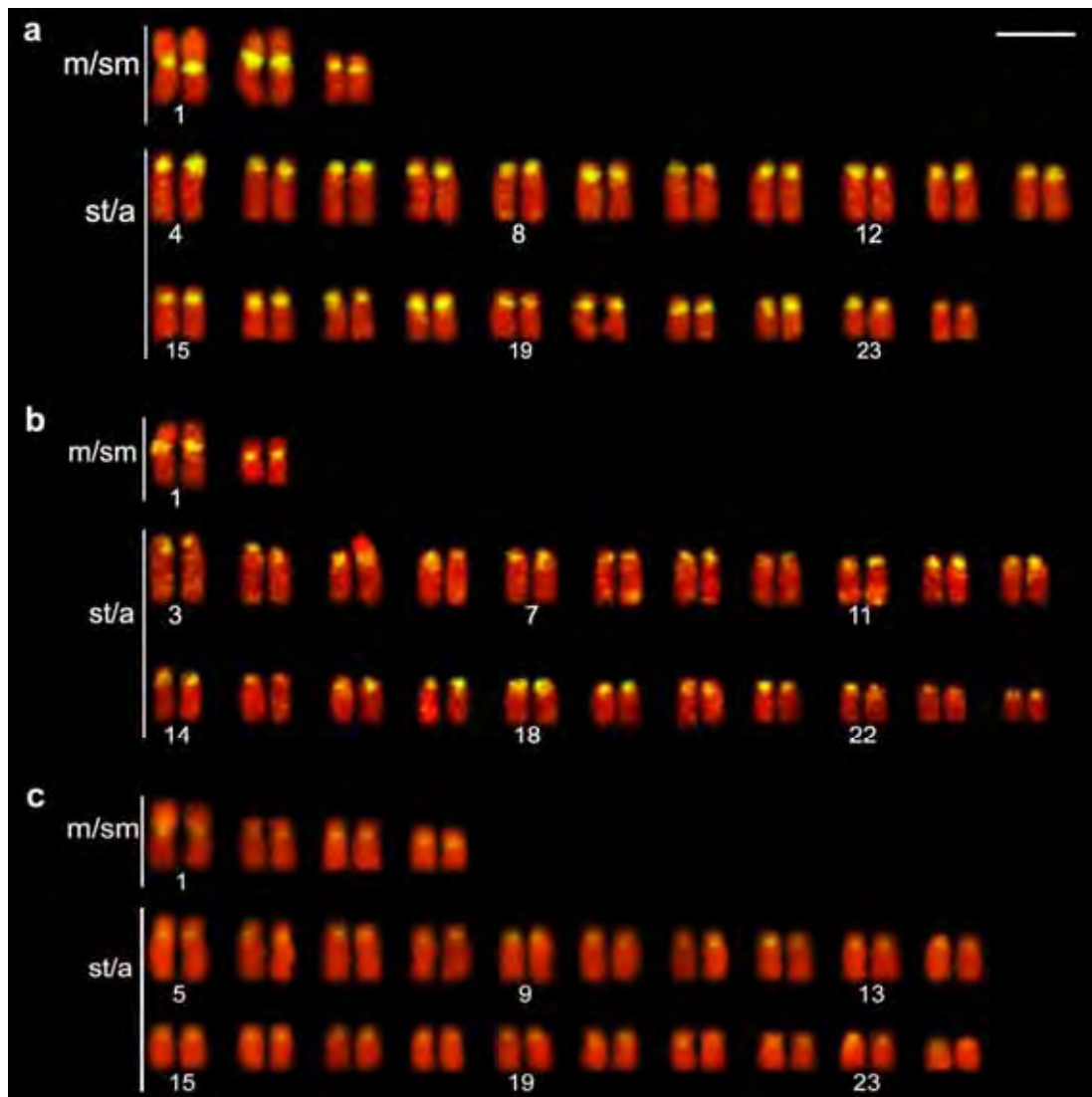


Figura 6: Hibridação *in situ* fluorescente do elemento transponível *Rex3* nos cromossomos de *Chaetobranchius flavescens* (a), *Satanoperca jurupai* (b) e *Heros efasciatus* (c). m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico. A barra representa 5 $\mu$ m.

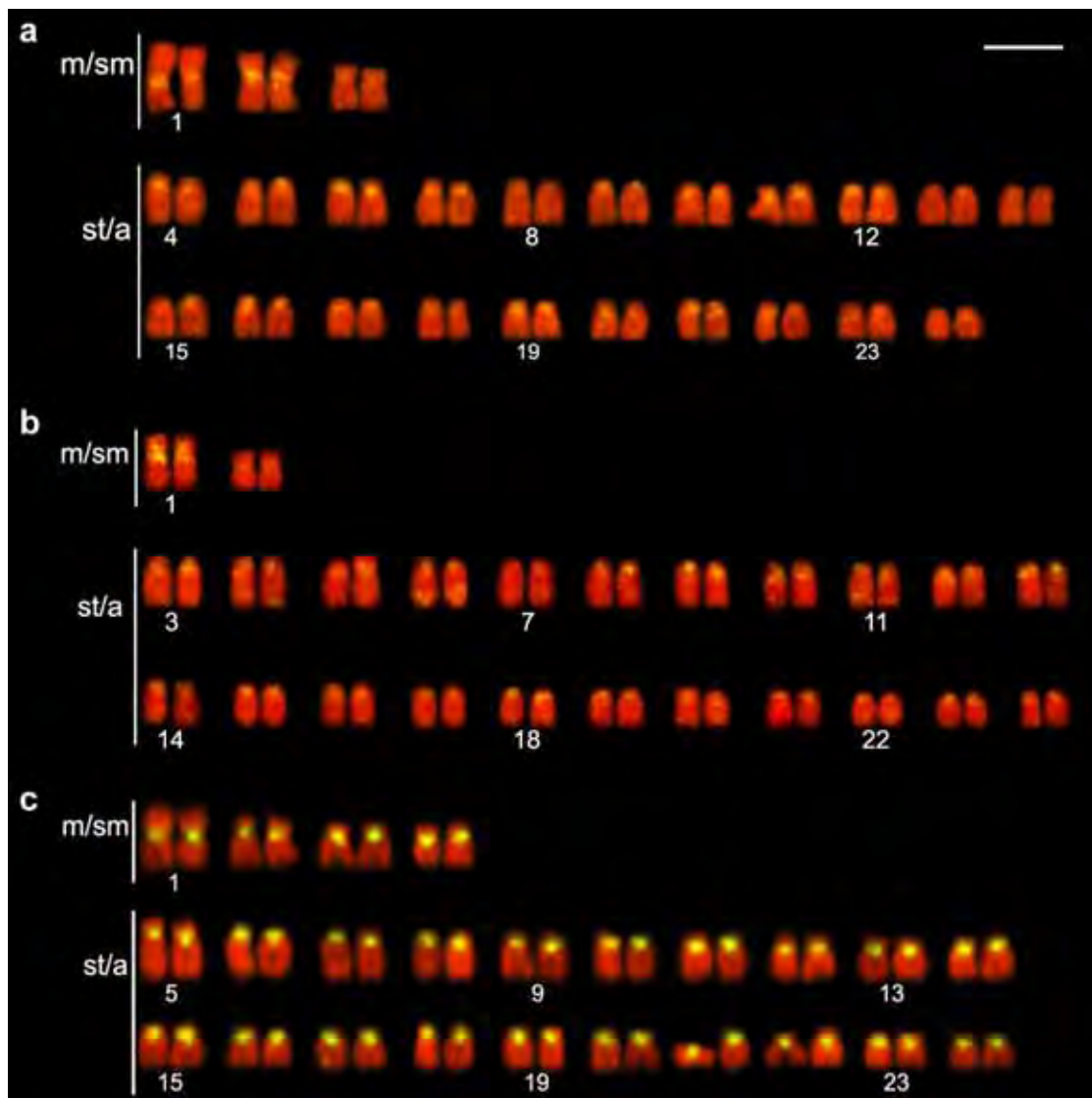


Figura 7: Hibridação *in situ* fluorescente do elemento transponível *Rex6* nos cromossomos de *Chaetobranchius flavescens* (a), *Satanoperca jurupai* (b) e *Heros efasciatus* (c). m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico. A barra representa 5 $\mu$ m.

#### 4.2. Mapeamento cromossômico de DNA satélite SATA em espécies de ciclídeos africanos

O DNA satélite SATA forma uma família de seqüências repetidas *in tandem* composta por três tipos de unidades monoméricas de diferentes tamanhos, sendo o tipo I com 237 pb, o tipo II com 230 pb e o tipo III com 209 pb. Estudos anteriores demonstraram que estas seqüências estão conservadas nos genomas de espécies de tilapiíneos e haplocromíneos (Franck et al., 1992; Franck et al., 1994), pertencentes à subfamília Pseudocrenilabriinae. Em algumas espécies do gênero *Oreochromis* o número de cópias destas seqüências representa 1,6 % do genoma haplóide e uma porcentagem menor do genoma dos haplocromíneos. Esta diferença pode indicar uma amplificação das seqüências SATA após a divergência do grupo tilapiíneo dos haplocromíneos (Franck et al., 1994). Devido à conservação desta seqüência no genoma de espécies de ciclídeos africanos, a mesma foi utilizada para o mapeamento cromossômico comparativo entre estas espécies.

O DNA satélite SATA foi hibridado anteriormente nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (Oliveira e Wright, 1998), porém a seqüência utilizada no presente trabalho foi isolada do genoma de *O. niloticus* através do método de  $C_0t-1$  DNA (Ferreira e Martins, 2008). O clone On11013-5.4 com a seqüência do DNA satélite SATA do tipo I foi utilizado para o mapeamento cromossômico em espécies das tribos Tilapiini (*Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus*, *O. karongae*, *O. mortimeri*, *Tilapia rendalli*, *T. zillii*, *T. mariae*), Haplochromini (*Haplochromis obliquidens* e *Melanochromis auratus*) (Figuras 8 e 9). Nas espécies de *Oreochromis* e em *Tilapia rendalli* este DNA satélite localizou-se somente na região centromérica de todos os cromossomos, com exceção de *Oreochromis karongae* que mostrou sinais mais fracos em posição intersticial no braço longo de

três pares cromossômicos (pares cromossômicos número 1, 6 e 7; Figura 8d). Já nas espécies *Melanochromis auratus*, *Tilapia zilli* e *T. mariae* não foi evidenciada a presença desta seqüência em todos os centrômeros, como observado para as espécies de *Oreochromis* (Figuras 8 e 9).

As espécies do gênero *Oreochromis* possuem cariótipos aparentemente conservados, sendo que a maioria das espécies já analisadas apresentou um número diplóide igual a 44 cromossomos, com poucos pares metacêntricos e um par subteloacêntrico bastante característico (Majumdar e McAndrew, 1986; Feldberg et al., 2003). Duas espécies mostraram números diplóides diferentes, *Oreochromis alcalicus*, com  $2n=48$  cromossomos (revisado em Feldberg et al., 2003) e *Oreochromis karongae* com  $2n=38$  (Harvey et al., 2002). A redução do número de cromossomos em *O. karongae* foi evidenciada devido a presença de três pares cromossômicos de tamanho médio não encontrados em outras espécies do mesmo gênero, os quais foram originados através de fusões cromossômicas (Harvey et al., 2002). A localização cromossômica de SATA nesta espécie mostrou sinais em todos os centrômeros e sinais mais fracos em posição intersticial de três pares de tamanho médio (pares 1, 6 e 7, Figura 8d), corroborando a hipótese de que fusões cromossômicas levaram a redução do número diplóide nesta espécie. A distribuição desta seqüência mostra que, provavelmente, dois pares surgiram pela fusão do braço curto de um par com o braço longo de outro par cromossômico, formando pares subtelo/acrocêntricos (pares 6 e 7, Figura 8d), os quais conservaram seqüências da região centromérica em posição intersticial. Já o terceiro par surgiu através da fusão de braços curtos de dois pares cromossômicos menores, originando um par meta/submetacêntrico, o par 1 (Figura 8d).

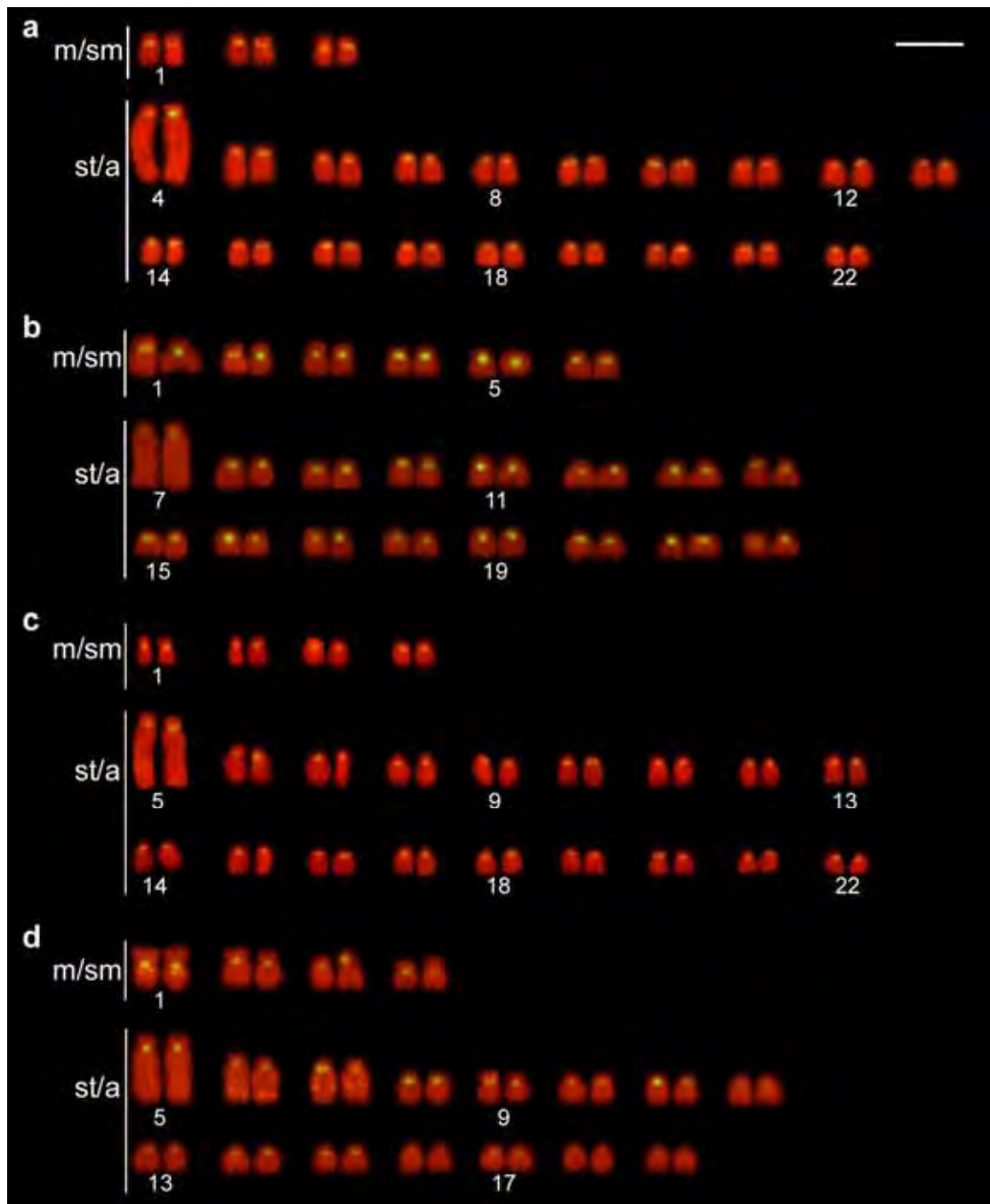
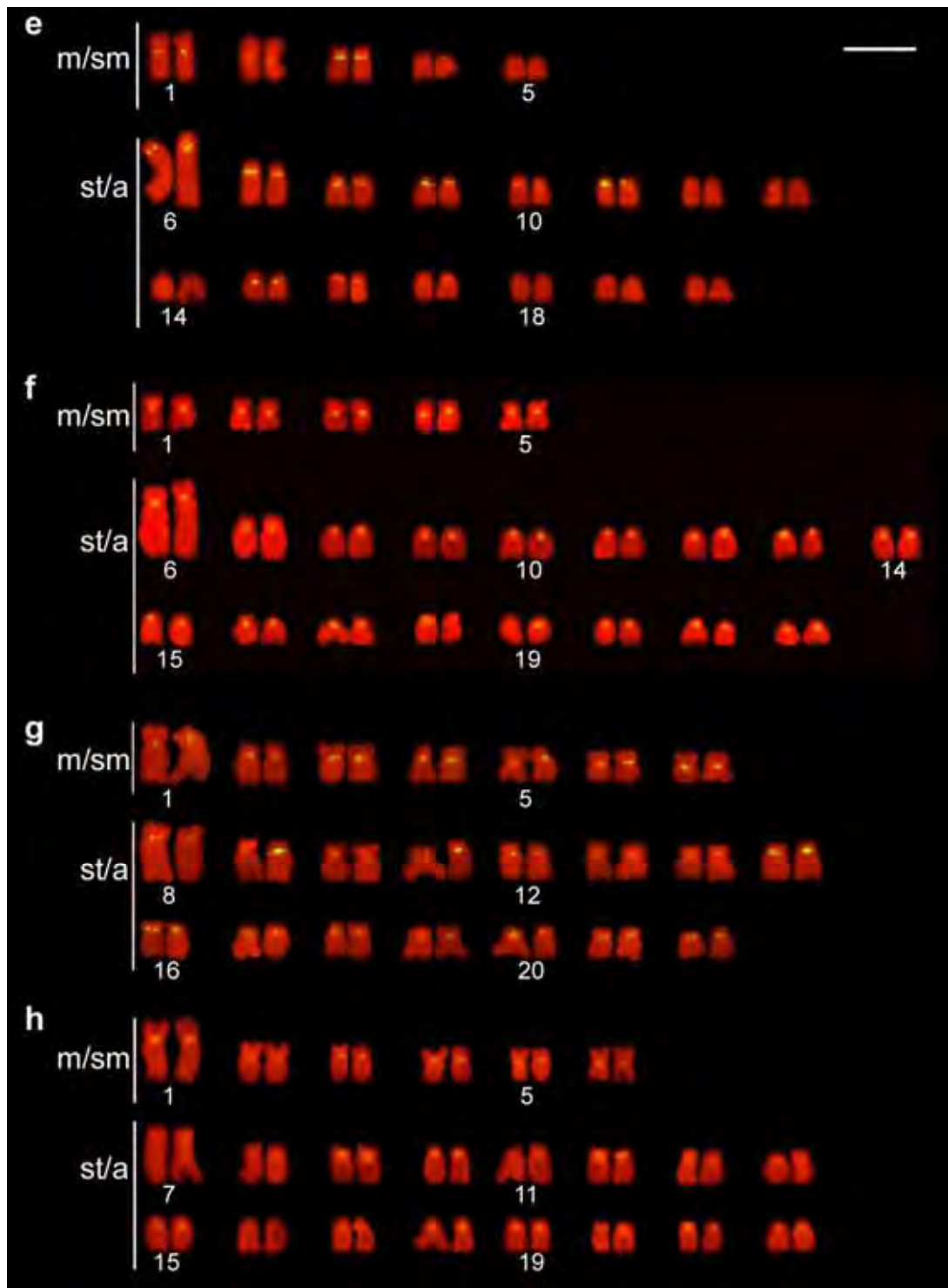


Figura 8: Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Oreochromis niloticus*-XY (a), *O. aureus* (b), *O. mossambicus* (c), *O. karongae* (d), *Tilapia mariae* (e), *T. rendalli* (f), *Haplochromis obliquidens* (g) e *Melanochromis auratus* (h), utilizando-se como sonda o DNA satélite SATA. m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico. A barra representa 5µm.

continuação



A espécie *Tilapia mariae* também apresenta uma redução no número cromossômico,  $2n=40$ . Esta redução deve estar relacionada com fusões cromossômicas, uma vez que são observados dois pares metacêntricos presentes no cariótipo desta espécie (pares 1 e 2; Figura 8e) similares aos observados em *Oreochromis karongae*, não presente em outras espécies de *Oreochromis* e *Tilapia* (Majumdar e McAndrew, 1986; Feldberg et al., 2003). O mapeamento do DNA satélite SATA nesta espécie mostra sinais de hibridação nos centrômeros de alguns pares cromossômicos sem a ocorrência de sinais intersticiais (Figura 8e). O mesmo ocorre na espécie *T. zilli* (Figura 9c e d) e em *Melanochromis auratus* (Figura 8h). A diferença observada entre estas espécies e as de *Oreochromis* pode ser resultado da diferenciação do genoma destas espécies após a divergência das linhagens, ou a amplificação desta seqüência no genoma de *Oreochromis*, como proposto anteriormente (Franck et al., 1994). Análises da seqüência nucleotídica e organização genômica do elemento SATA em *Tilapia* e outros tilapiíneos (*Oreochromis* e *Sarotherodon*) mostraram que esta seqüência possui uma divergência significativa em relação à composição nucleotídica e o número de cópias entre os diferentes gêneros (Franck et al., 1994).

Por outro lado, torna-se interessante observar que em *Tilapia zilli* apenas um dos cromossomos do par maior possui sinais de hibridação no centrômero (Figuras 9c e d). Uma análise de bandeamento C, para detecção da heterocromatina desta espécie, mostrou que somente alguns pares cromossômicos possuem blocos heterocromáticos na região centromérica, sendo que de 10 a 12 cromossomos não apresentaram estes blocos de heterocromatina (Majumdar e McAndrew, 1986). Portanto, a distribuição diferenciada de SATA nesta espécie pode estar relacionada com este padrão de heterocromatina.



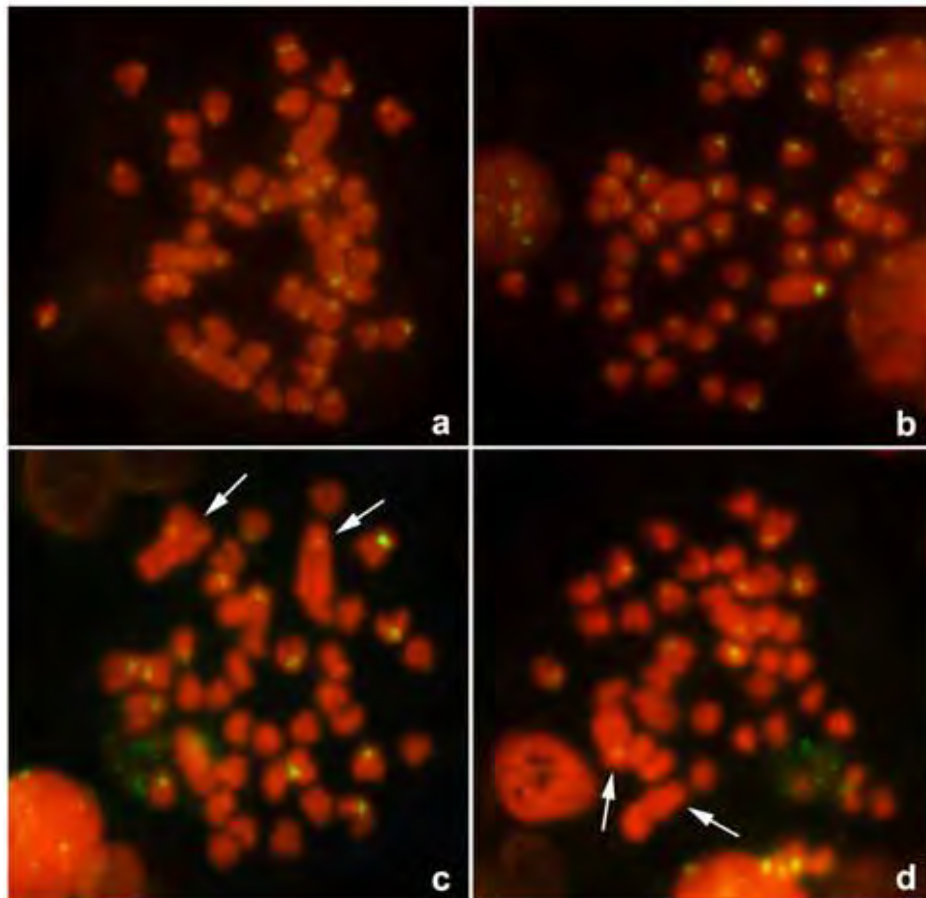


Figura 9: Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Oreochromis mortimeri* (a e b) e *Tilapia zilli* (c e d), utilizando-se como sonda o DNA satélite SATA. As setas indicam os membros do par cromossômico maior.

A conservação do DNA satélite SATA e sua distribuição centromérica, em espécies de diferentes gêneros (*Oreochromis*, *Tilapia*, *Haplochromis* e *Melanochromis*) sugerem que esta seqüência pode desempenhar um papel importante na organização e função do centrômero nestas espécies. Diferentes organismos têm demonstrado a presença de seqüências de DNA satélite em regiões centroméricas e pericentroméricas, indicando que estas seqüências possivelmente estão envolvidas na função destas regiões e, principalmente, na formação e manutenção da heterocromatina (Plohl et al., 2008).



### **4.3. Mapeamento cromossômico do elemento transponível *ROn-1* em espécies de ciclídeos africanos**

O elemento transponível *ROn-1* foi localizado através da técnica de FISH nos cromossomos de *Oreochromis niloticus*, *Astatotilapia burtoni*, *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* e *Hemichromis bimaculatus*. Todas as espécies mostraram somente um sinal intersticial no braço longo do maior par cromossômico (Figura 10). Embora estudos prévios tenham demonstrado uma distribuição de *ROn-1* dispersa em vários cromossomos de uma linhagem de tilápia do Nilo do Canadá (Oliveira et al., 2003), os mesmos resultados não foram observados no presente trabalho. O elemento *ROn-1* localizou-se apenas na região intersticial do braço longo do par cromossômico maior de *O. niloticus*. A diferença no padrão de distribuição deste elemento pode estar relacionada com a estringência das condições de hibridação utilizadas na técnica de FISH.

Nas outras espécies de ciclídeos este elemento transponível está localizado subterminalmente próximo ao telômero do braço longo de um dos maiores pares cromossômicos (par 1) (Figuras 10b, c, d e e). Estes resultados indicam que provavelmente o maior par da tilápia do Nilo possui regiões conservadas com o par 1 das outras espécies de ciclídeos africanos, não pertencentes à tribo Tilapiini.

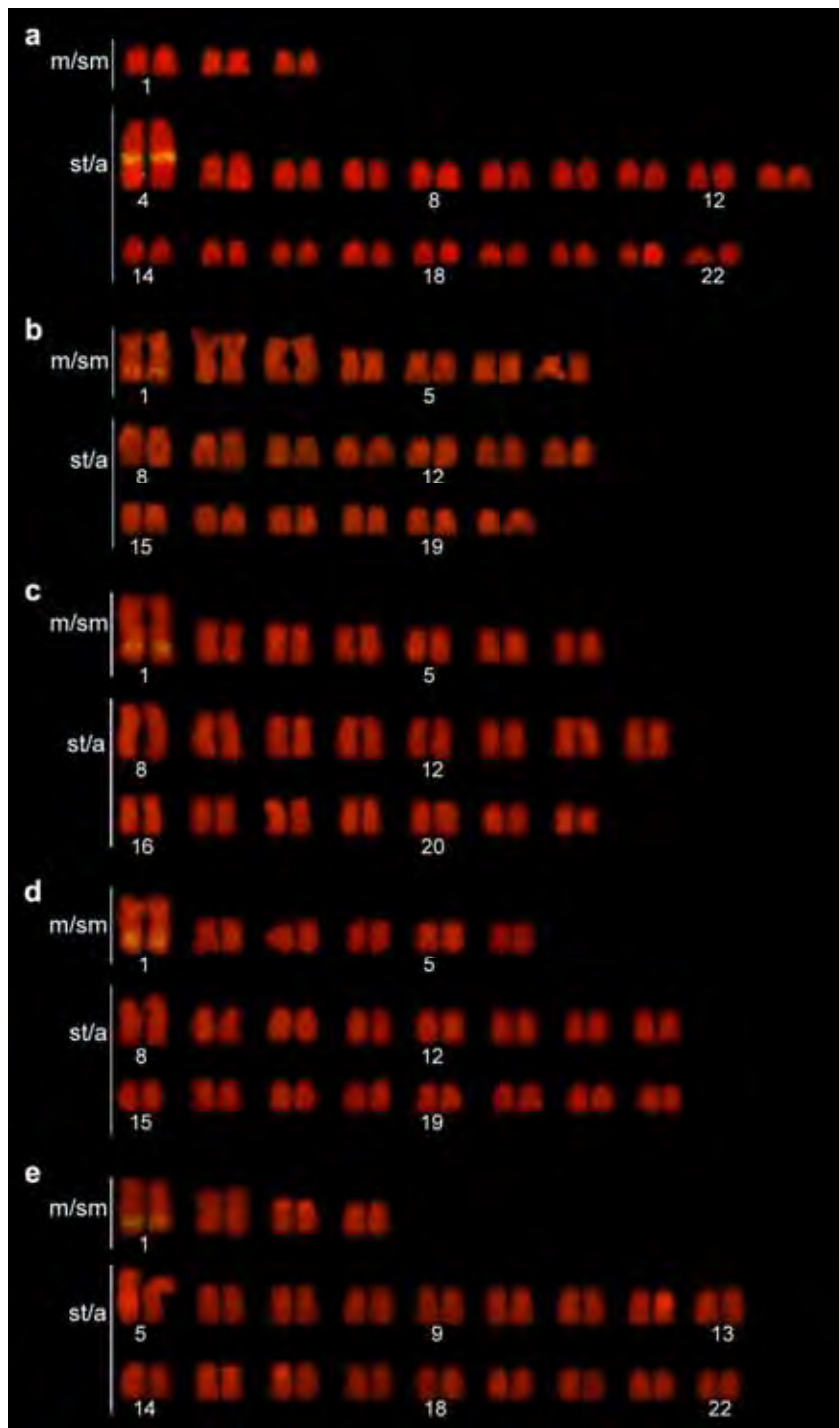


Figura 10: Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Oreochromis niloticus* (a), *Astatotilapia burtoni* (b), *Haplochromis obliquidens* (c), *Melanochromis auratus* (d) e *Hemichromis bimaculatus* (e), utilizando-se como sonda o elemento transponível *ROn-1*. m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico.

A principal característica do cariótipo das espécies do grupo tilapiíneo é a presença de um par cromossômico grande subtelocêntrico, o qual é significativamente maior do que todos os outros elementos do cariótipo, não presente em espécies de ciclídeos de outras tribos (Majumdar e McAndrew, 1986). Nas outras espécies da subfamília Pseudocrenilabrinae destaca-se a presença de dois pares cromossômicos grandes (Poletto AB, comunicação pessoal), porém, não tão discrepante quanto o par dos tilapiíneos (Figura 10). Análises de mapeamento cromossômico em tilápia do Nilo realizadas anteriormente, utilizando como sonda seqüência telomérica, demonstraram sinais de hibridação em duas posições intersticiais do braço longo do par maior de *Oreochromis niloticus* (Chew et al., 2002). De acordo com estes resultados, Chew et al., (2002) propuseram que, provavelmente, este par se originou através de eventos de fusão Robertsoniana e inversão pericêntrica.

O mapeamento de *RON-1* apresentou uma posição mediana no braço longo do par maior de *Oreochromis niloticus* e uma posição distal, próxima ao telômero, também no braço longo de um dos maiores pares nas outras espécies africanas (Figura 10). De acordo com os dados apresentados por Chew e colaboradores (2002) e os resultados de hibridação de *RON-1* entre as espécies de ciclídeos africanos, podemos propor que a primeira fusão cromossômica ocorreu antes da separação de tilapiíneos e não-tilapiíneos (haplocromíneos e hemicromíneos), reduzindo o cariótipo do suposto ancestral, com  $2n=48$  cromossomos (Chew et al., 2002; Thompson, 1979; Teixeira et al., *in press*), e originando o par cromossômico 1 das espécies africanas. O segundo evento de fusão ocorreu independentemente em tilapiíneos e não-tilapiíneos (Figura 11). Em tilapiíneos um outro cromossomo sofreu fusão com o par maior, originando o atual par cromossômico 4 (Figura 10a) (par

maior do complemento), enquanto que nos outros grupos a segunda fusão envolveu outros cromossomos que deram origem ao par 2 (Figura 11).

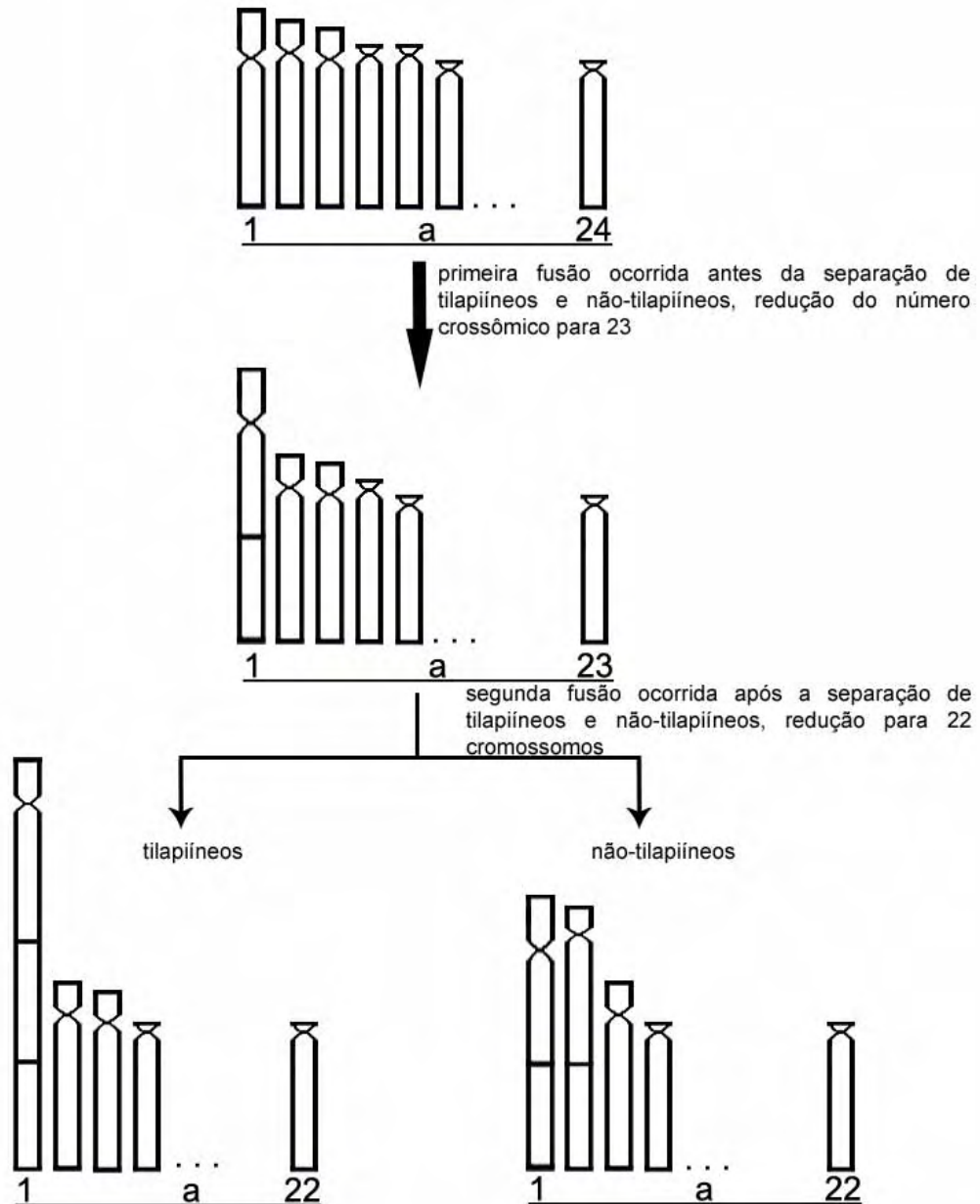


Figura 11: Idiograma representando as possíveis fusões ocorridas no grupo dos tilapiíneos, e não-tilapiíneos gerando os pares cromossômicos maiores destas espécies. O par número 1 dos tilapiíneos corresponde ao par st/a da Figura 10a, e o par número 2 dos não-tilapiíneos corresponde aos pares 8 das Figuras 10b, c, d e par 5 da Figura 10e)

Alguns elementos transponíveis, principalmente os SINEs (Short Interspersed Elements), não estiveram presentes no ancestral comum dos vertebrados, indicando que estes elementos poderiam surgir especificamente em uma determinada linhagem (Böhne et al., 2008). O elemento transponível *ROn-1* é uma seqüência do tipo SINE, que representa um marcador potencial para estudos filogenéticos e evolutivos (Bryden et al., 1998). Esta seqüência está presente somente na linhagem de ciclídeos africanos, apresentando formas variantes que são específicas das unidades taxonômicas analisadas. A divergência de seqüências do elemento tipo SINE *ROn-1* e o seu padrão de inserção no genoma podem ser utilizados nos estudos das relações de parentesco entre os tilapiíneos e outras espécies africanas, como foi observado para a família de SINES AFC (Shedlock et al., 2004). Além do uso para estudos filogenéticos, o mapeamento cromossômico de *ROn-1* mostrou uma conservação de regiões cromossômicas entre as diferentes espécies de ciclídeos africanos.

#### 4.4. Mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas inseridas em BACs

A construção de bibliotecas genômicas em BACs tem sido muito utilizada para seqüenciamento completo dos genomas devido à capacidade destes vetores de clonar grandes segmentos de DNA. Porém, uma das dificuldades encontradas durante a organização das seqüências obtidas destas bibliotecas está relacionada ao correto posicionamento e arranjo das seqüências repetitivas dentro do genoma. Entre os genomas já seqüenciados, as regiões ricas em elementos repetitivos continuam representando *gaps* devido a dificuldade na organização e determinação do exato número de cópias presentes em regiões específicas do genoma, como é o caso dos centrômeros (Plohl et al., 2008). A integração dos dados sobre seqüenciamento completo do genoma e mapeamento cromossômico de BACs pode promover um incremento no conhecimento desses genomas.

A tilápia do Nilo é uma das espécies para a qual foi construída uma biblioteca de BACs para o seqüenciamento completo do seu genoma (Katagiri et al., 2001; Cichlid Genome Consortium). O segundo passo após a construção desta biblioteca, foi a organização dos clones em grupos (*contigs*). A construção de um mapa físico do genoma da tilápia do Nilo, gerado a partir de restrição enzimática de uma biblioteca genômica com cerca de 35.000 clones (cobertura de 5x o genoma), gerou 3.621 *contigs* (Katagiri et al., 2005). Além do sequenciamento completo do genoma da tilápia do Nilo, alguns estudos tem sido realizados nesta biblioteca de BACs, na busca de marcadores que possam estar associados aos grupos de ligação do mapa genético desta espécie. Já foram identificados, em alguns destes BACs, diversos marcadores presentes em grupos de ligação que estão relacionados à determinação sexual (Lee et al., 2005; Cnaani et al., 2008).

Um mapa cromossômico que reúna um número acentuado de marcadores poderá representar uma ferramenta poderosa para detectar rearranjos cromossômicos na tilápia do Nilo e espécies relacionadas. Porém, a função principal do mapa cromossômico é ancorar o mapa genético de ligação, o mapa físico de BACs e o mapa completo do seqüenciamento, unindo-se dados genéticos e físicos do genoma. Em uma primeira análise do mapa físico de restrição da tilápia e dos dados disponíveis no site do *Cichlid Genome Consortium*, 18 BACs de três *contigs*, candidatos a conterem seqüências repetidas, foram selecionados para o mapeamento cromossômico nesta espécie (Ferreira e Martins, 2008).

Dois clones contendo seqüências repetitivas de *O. niloticus*, BAC-C4E09 (b03TI074AE09) e BAC-C5E01 (b04TI035DE01), mapeados previamente nos cromossomos desta espécie (Ferreira e Martins, 2008), foram alguns dos clones que apresentaram sinais positivos após hibridação em membrana e recuperados para mapeamento cromossômico. O BAC-C4E09 foi utilizado como sonda, através de FISH, nas espécies *Oreochromis mossambicus*, *Tilapia zilli*, *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* e *Labeotropheus trewavasae*. O padrão de distribuição deste clone nos cromossomos de *O. mossambicus* e *T. zilli* (Figura 12) é semelhante ao de *O. niloticus* (Figura 13a) com sinais em regiões teloméricas e centroméricas na maioria dos cromossomos e principalmente em regiões intersticiais do braço longo do par cromossômico maior (Figuras 12, 13a), mostrando uma conservação de seqüências ou de regiões cromossômicas entre as diferentes espécies de tilapiíneos.

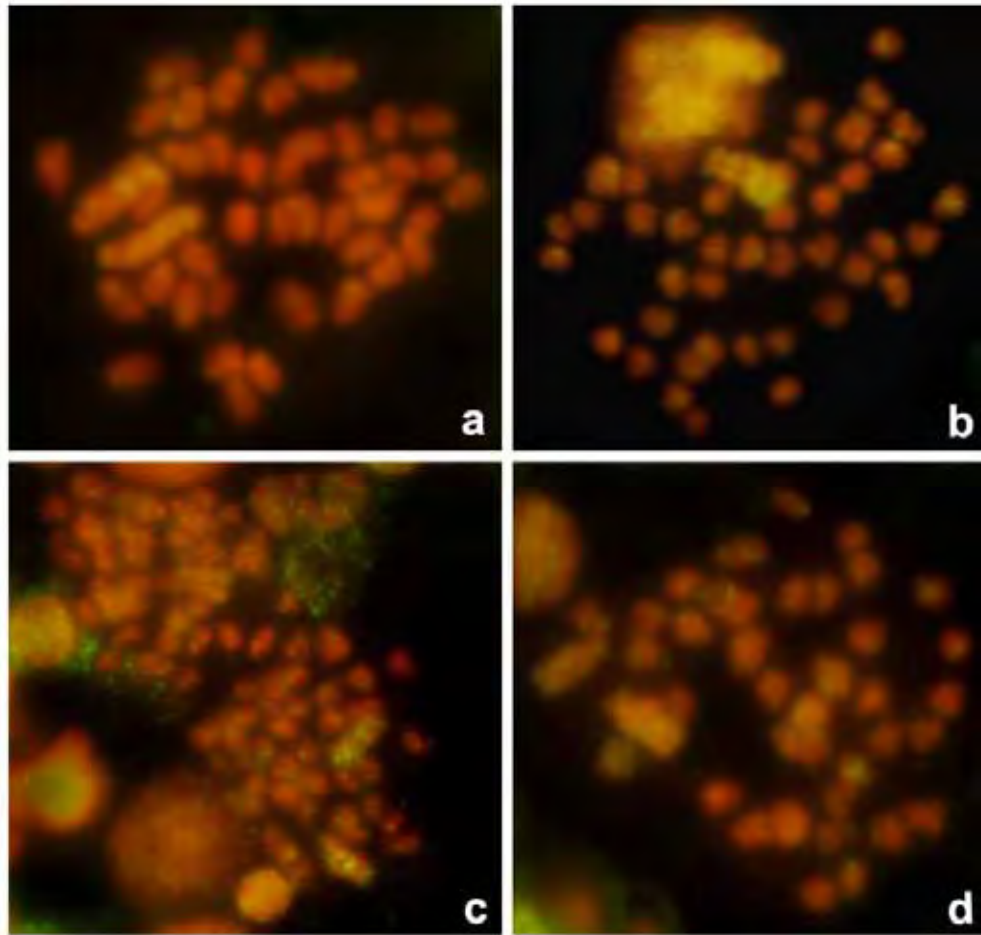


Figura 12: Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Oreochromis mossambicus* (a e b) e *Tilapia zilli* (c e d), utilizando-se como sonda o BAC-C4E09.

Nas espécies *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* e *Labeotropheus trewavasae* as seqüências inseridas neste clone mostraram sinais nítidos no braço curto do par cromossômico meta/submetacêntrico maior (par cromossômico número 1, Figuras 13b, c e d) e em regiões terminais, centromérica e intersticial de alguns pares cromossômicos (Figuras 13b, c e d).

Dentre as seqüências isoladas e seqüenciadas do clone BAC-C4E09 (Ferreira e Martins, 2008), foram identificados o retrotransposon CiLINE2 e o DNA satélite SATB, hibridados anteriormente nos cromossomos de *Oreochromis niloticus*



(Oliveira and Wright, 1998; Oliveira et al., 1999; Harvey et al. 2003), e ainda mais dois novos elementos repetitivos dispersos no genoma de ciclídeos e de *Danio rerio* (Ferreira e Martins, 2008). Experimentos de hibridação cromossômica com o DNA satélite SATB mostraram que a maioria das cópias desta seqüência foram localizadas na região pericentromérica de somente um par cromossômico na tilápia do Nilo, sendo que esta seqüência pode também estar presente em outras regiões cromossômicas, pois sinais fracos foram também observados em outros pares cromossômicos (Oliveira e Wright, 1998). Dessa forma, os sinais das seqüências repetitivas presentes no BAC-C4E09 na região centromérica de pares meta/submetacêntricos e subtelo/acrocêntricos dos cromossomos da tilápia do Nilo (Figura 13a) podem estar relacionados à presença de seqüências SATB presentes neste BAC (Ferreira e Martins, 2008).

O DNA satélite SATB foi identificado também presente no genoma das espécies haplocromíneas (Franck e Wright, 1993). Porém, nas espécies *Haplochromis obliquidens* e *Melanochromis auratus* o SATB pode estar conservado em um único par cromossômico, uma vez que foram observados sinais nítidos na região pericentromérica do par 12 da espécie *H. obliquidens* (Figura 13b) e no par cromossômico 8 de *M. auratus* (Figura 13c).

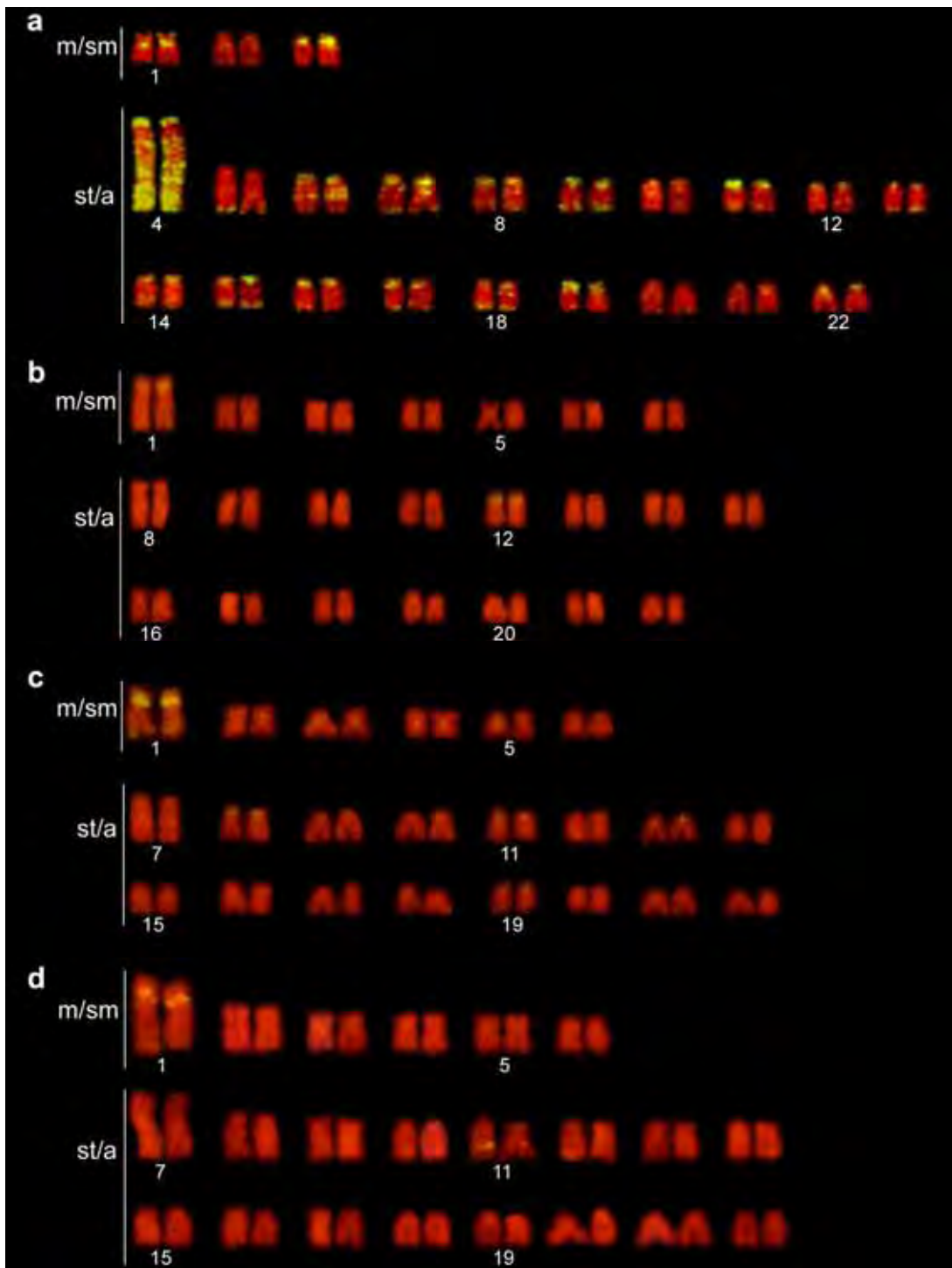


Figura 13: Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Oreochromis niloticus* (a), *Haplochromis obliquidens* (b), *Melanochromis auratus* (c) e *Labeotropheus trewavasae* (d) utilizando como sonda o clone BAC-C4E09. m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico.

O BAC-C5E01, já mapeado previamente em tilápia do Nilo (Ferreira e Martins, 2008; Figura 14a), também foi utilizado como sonda para hibridação cromossômica em *Haplochromis obliquidens* e *Geophagus brasiliensis* (Figuras 14b e c). Na tilápia do Nilo as seqüências inseridas neste clone apresentaram sinais fortes de hibridação no par cromossômico de maior tamanho e na região centromérica e telomérica da maioria dos cromossomos (Ferreira e Martins, 2008 e Figura 14a). Em *Haplochromis obliquidens* o BAC-C5E01 apresentou sinais nítidos ao longo do par cromossômico meta/submetacêntrico maior (par 1) e na região terminal de um par subtelo/acrocêntrico pequeno (par 12, Figura 14b). Já em *Geophagus brasiliensis* o BAC-C5E01 mostrou poucos sinais dispersos de hibridação nos cromossomos (Figura 14c). O padrão de hibridação apresentado pelo ciclídeo sul-americano pode estar relacionado com a presença de elementos transponíveis conservados em *O. niloticus* e *G. brasiliensis*.

Por outro lado, o padrão de hibridação visualizado na espécie africana *Haplochromis obliquidens* é semelhante aos dados apresentados para o BAC-C4E09. Os resultados apresentados por ambos os clones apontam para uma conservação de parte das seqüências presentes nestes BACs nas espécies africanas e sul-americanas. Além disto, os dados obtidos, juntamente com os resultados de mapeamento cromossômico de *RON-1*, mostram a conservação de seqüências repetidas e a homologia entre os pares cromossômicos de maior tamanho das espécies africanas, principalmente no braço longo, onde ocorre um acúmulo destas seqüências.

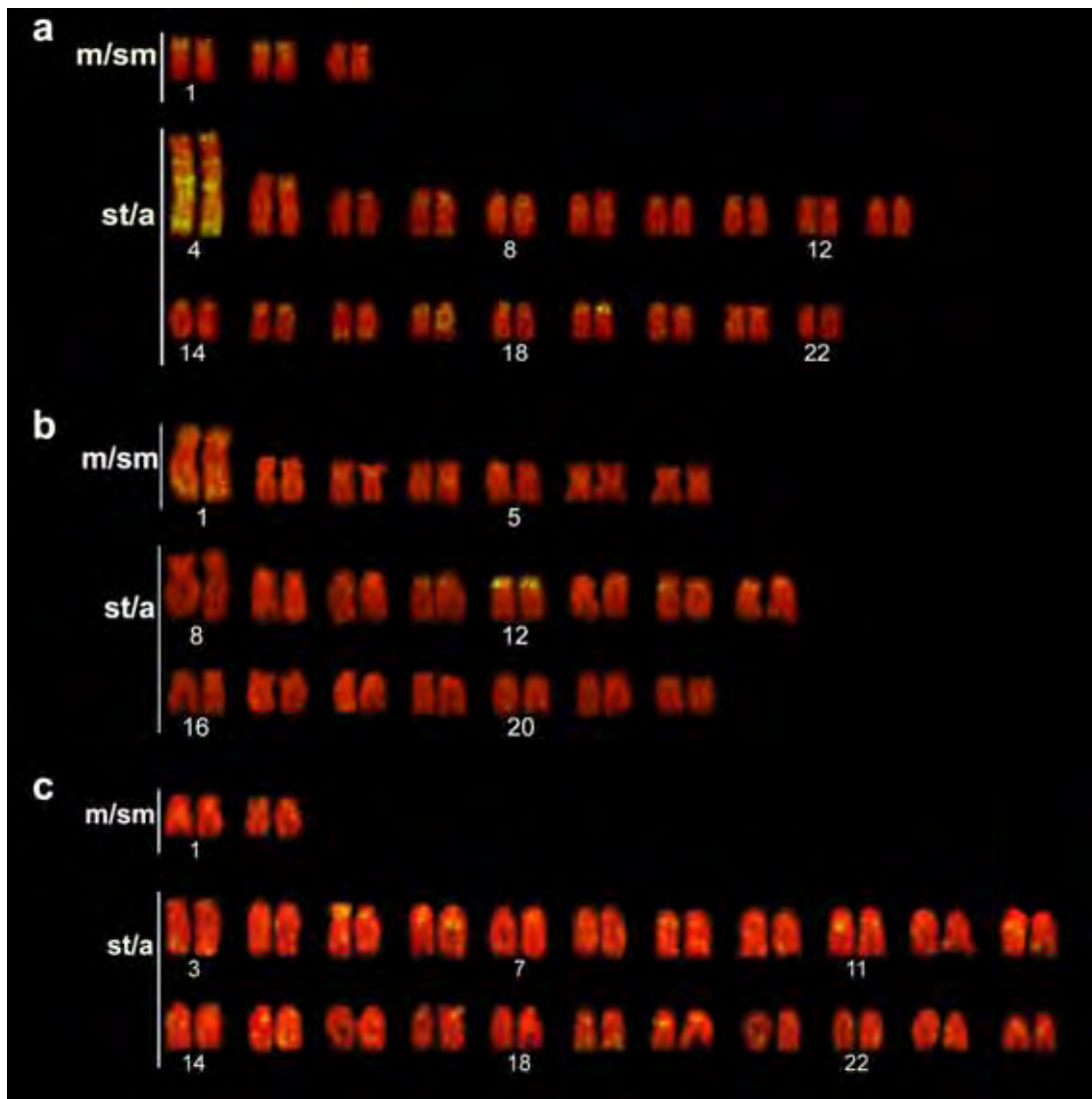


Figura 14: Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Oreochromis niloticus* (a), *Haplochromis obliquidens* (b) e *Geophagus brasiliensis* (c) utilizando como sonda o BAC-C5E01. m/sm = meta/submetacêntrico, st/a = subtelo/acrocêntrico.

#### **4.5. Análise comparativa do mapeamento de seqüências repetidas em espécies de ciclídeos**

Espécies de ciclídeos das subfamílias Pseudocrenilabrinae (ciclídeos africanos) e Cichlinae (ciclídeos da região Neotropical) foram utilizadas para mapeamento cromossômico comparativo de diferentes seqüências repetidas inseridas em BACs (BAC-C4E09 e BAC-C5E01), repetidas em *tandem* (DNA satélite SATA) e elementos transponíveis (*ROn-1*, *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*).

O DNA satélite SATA localizou-se nos centrômeros das espécies dos grupos tilapiíneo e haplocromíneo, e os retrotransposons *Rex* foram mapeadas nos centrômeros de ciclídeos africanos e sulamericanos. A localização destas seqüências repetitivas preferencialmente no centrômero pode refletir um papel funcional das mesmas nesta região, ou um refúgio, para as seqüências repetidas, oferecido pela heterocromatina e pela taxa reduzida de recombinação no centrômero e proximidades (Kidwell, 2005; Burt e Trivers, 2006). A análise destas seqüências repetidas de DNA em espécies da família Cichlidae e em outros grupos de peixes acrescentará informações importantes sobre o papel das mesmas dentro do genoma.

Os resultados obtidos com o elemento transponível *ROn-1* e os BACs indicam uma conservação de seqüências repetitivas entre as diferentes espécies de ciclídeos e a homologia entre o par cromossômico maior de *Oreochromis niloticus* e o par cromossômico meta/submetacêntrico maior das espécies haplocromíneas analisadas (Figura 15). Além disto, o mapeamento de SATA e *ROn-1* mostrou que padrões específicos de rearranjos cromossômicos ocorreram independentemente nos gêneros de *Oreochromis*, e no grupo dos não-tilapiíneos. Em *O. karongae*

eventos de fusões foram evidenciados através do mapeamento de SATA. Já o mapeamento de *ROn-1* indicou que dois eventos de fusões cromossômicas podem ter ocorridos independentemente entre os tilapiíneos e os não-tilapiíneos.

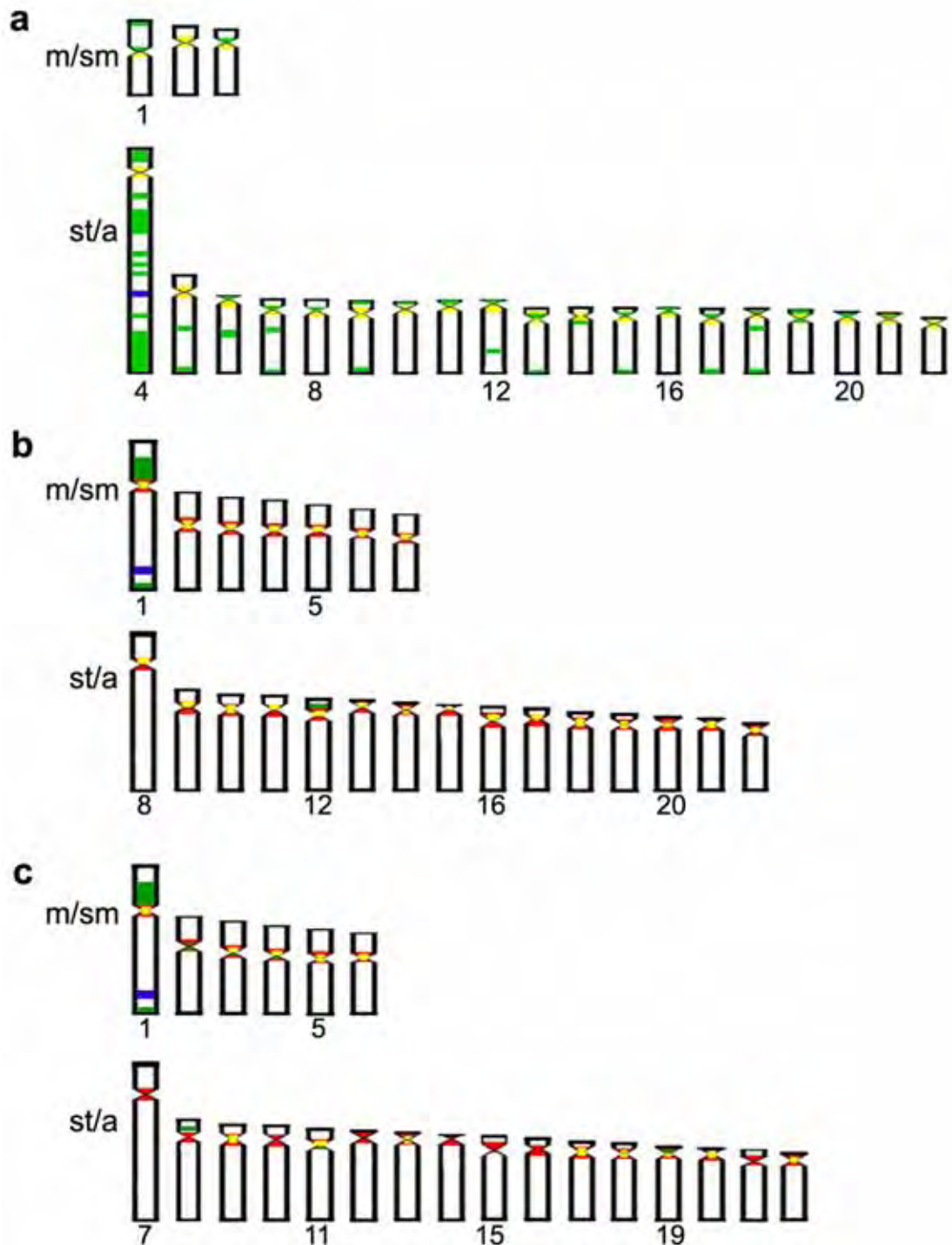


Figura 15: Idiogramas representativos das seqüências repetitivas hibridadas nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (a), *Haplochromis obliquidens* (b) e *Melanochromis auratus* (c). As cores representam as diferentes seqüências repetitivas hibridadas: verde – BAC-C4E09; amarelo – DNA satélite SATA; azul – elemento transponível *R<sub>On</sub>-1* e vermelho – elementos transponíveis *Rex*.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os dados de mapeamento cromossômico comparativo de seqüências repetitivas em diferentes espécies de ciclídeos, podemos concluir que:

- Os retrotransposons *Rex* estão localizados principalmente nas regiões centroméricas, provavelmente, como consequência da baixa taxa de recombinação que leva ao acúmulo de seqüências repetitivas, assim como devido a um possível papel destas seqüências na estrutura centromérica.
- O DNA satélite SATA está conservado na região centromérica de tilapiíneos e haplocromíneos, provavelmente devido ao seu papel na organização e função desta região;
- O elemento transponível *ROn-1* apresentou um padrão de localização em um único par cromossômico entre as diferentes espécies de ciclídeos africanos analisadas, indicando uma conservação de determinadas regiões do par cromossômico maior entre as espécies africanas;
- A distribuição de *ROn-1* também mostra os possíveis eventos de rearranjos cromossômicos ocorridos nestas espécies;
- As seqüências repetitivas inseridas em BACs mostram-se conservadas entre as diferentes espécies de ciclídeos, evidenciando até mesmo regiões cromossômicas homólogas entre os tilapiíneos e haplocromíneos;



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N: Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301-1310 (2002).
- Axelrod HR: The most complete colored lexicon of cichlids, 2<sup>nd</sup> ed (TFH Publications, NJ, 1996).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Citotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1:103-120 (1978).
- Biémont C, Vieira C: Junk DNA as na evolutionary force. *Nature* 443:521-524 (2006).
- Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN: Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res* 16(1):203-215 (2008).
- Bryden LJ, Denovan-Wright EM, Wright JM: *ROn-1* SINEs: a tRNA-derived, short interspersed repetitive DNA element from *Oreochromis niloticus* and its species-specific distribution in Old World cichlid fishes. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7(1):48-54 (1998).
- Burt A, Trivers RL: *Genes in Conflict: The biology of selfish genetic elements* (Belknap Press of Harvard University Press, Boston, MA 2006).
- Carrasco LAP, Penman DJ, Bromage NR: Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture* 173:207–218 (1999).
- Capriglione T, Odierna G, Caputo V, Canapa A, Olmo E: Characterization of *Tc 1*-like transposon in Antarctic ice-fish *Chionodraco hamatus*. *Gene* 295:193-198 (2002).
- Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220 (1994).
- Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ: Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma* 111:45-52 (2002).
- Cichlid Genome Consortium: [www.cichlidgenome.org](http://www.cichlidgenome.org). Acessado 25 de Março de 2009.

- Cnaani A, Hulata G: Tilapias, in Kocher TD, Kole C (eds): Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals, vol 2, pp 101-116 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008).
- Cnaani A, Lee BY, Zilberman N, Ozouf-Costaz C, Hulata G, et al: Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sex Dev* 2:43-54 (2008).
- Danley PD, Kocher TD: Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. *Mol Ecol* 10:1075-1086 (2001).
- Dasilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Crollius HR: Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21):1636-1641 (2002).
- Dawe RK: RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* 15:297-301 (2003).
- DiPalma F, Celeste K, Borowsky R, Kocher TD: Construction of Bacterial Artificial Chromosome Libraries for the Lake Malawi Cichlid (*Metriaclima zebra*), and the Blind Cavefish (*Astyanax mexicanus*). *Zebrafish* 4(1):41-48 (2007).
- Doolittle WF, Sapienza C: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603 (1980).
- Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR: The DNA sequence of the human chromosome 22. *Nature* 402:489-495 (1999).
- Eickbush TH, Furano AV: Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. *Curr Opin Genet Dev* 12:669-674 (2002).
- FAO, 2006: World aquaculture production of fish, crustaceans, mollusks, etc., by principal species in 2006. <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/a-6.pdf>. Acessado em 13 de Abril de 2009.
- Farias IP, Orti G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A: Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. *J Mol Evol* 48:703-711 (2000).
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC: Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution, in: Val AL, Kapoor BG (eds): Fish adaptations, pp 285-308 (Science Publishers, New Dehli & New York 2003).

- Ferreira IA, Martins C: Physical chromosome mapping of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using repetitive DNA sequences. *Micron* 39:411-418 (2008).
- Feschotte C, Pritham EJ: DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* 41:331-368 (2007).
- Fischer C, Bouneau L, Coutanceau JP, Weissenbach J, Volff JN: Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336:175-184 (2004).
- Flavell RB, Bennett MD, Smith JB, Smith DB: Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genet* 12:257-269 (1974).
- Foresti F, Oliveira C, Galetti PM, Almeida-Toledo LF: Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome* 36:1124-1128 (1993).
- Franck JPC, Wright JM: Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome (Pisces: Cichlidae). *Genome* 36:187-194 (1993).
- Franck JPC, Wright JM, McAndrew BJ: Genetic variability in a family of satellite DNAs from tilapia (Pisces: Cichlidae). *Genome* 35:719-725 (1992).
- Franck JPC, Kornfield I, Wright JM: The utility of SATA satellite DNA sequences for inferring phylogenetic relationships among the three major genera of tilapiine cichlid fishes. *Mol Phylogenet Evol* 3:10-16 (1994).
- Goldstein RJ: *Cichlids of the world* (TFH Publications, Neptune 1988).
- Harvey SC, Campos-Ramos R, Kennedy DD, Ezaz MT, Bromage NR, et al: Karyotype evolution in Tilapia: mitotic and meiotic chromosome analysis of *Oreochromis karongae* and *O. niloticus* x *O. karongae* hybrids. *Genetica* 115: 169-177 (2002).
- Harvey SC, Boonphakdee C, Campos-Ramos R, Ezaz MT, Griffin DK, et al: Analysis of repetitive DNA sequences in the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*. *Cytogenet Genome Res* 101:314-319 (2003).
- Henikoff S, Ahmad K, Malik H: The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293:1098-1102 (2001).

- Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P: Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenet Genome Res* 110:426-440 (2005).
- IBAMA: Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. (IBAMA, Brasília, 2006).
- International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921 (2001).
- Jaillon O, Aury J-M, Brunet F, Petit J-L, Stange-Thomann N, et al: Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431:946-957 (2004).
- Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, et al: The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447:714-719 (2007).
- Katagiri T, Kidd C, Tomasino E, Davis J, Wishon C, et al: A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome. *BMC Genomics* 89:1-17 (2005).
- Katagiri T, Asakawa S, Minagawa S, Shimizu N, Hirono I, Aoki T: Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. *Anim Genet* 32:200-204 (2001).
- Kidwell MG: Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115:49-63 (2002).
- Kidwell MG: Transposable elements, in Gregory T (ed): *The Evolution of the genome*, pp 165-223 (Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 2005).
- Kocher TD: Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature* 5: 288-298 (2004).
- Kocher TD, Lee WJ, Sobolewsha H, Penman D, McAndrew B: A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148:1225-1232 (1998).
- Kubitza F: Tilápia em água salobra e salgada: Uma boa alternativa de cultivo para estuários e viveiros litorâneos. *Panorama da Aqüicultura* 15(88): 14-18 (2005).
- Kullander SO: A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes), in Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena

- CAS (eds): Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, pp 461-498 (EDIPUCRS, Porto Alegre, RS 1998).
- Kullander SO: Family Cichlidae, in Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (eds): Check list of the freshwater fishes of South and Central America, pp 605-654 (EDIPUCRS, Porto Alegre, RS 2003).
- Lee BY, Lee WJ, Streelman JT, Carleton KL, Howe AE, et al: A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* 170:237-244 (2005).
- Liem KF: Functional morphology, in Keenleyside MHA (Ed): Cichlid fishes: behavior, ecology and evolution, pp 129-150 (Chapman and Hall, London 1991).
- Lippman Z, Gendrel A-V, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, et al: Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430:471-476 (2004).
- Lowe-McConnell RH: Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes, in Keenleyside MHA (ed): Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution, pp 60-85 (Chapman and Hall, London, 1991).
- Majumdar KC, McAndrew BJ: Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, Tilapia, Sarotherodon, and Oreochromis of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica* 68:175-188 (1986).
- Martins C: Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): Fish Cytogenetics, pp 421-453 (Science Publisher, Inc., Enfield, NH, 2007).
- Martins C, Galetti PM Jr: Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* 44(5):903-910 (2001).
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright J: Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiini cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas* 133(1): 39-46 (2000).
- Martins C, Oliveira C, Wasko AP, Wright JM: Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. *Aquaculture* 231:37-49 (2004).
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wright JM, Foresti F: Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome:

- Repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenetics and Genome Research* 98: 76.85 (2002).
- Mazzuchelli J, Martins C: Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 136:461-469 (2009).
- Medstrand P, van de Lagemaat LN, Dunn CA, Landry J-R, Svenback D, Mager DL: Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res* 110:342-352 (2005).
- Meli R, Prasad A, Patowary A, Lalwani MK, Maini J, et al: FishMap: A community resource for zebrafish genomics. *Zebrafish* 5(2):125-130 (2008).
- Muotri AR, Chu VT, Marchetto MCN, Wei Deng W, Moran JV, Gage FH: Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435:903-910 (2005).
- NCBI – National Center for Biotechnology Information: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Acessado 25/03/2009.
- Nelson JS: *Fishes of the world*, 4<sup>th</sup> ed (John Wiley and Sons, Inc. New York 2006).
- Nowak R: Mining treasures from “junk DNA”. *Science* 263:608-610 (1994).
- Oliveira C, Wright JM: Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Res* 6:205-211 (1998).
- Oliveira C, Chew JSK, Porto-Foresti F, Dobson MJ, Wright JM: A LINE-like repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma* 108:457-468 (1999).
- Oliveira C, Wang Y, Bryden LJ, Wright JM: Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent *in situ* hybridization. *Caryologia* 56:181-189 (2003).
- Orgel LE, Crick FHC. Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature* 284:604-607 (1980).
- Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau J-P, Volff J-N: Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarct Sci* 16:51-57 (2004).

- Peaston A, Evsikov A, Graber J, de Vries W, Holbrook A, Solter D, Knowles B: Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 7(4):597-606 (2004).
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934-2938 (1986).
- Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B: Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409:72-82 (2008).
- Ramel C: Mini- and microsatellites. *Environ Health Perspect* 105:781-789 (1997).
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A: Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 120:351-357 (2008).
- Salzburger W, Meyer A: The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91:277-290 (2004).
- Salzburger W, Meyer A, Baric S, Verheyen E, Sturmbauer C: Phylogeny of the lake Tanganyika cichlid species flock and its relationship to the central and east african haplochromine cichlid fish faunas. *Syst Biol* 51:113-135 (2002).
- Salzburger W, Mack T, Verheyen E, Meyer A: Out of Tanganyika: Genesis, explosive speciation, key-innovations and phylogeography of the haplochromine cichlid fishes. *BMC Evol Biol* 5:17 (2005).
- Sambrook J, Russel DW: Molecular cloning. A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001).
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard H: Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294:109-115 (2001).
- Shapiro JA, Sternberg RV: Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol Rev* 80:1-24 (2005).
- Shedlock AM, Takahashi K, Okada N: SINEs of speciation: tracking lineages with retroposons. *Trends Ecol Evol* 19(10):545-553 (2004).
- Smith WL, Chakrabarty P, Sparks JS: Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24:625-641 (2008).

- Sparks JS, Smith WL: Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics* 20:501-517 (2004).
- Steinemann S, Steinemann M: Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* 110:134-143 (2005).
- Stiassny ML: Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview, in Keenleyside MHA (ed): *Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution*, pp 1-35 (Chapman and Hall, London 1991).
- Syvanen M: Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annu Rev Genet* 28:237-261 (1994).
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Poletto AB, Venere PC, Martins C: Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenet Genome Res*. No prelo.
- The Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815 (2000).
- The international cichlid genome consortium: Genetic basis of vertebrate diversity: the cichlid fish model. Disponível no site <http://hcgs.unh.edu/cichlid/> Acessado em 25 de Junho de 2009.
- Thompson KW: Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia* 1979: 679-691 (1979).
- Thompson KW: Karyotypes of six species of African Cichlidae (Pisces: Perciformes). *Experientia* 37:351-352 (1981).
- Trewavas E: Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia* (British Museum Natural History, London 1983).
- Turner GF: Adaptive radiation of cichlid fish. *Curr Biol* 17:827-831 (2007).
- Turner GF, Seehausen O, Knight ME, Allender CJ e Robinson RL: How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Mol Ecol* 10:793-806 (2001).
- Verheyen E, Salzburger W, Snoeks J, Meyer A: Origin of the superflock of cichlid fishes from lake Victoria, East Africa. *Science* 300: 325-329 (2003).
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia* 59(3):260-266 (2006).



- Volff JN, Korting C, Sweeney K, Schartl M: The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol* 16:1427–1438 (1999).
- Volff JN, Körting C, Schartl M: Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol* 17:1673–1684 (2000).
- Volff JN, Körting C, Meyer A, Schartl M: Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in Fish. *Mol Biol Evol* 18(3):427–431 (2001a).
- Volff JN, Körting C, Froschauer A, Sweeney K, Schartl M: Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *J Mol Evol* 52: 351–360 (2001b).
- Volff JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C: Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends Genet* 19(12):674-678 (2003).
- Watanabe M, Kobayashi N, Fjiyama A, Okada N: Construction of a BAC library for *Haplochromis chilotes*, a cichlid fish from Lake Victoria. *Genes Genet Syst* 78:103-105 (2003).
- Watanabe WO, Losordo TM, Fitzsimmons K and Hanley F: Tilapia production systems in the Americas: Technological advances, trends, and challenges. *Rev Fish Sci* 10:465-498 (2002).
- Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Nurul-Islam-Faridi M, Stelly DM: A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. *Genome* 40:138-142 (1997).

**ANEXO 1. Manuscrito aceito para publicação na revista Cytogenetic and Genome Research:**

**Chromosome evolution in African Cichlidae fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs**

Irani A Ferreira<sup>1</sup>, Andréia B Poletto<sup>1</sup>, Jose Mota-Velasco<sup>2</sup>, David J. Penman<sup>2</sup>, Thomas Kocher<sup>3</sup>, Cesar Martins<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, UK.

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Maryland, College Park, MD 20742 USA.

\*Send correspondence to C Martins, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brazil. Telephone/Fax: ++55(14)38116264; E-mail: [cmartins@ibb.unesp.br](mailto:cmartins@ibb.unesp.br)

## **Abstract**

Cichlid fishes have been the subject of increasing scientific interest because of their rapid adaptive radiation that has led to an extensive ecological diversity and because of their enormous importance to tropical and subtropical aquaculture. To further understand the chromosome evolution among cichlid species, we have comparatively mapped the SATA satellite DNA, the transposable element *ROn-1*, and repeated sequences inserted in the clone BAC-C4E09 on the chromosomes of different African species of Cichlidae, using fluorescence in situ hybridization. The SATA satellite DNA was mapped in almost all the centromeres of all cichlid species. The maintenance and centromeric distribution of the SATA satellite DNA in African cichlids suggest that this sequence can play an important role in the organization and function of the centromere in these species. Furthermore, analysis of SATA element distribution clarifies that chromosome fusions occurred independently in *Oreochromis* and *Tilapia* genera, and lead to the reduced chromosome number detected in *T. mariae*. The comparative chromosome mapping of *ROn-1* SINE-like element and the BAC-C4E09 shows the repeated sequences have been maintained among tilapiine and non-tilapiine fishes and demonstrated the homology of the largest chromosome pair in tilapiines and non-tilapiines. Furthermore, the mapping of *ROn-1* suggested that different chromosomal rearrangements could have occurred in the origin of the largest chromosomes pairs of tilapiines and non-tilapiines.

## Introduction

The Family Cichlidae is one of the most species-rich families of fishes. They are present in fresh and brackish water, from Central and South America (one species extending North to Texas, USA), to the West Indies, Africa, Madagascar, Israel, Syria, coastal India, and Sri Lanka (Nelson, 2006). This family has attracted the attention of biologists due its rapid radiation into almost 2,000 species in the Great Lakes of East Africa (Kocher, 2004). In addition, some species of Cichlidae, like the tilapiines, are very important for aquaculture and fisheries. Nowadays, the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, represents one of the most widely farmed freshwater fish in the world (FAO 2006). Although the genomes of several African cichlid species will soon be sequenced (The international cichlid genome consortium, 2006), knowledge of cichlid genomes is rather preliminary, and far behind pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) (Jaillon et al., 2004), zebrafish (*Danio rerio*) (Meli et al., 2008) and medaka (*Oryzias latipes*) (Kasahara et al., 2007). So it is therefore of particular interest to investigate the chromosome structure of some representative taxa of the Cichlidae clade. The karyotypic formulae of 135 species of cichlids have been determined (Feldberg et al., 2003). Although more than 60% of the species present a karyotype with  $2n=48$ , the diploid number ranges from  $2n=32$  to  $2n=60$ , (Feldberg et al., 2003). African cichlids have a modal diploid number of 44 chromosomes whereas the Neotropical cichlids  $2n=48$  chromosomes (Feldberg et al., 2003). Furthermore, the chromosomal rearrangements that took place during the evolution and diversification of cichlid subfamilies remain obscure. Molecular cytogenetic techniques represent powerful tools to decipher the chromosomal rearrangements that were involved in the karyotype diversification of cichlids. Repeated DNA sequences have been extensively applied among fishes for purposes of chromosome physical mapping because they can be easily isolated from genomes and are easily visualized on chromosomes. Fishes, like many eukaryote organisms, contain a great number of tandem repeats and transposable elements in their genomes that are spread over the chromosomes, with particular enrichment in centromeric and telomeric heterochromatin, as well as the sex chromosomes (Martins, 2007). Despite intensive study in recent decades, the molecular forces that generate, propagate and maintain repetitive DNAs in the genome are still under discussion (Biemont and Vieira, 2006). A complete understanding of the relationship between chromosome structure and function requires the understanding of the repetitive segments. Also,

the integration of DNA sequences with physical chromosome mapping of repetitive DNAs can provide a better landscape of the genome, not yet clearly defined even in the completely sequenced genomes.

Repeated DNA sequences have been applied as chromosome markers to clarify several issues involving species evolution, chromatin composition, chromosomal rearrangements, sex chromosome, extra chromosomes, and applied genetics. To further understanding chromosome evolution among cichlid species, we have comparatively mapped different classes of repeated DNAs in different African cichlid species. The results obtained contribute to an understanding of the chromosome rearrangements that took place during the evolutionary history of cichlids.

## **Materials and Methods**

### *Animal samples and chromosome preparation*

Mitotic chromosomes of different cichlid species were prepared from anterior kidney cells with in vivo colchicine treatment (Bertollo et al., 1978). The species used in this work and their origin are specified in the Table 1.

### *Chromosome mapping of repeated DNA sequences through fluorescence in situ hybridization (FISH)*

Mitotic chromosome spreads were subjected to FISH (Pinkel et al., 1986) using the SATA satellite DNA (Ferreira and Martins, 2008), the transposable element *RON-1* (Bryden et al., 1998), and repeated sequences from a BAC-clone (#01b03TI074A.E09) previously characterized from the genome of *Oreochromis niloticus* (Katagiri et al, 2005; Ferreira and Martins, 2008). The probes were labeled by nick translation with biotin-14-dATP (Bionick labeling system-Invitrogen). Metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 mg/ml) for 1.5 h at 37°C. After chromosomal DNA denaturation in 70% formamide/2xSSC for 4 min at 70°C, hybridization mixtures containing 100 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2xSSC, and 50% formamide in a final volume of 30 µl, were dropped on the slides and the hybridization was performed overnight at 37°C in 2xSSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 37°C in 2xSSC/50%formamide for 15 min, followed by a second wash in 2xSSC for 15 min, and a final wash at room temperature in 4 x SSC for 15 min. Detection of hybridized

probes was carried out with 0.07% avidin-FITC conjugate (Sigma) in C buffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/0.15 M NaCl) for 1 h followed by two rounds of signal amplification using 2.5% antiavidin biotin conjugate (Sigma) in blocking buffer (1.26% NaHCO<sub>3</sub>, 0.018% sodium citrate, 0.0386% triton and 1% non-fat dried milk) for 30 min. Each treatment with anti-avidin biotin conjugate was followed by a treatment with avidin-FITC. The treatments with avidin-FITC and anti-avidin–biotin were conducted in a 2xSSC moist chamber at 37°C. After each amplification step, the slides were washed three times for 5 min each in blocking buffer at 42°C. The post-hybridization washes were conducted in a shaker (150 rpm). Chromosomes were counterstained with propidium iodide (PI) (0.2%) diluted in antifade (Vector). Hybridized chromosomes were analyzed using an Olympus BX 61 microscope and the images captured with a digital camera Olympus DP70 with the software Image-ProMC 6.0. Karyotypes were arranged as meta-submetacentric (m/sm) and subtelo-acrocentric (st/a) in decreasing size of the chromosomes with Adobe Photoshop v. 7.0 software.

## **Results and Discussion**

### Chromosome mapping of SATA satellite DNA

The SATA satellite DNA is a family of tandem repeat sequences with three size variants, type I (237 bp-base pairs), type II (230 bp) and type III (209 bp), conserved in the genome of tilapiine and haplochromiine cichlid species (Franck et. al., 1992; Franck et. al., 1994). In some *Oreochromis* species the copy number of this sequence represents 1.6 % of the haploid genome content, but somewhat less than this in haplochromine genomes. This difference may indicate a major amplification of the SATA array after the divergence of the tilapiine fish from the haplochromine lineage (Franck et. al., 1994).

More recently this repetitive sequence was isolated from *Oreochromis niloticus* genome through C<sub>0</sub>t-1 DNA method, which was used to isolate the highly repeated DNA fraction of the genome (Ferreira and Martins, 2008). The clone On11013-5.4, containing the SATA satellite DNA type I, was isolated from *O. niloticus* and used as probe for chromosome mapping, through fluorescence *in situ* hybridization, in the chromosomes of *Oreochromis niloticus*, *O. aureaus*, *O. mossambicus*, *O. mortimeri*, *Tilapia mariae*, *Tilapia rendalli*, *T. zillii*, *Haplochromis obliquidens* and *Melanochromis auratus* (Figure 1). The distribution of hybridization signals were observed in almost all the centromeres of all analyzed species, (Figure 1).

In *Tilapia zillii* it was observed the SATA satellite DNA in just one chromosome member of the biggest pair (Figure 1i). The heterochromatin distribution analyses in *T. zillii* have shown centromeric heterochromatin only in some chromosomes, whereas 10 to 12 chromosomes did not have clearly heterochromatic blocks (Majumdar and McAndrew, 1986). The chromosomal mapping of centromeric SATA satellite in *T. zillii* seems to be related with the heterochromatin distribution, suggesting that the centromeric heterochromatins of this species is most composed of SATA satellite.

The species of *Oreochromis* seem to be highly conservative in relation to karyotype evolution, with most of them showing 44 chromosomes, except for *Oreochromis alcalicus* with 48 chromosomes (reviewed in Feldberg et al., 2003) and *Oreochromis karongae* with 38 chromosomes (Harvey et al., 2002). The reduction of the chromosome number in *O. karongae* is related with the presence of three pairs of medium-sized not found in typical *Oreochromis* species, which were originated by chromosome fusion (Harvey et al., 2002). The mapping of the satellite DNA in *O. karongae* has shown signals in all centromere and in the interstitial position of the 3 medium-sized pairs (Mota-Velasco et al., in preparation). The interstitial SATA sites are relics of ancient centromeres and prove that fusions occurred in the *O. karongae* chromosomes.

The chromosome number of *Tilapia mariae* is also reduced,  $2n=40$  (Thompson, 1981, Figure 1 of present work). This reduction could be the result of two different chromosome fusions that originated the m/sm chromosome pairs 1 and 2 observed in *T. mariae* (Figure 1d) that are not observed in the other *Oreochromis* and *Tilapia* species (Majumdar and McAndrew, 1986; Feldberg et al., 2003, present work). The SATA was mapped in almost all centromeres of *T. mariae*, mainly in the two m/sm largest pairs, with no interstitial signals, suggesting that the fusions occurred between two small chromosomal pairs with the lost of their small arms (Figure 1d). The absence of SATA in some centromeric regions in *T. mariae* and *Melanochromis auratus* could be related to differentiation in their genomes after the divergence of the other groups.

The maintenance and centromeric distribution of the SATA satellite DNA in *Oreochromis*, *Haplochromis* and *Melanochromis* species suggest that this sequence is playing an important role in the organization and function of the centromere in these species. Different species of eukaryotes have shown the presence of satellite-

DNAs in the centromere and pericentromeric regions, implying that these sequences play a fundamentally important functional role in these regions, and also in the formation and maintenance of heterochromatin (Plohl et al., 2008).

#### Chromosome mapping of BACs (Bacterial Artificial chromosomes) enriched with repeated DNA sequences

BACs containing repeated DNA sequences isolated from *O. niloticus* genome were previously mapped in the chromosomes of this species which showed a distribution in centromeric, telomeric and/or interstitial regions in almost all chromosomes of the complement (Ferreira and Martins, 2008). The most outstanding characteristic was the enrichment of repetitive DNA distribution in the large chromosome pair of *O. niloticus* (pair 4) (Ferreira and Martins, 2008). The BAC-C4E09 was mapped in the present work in chromosomes of *O. niloticus*, *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* and *Labeotropheus trewavasae* (Figure 2). BAC-C4E09 showed strong signals in short arm of the biggest m/sm chromosome pair (pair 1) of the non-tilapiine species, in the telomeric region of the st/t chromosome pair 12 of *H. obliquidens*, in the centromeric/short arm regions of chromosome pairs 4, 5, 8, 11, 13 and 19 of *M. auratus*, and in an interstitial position of chromosome pair 11 of *Labeotropheus trewavasae* (Figure 2). The nucleotide sequencing of subcloned DNA segments of BAC-C4E09 identified repeated DNA sequences that were previously mapped in the chromosomes of *Oreochromis niloticus* (Oliveira and Wright, 1998; Oliveira et al., 1999; Harvey et al. 2003). The CiLINE2 transposable element, present in this BAC, is distributed mainly in the biggest chromosome pair of Nile tilapia and SATB satellite DNA showed a strong signal near the telomere of a small pair (Oliveira and Wright, 1998, Oliveira et al., 1999).

The presence of large blocks of hybridization of BAC-C4E09 in the largest chromosome pair of *O. niloticus* (pair 4) and in the largest chromosome (pair 1) of all the non-tilapiine analyzed, suggests homology between both chromosomes.

#### Chromosome mapping of *RON-1* transposable element

The *RON-1* transposable element was mapped through FISH in the chromosomes of *Oreochromis niloticus*, *Astatotilapia burtoni*, *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* and *Hemichromis bimaculatus*, and showed only one interstitial cluster in the long arm of the largest chromosome pair, being pair 4 in



*O. niloticus*, and pair 1 in the non-tilapiines (Figure 3). In *O. niloticus* the *ROn-1* signal is in the middle of the long arm of a st/a chromosome (pair 4). Although previous studies have detected dispersed *ROn-1* signals in several chromosomes of the complement of *O. niloticus* (Oliveira et al., 2003), this was not observed in the present analysis. In the other cichlid species analyzed in this work this transposable element is clustered near the telomere in the long arm of the largest m/sm pair (pair 1) (Figures 3). These results indicate that the cluster containing the transposable element *ROn-1* is conserved between cichlid species and that the st/a chromosome pair 4 of *O. niloticus* is homologous to the m/sm chromosome pair 1 of the non-tilapiine species.

The major feature in the karyotype of tilapiine cichlids is the presence of one big st/a chromosome pair, which is significantly larger than all the others in the karyotype, and it is not present in the non-tilapiine cichlid species (Majumdar and McAndrew, 1986; Poletto et al. 2009, in preparation). On the other hand, the haplochromine and hemichromine cichlids have shown two outstanding chromosome pairs, the m/sm pair 1 and the st/a pair 2, that are larger than the rest of chromosomes in the karyotype (Poletto et al., 2009, in preparation; Figure 3). According to chromosome *in situ* hybridization using telomeric probes, it has been proposed that the larger chromosome pair of *O. niloticus* originated by a centric fusion event of three other pairs of the ancestral cichlid karyotype composed of 48 acrocentric chromosomes (Chew et al., 2002). According to previous information, and in the results presented here, we propose that a first chromosome fusion took place before the divergence of the main cichlid groups, and reduced their karyotype from the ancestral  $2n=48$  acrocentric pattern (Chew et al., 2002; Teixeira et al., *in press*) to generate the proto-large chromosome of *O. niloticus* and the proto-pair 1 of the non-tilapiines (Figure 4). The second event of chromosome fusion occurred independently in the tilapiines and non-tilapiines. In the tilapiines a new chromosome was fused to the largest pair originating the actual pair 4. In the non-tilapiines, the second fusion involved two other chromosomes giving the chromosome pair 2 (Figure 4).

The *ROn-1* repeated sequence is a SINE-like element that was isolated from *O. niloticus* and represents a potential marker for evolutionary and phylogenetic studies because variant forms are specific to a particular taxonomic unit (Bryden et al., 1998). This element is 345 bp long and the haploid genome of tilapia contains

approximately 3,000 copies (Oliveira et. al., 2003). The Southern blot hybridization indicated the presence of *ROn-1* in the genomes of the tilapiines *Oreochromis*, *Sarotherodon* and *Tilapia*, haplochromine species, and in *Hemichromis* and *Pelvicachromis* (Bryden et. al., 1998). However, the results of a Southern blot indicated that non-tilapiine species have less *ROn-1* in their genomes than tilapiine cichlids, either because of sequence divergence or fewer copies of this element (Bryden et. al., 1998). The chromosomal distribution of *ROn-1* element among cichlids represents a powerful tool to trace the mechanisms involved in the evolution of the largest chromosome pair of the African cichlids.

#### Distribution of repetitive DNAs and chromosome evolution in cichlids

The cytogenetic mapping of repeated DNAs in cichlids evidenced that specific patterns of chromosome rearrangements could have occurred during their evolutionary history. Chromosome fusions occurred independently in *Oreochromis* and *Tilapia* genera, giving the reduced chromosome number detected in *O. karongae* and *T. mariae*. On the other hand, it seems plausible that two chromosomal fusions, the first one occurring before the divergence of the main groups of cichlids, and the second one occurring independently in tilapiines and non-tilapiines (Figure 4) also have acted in the diversification of African cichlid karyotypes. The chromosome mapping of BAC-C4E09 and *ROn-1* transposable element in tilapiines and non-tilapiines detected homology between the largest chromosome pair of the tilapiines (pair 4 in *O. niloticus*) and the largest m/sm chromosome pair (pair 1) of the non-tilapiine species.

Synaptonemal complex analysis has proposed that the biggest pair of *Oreochromis niloticus* represent the sex chromosomes (Foresti et. al., 1993, Carrasco et. al., 1999). However, Cnaani et. al., (2008) have been proposed that this larger chromosome pair in Nile tilapia may reflect a prior evolutionary history of this pair as a differentiated sex chromosome, and that the sex determination locus is now on a small chromosome. Several repetitive sequences are distributed along the large chromosome pair of *O. niloticus* (Ferreira and Martins, 2008, and references cited herein) with different pattern of hybridization, due the difference in the copy number of this repetitive sequence between the supposed X and Y chromosomes (Harvey et al., 2003). The presence of *ROn-1* and the repeated sequences inserted in the BAC-C4E09 clone in the largest chromosome of African cichlids suggest that the

accumulation and different copy number of this repeated sequences in this region influenced the early differentiation of the homologous sex chromosome. Further comparative analyses of the chromosomes of other non-tilapiines and South American cichlid species may be able to clarify other chromosomal rearrangements that were involved in the karyotype diversification in cichlids.

### Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

### References

A bibliografia do presente trabalho está listada no item número 6 – Referências Bibliográficas, da tese, na página 66.

### Table

Table 1: Species of cichlids analyzed and their origin.

Species	Origin of specimens
<i>Oreochromis aureus</i>	Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland
<i>Oreochromis mortimeri</i>	Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland
<i>Oreochromis niloticus</i> -XY	Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland
<i>Tilapia rendalli</i>	Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland
<i>Tilapia zilli</i>	Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland
<i>Tilapia mariae</i>	Tropical Aquaculture Facility, University of Maryland, USA
<i>Astatotilapia burtoni</i>	Tropical Aquaculture Facility, University of Maryland, USA
<i>Haplochromis obliquidens</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil
<i>Melanochromis auratus</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil
<i>Labeotropheus trewavase</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil

## Figure captions

Figure 1: Chromosome mapping of SATA satellite DNA in *Oreochromis niloticus* (a), *Oreochromis aureus* (b), *O. mossambicus* (c), *Tilapia mariae* (d), *Tilapia rendalli* (e), *Haplochromis obliquidens* (f), *Melanochromis auratus* (g), *O. mortimeri* (h) and *Tilapia zillii* (i). a-g represents arranged karyotypes, and h-i, metaphase spreads. The chromosomal sites of the SATA satellite were labeled with FITC (yellow) and the chromosomes were counterstained with propidium iodide (red). The meta-submetacentric (m/sm) and the subtelo-acrocentric (st/a) chromosomes are indicated. The arrows indicate the first chromosome pair in (i). Bar = 5  $\mu$ m.

Figure 2: Chromosome mapping of the clone BAC-C4E09 in *Oreochromis niloticus* (a), *Haplochromis obliquidens* (b), *Melanochromis auratus* (c) and *Labeotropheus trewavasae* (d). The chromosomal sites of the BAC-C4E09 were labeled with FITC (yellow) and the chromosomes were counterstained with propidium iodide (red). The meta-submetacentric (m/sm) and the subtelo-acrocentric (st/a) chromosomes are indicated. Bar = 5  $\mu$ m.

Figure 3: Chromosome physical mapping of *ROn-1* transposon in *Oreochromis niloticus* (a), *Astatotilapia burtoni* (b), *Haplochromis obliquidens* (c), *Melanochromis auratus* (d) and *Hemichromis bimaculatus* (e). The meta-submetacentric (m/sm) and the subtelo-acrocentric (st/a) chromosomes are indicated. Bar = 5  $\mu$ m.

Figure 4: Idiograms showing the possible fusions occurred during the chromosomal diversification of African cichlids.

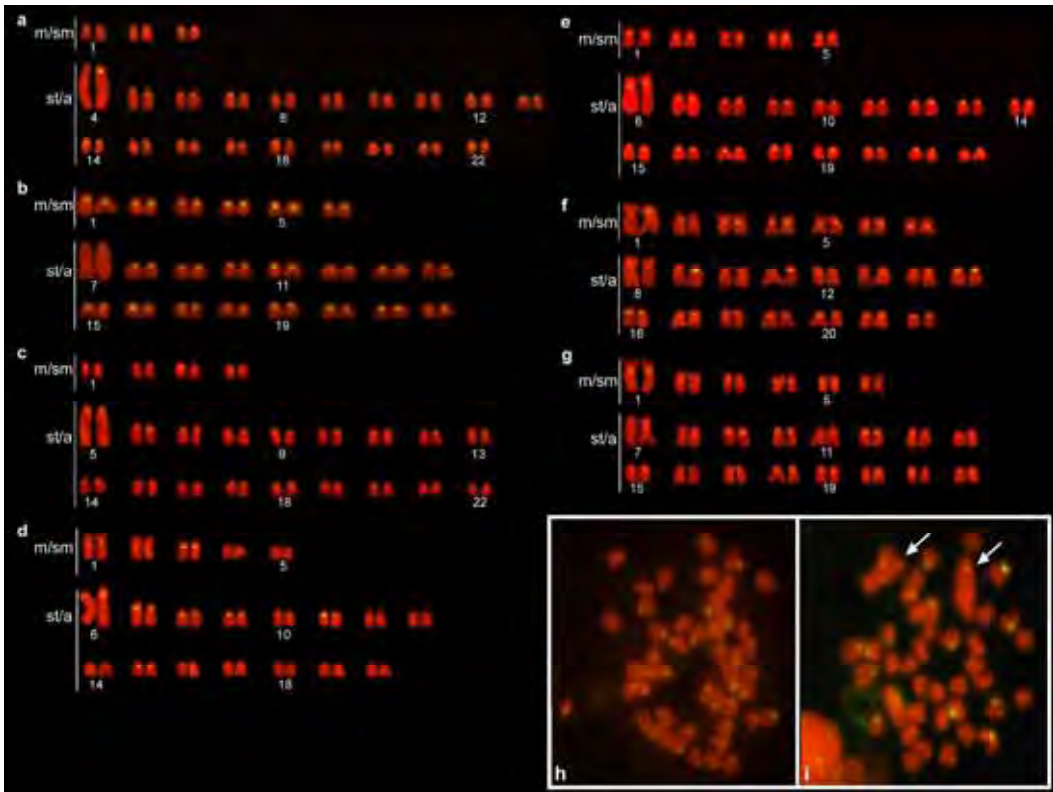


Figure 1

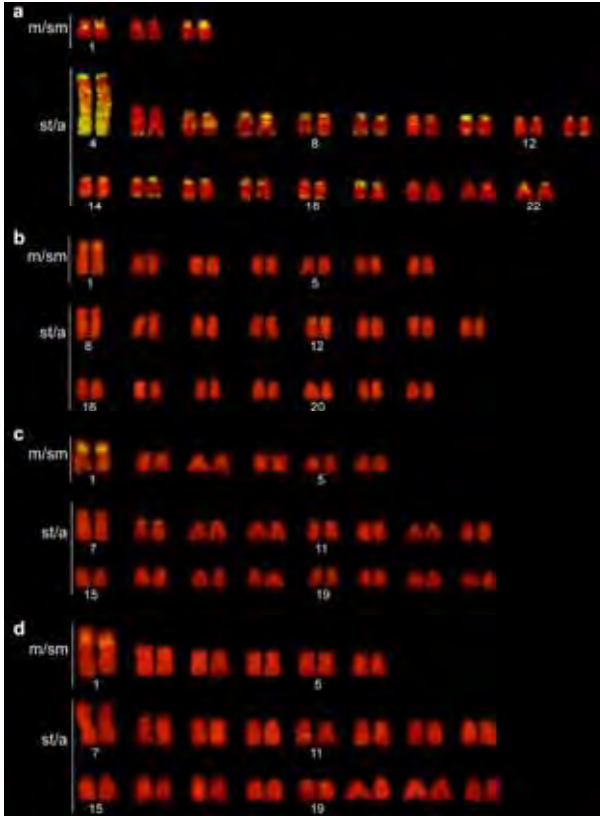


Figure 2

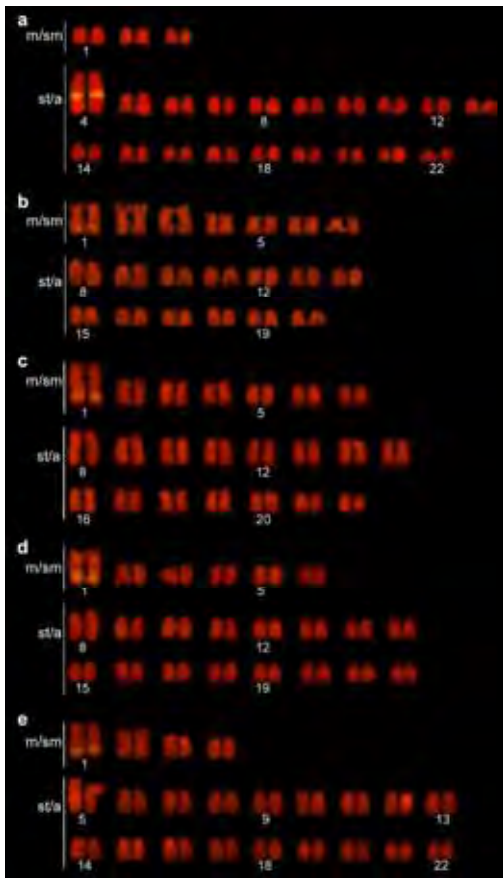


Figure 3

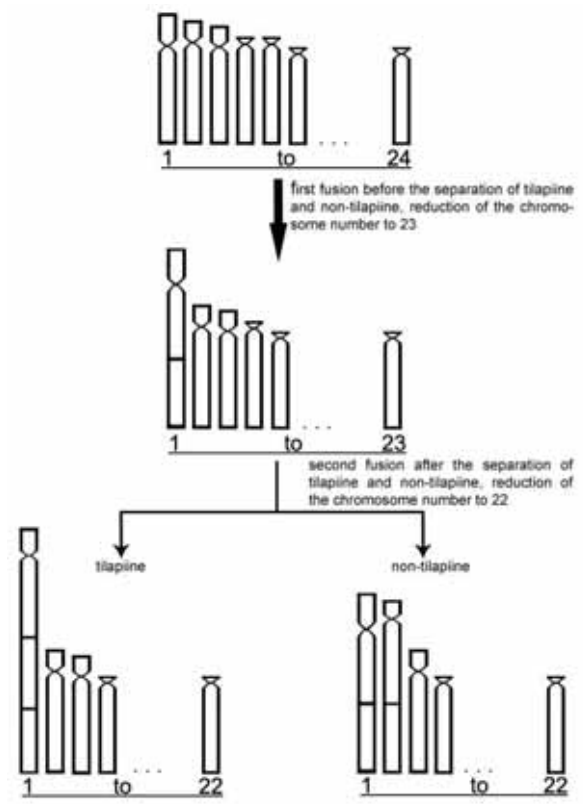


Figure 4

**Anexo 2. Manuscrito em preparação:**

**Chromosome evolution in African and South American Cichlidae fish:  
contributions from the physical mapping of *Rex* retrotransposons**

Irani A Ferreira<sup>1</sup>, Juliana Mazzuchelli<sup>1</sup>, Andréia B Poletto<sup>1</sup>, Thomas D. Kocher<sup>2</sup>,  
Cesar Martins<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Maryland, College Park, MD 20742 USA.

\*Send correspondence to C Martins, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brazil. Telephone/Fax: ++55(14)38116264; E-mail: [cmartins@ibb.unesp.br](mailto:cmartins@ibb.unesp.br)

## **Abstract**

The transposable elements comprise a large fraction of the genome, like the human genome, where they represent 45% of the genome. The distribution of transposable elements (TEs) between heterochromatic and euchromatic regions is variable in different genomes, but it appears the density of TEs is negatively correlated with recombination rate, and they tend to accumulate in the centromeric and/or heterochromatic regions of chromosomes. The presence of TEs in these areas can be correlated with a role of the repeated sequences in the structure and organization of centromeric and heterochromatic areas. Most of TEs are also involved with chromosome rearrangements like fusions, translocations, and inversions. To further understanding on the organization of genome and chromosome evolution of cichlid species, we have isolated and comparatively mapped the transposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, which are conserved in teleost fishes, in the chromosomes of African and South American cichlid species. Most of species, with the exception of *Oreochromis niloticus*, have strong clusters of all TE in centromeric areas, coincident with the heterochromatic area, and few interstitial signals. In *O. niloticus* the retrotransposons have been mapped dispersed in almost all chromosomes, with strong signals in the long arm of the largest pair that originated by chromosome fusion, suggesting that these transposable elements were accumulated in the chromosome that gave origin to the largest chromosome pair in this species. The other species that have shown interstitial signals of *Rex* were those ones with fewer changes in the karyotype, indicating that the accumulation of *Rex* in centromeric areas could be related with more rearranged karyotypes.



## Introduction

Different categories of repeated sequences are observed in eukaryote organisms and form an important fraction of their genomes. For instance, in onion, 95% of the genome is composed of these sequences; humans contain about 50% of repetitive sequences in their genomes; the flowering plant *Arabidopsis thaliana* has 14% of the repeated sequences corresponding to transposons and the fish *Tetraodon nigroviridis*, that is among the smallest known vertebrate genomes, about 10% of the sequences are tandem or dispersed repeats (Flavell et. al., 1994, International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Dasilva et. al., 2002). There are two major classes of repeated sequences: (i) tandem repeats, which include the satellite, minisatellite and microsatellite DNAs, and (ii) dispersed sequences that include transposons, the elements that transpose directly through DNA copies, and retrotransposons, which transpose through an intermediate RNA molecule that is reverse transcribed (Charlesworth et. al., 1994; Böhne et al, 2008).

Minisatellites and microsatellites are organized in short tandem repeat arrays, are highly variable within a population and are located in euchromatic regions. Satellite DNAs are organized as large clusters in the heterochromatic regions of the chromosomes mostly in centromeric and telomeric areas (Charlesworth et. al., 1994; Ramel, 1997; Plohl et. al., 2008). The presence of at least one satellite DNA family in the centromeres of several eukaryotes indicates a possible role of these sequences in chromosome organization and correct segregation during the cell division process. Even though the great diversity of satellite DNAs, in nucleotide sequence, genomic abundance, diversity of families, and chromosomal protein content, the satellite DNAs are the main element of centromeric and pericentromeric heterochromatin (Plohl et. al., 2008).

The distribution of TEs between heterochromatic and euchromatic regions is variable in different genomes, but it appears that the density of TEs is negatively correlated with recombination rate, and they are more abundant in noncoding regions (Kidwell, 2005). The centromeres of a number of species have also shown TEs interspersed with satellite sequences (Hua-Van et. al., 2005). The satellite DNA amplification together with retrotransposon accumulation in the centromeres indicates an important role for the expansion and stabilization of this chromosome region (Plohl et. al., 2008). Besides the preferential distribution of TEs in noncoding regions, they

have a different distribution among and within chromosomes, being found more associated with sex chromosomes than autosomes, probably because a higher concentration of heterochromatin in these chromosomes (Kidwell, 2005).

TEs were long considered to be junk DNA because they had no clearly identified function and they were believed not to be transcribed in eukaryotes (Doolittle & Sapienza 1980). However, data accumulated from eukaryotic species has challenged this view over the past few years and actually it is emerging that these elements have had a significant influence on the evolution of genomes, particularly by controlling gene activity (Biémont e Vieira, 2006). For example some retrotransposons can influence the regulation of certain host genes and affect developmental processes in mouse oocytes and preimplantation embryos (Peaston et al., 2004). Other type of transposon, such LINE-1 retrotransposons, seem to jump preferentially into the regulatory regions of certain neuronal genes in mice (Muotri, et al. 2005) altering their expression, creating distinct populations of neuronal cells. These mutational activities contribute to the genetic diversity of the organism (Biémont e Viera, 2006). This fact have played a very important role in the evolution of genome structure and gene function in vertebrates and other organisms, and have generated at least half of human and mouse genomes (Feschotte and Pritham, 2007). They provide a basis for genome rearrangements via homologous recombination and they can facilitate the loss or acquisition of genes during transposition events which may lead to horizontal gene transfer (Syvanen, 1994). The TEs are involved with chromosome rearrangements, since deletions, duplications, translocations, and inversions are very often associated with cytogenetically detectable heterochromatic regions composed of repetitive DNA (Raskina et al., 2008).

Fishes, like many eukaryote organisms, contain a great amount of tandem repeats and transposable elements in their genomes that are overspread in chromosomes with enrichment in centromeric, pericentromeric, telomeric and subtelomeric regions, and also in the sex chromosomes (Martins, 2007). The compact genomes of the both pufferfishes *Fugu rubripes* and *Tetraodon nigroviridis* contain a low quantity of repeated sequences, but a greater diversity of TEs families compared to the much larger human and mouse genomes (Volff et. al., 2003). Almost every class of known TEs in eukaryotes is represented in the pufferfish genome (Aparicio et. al., 2002).

The Family Cichlidae is one of the most species-rich families of fishes. They are present in the fresh and occasionally brackish water, distributed to Central and South America (one species extending north to Texas), West Indies, Africa, Madagascar, Israel, Syria, coastal India, and Sri Lanka (Nelson, 2006). This family has attracted the attention of biologists due the rapid radiation in the Great lakes of East Africa, producing almost 2,000 species in these lakes (Kocher, 2004). In addition, some species of Cichlidae, like the tilapiines, are very important for aquaculture and fisheries. Cytogenetic studies showed that most of cichlids from Central and South America have 48 chromosomes and African species have 44 chromosomes (Feldberg et al., 2003), with some different chromosome pairs between tilapiine and haplochromine groups (Poletto et al, in preparation). To further understanding on the organization of genome and chromosome evolution of cichlid species, we have isolated and comparatively mapped the transposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, which are conserved in teleosts fishes, in the chromosomes of African and South American cichlid species.

## **Material and methods**

### *Fish samples and chromosome preparation*

South American fish species were collected from Araguaia River (São Félix do Araguaia and Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil) and Tietê River (Botucatu, São Paulo State, Brazil), according to Brazilian laws for environmental protection (wild collection permit, SISBIO/15729-1), and African cichlid species were obtained from aquarium petshop. The species used in this work and their origin are specified in the Table 1. Tissue samples were collected from the animals and stored in 100% ethanol, and the genomic DNA was extracted using standard phenol-chloroform procedures (Sambrook and Russel, 2001). Metaphasic chromosome spreads were prepared from anterior kidney cells with in vivo colchicine treatment (Bertollo et al., 1978).

### *Isolation of repeated DNA elements*

The retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* were isolated by PCR (Polimerase Chain Reaction) with the primer sets, as follows: *Rex1* element primers *Rex1f* (5'-TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC) and *Rex1r* (5'-TCC CTC AGC AGA AAG AGT

CTG CTC) (Volf et al., 2000); the *Rex3* element primers *Rex3f* (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG) and *Rex3r* (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volf et al., 1999); and the *Rex6* element primers *Rex6f* (5'-TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC) and *Rex6r* (5'-GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG) (Volf et al., 2001).

#### *Chromosome in situ hybridization*

Mitotic chromosomes were submitted to FISH (Fluorescence in situ hybridization) (Pinkel et al., 1986) using the PCR products from the repetitive elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* as probes. The probes were labeled by nick translation with biotin-14-dATP. The metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 µg/ml) for 1.5h at 37 °C. After the chromosomal DNA was denatured in 70% formamide/2x SSC for 40 seconds at 70 °C, the hybridization mixtures, which contained 100 ng of the denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2x SSC and 50% formamide in a final volume of 30 µl, were dropped on the slides, and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a 2x SSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 37 °C in 2x SSC/50% formamide for 15 min, followed by a second wash in 2x SSC for 15 min and a final wash at room temperature in 4x SSC for 15 min. Detection of the biotin labeled probes was carried out with Avidin-FITC (Sigma). Chromosomes were counterstained with propidium iodide (0.2 %) diluted in antifade (Vector). Hybridized chromosomes were analyzed using an Olympus BX 61 microscope, and the images were captured with the Olympus DP70 digital camera with the software Image-Pro MC 6.0. Karyotypes were arranged in order of decreasing chromosome size.

#### **Results and discussion**

The retrotransposons *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* generated an electrophoretic DNA bands between 400 and 600 bp. The primer sets employed were very efficient in the amplification of these DNA fragments by PCR and have been employed in the isolation of these repeated elements in different fish groups (Capriglione et al., 2002; Ozouf-Costaz et al., 2004) including the South American cichlid *Cichla kelberi* (Teixeira et al, *in press*). The PCR-isolated *Rex1* segments correspond to the encoding domains 3-7 of the reverse transcriptase (RT) gene (Volf et al., 2000). The *Rex3* corresponds to the encoding domain 1, 2, 2A, A and B of the RT gene (Volf et

al., 1999) and the obtained *Rex6* fragment correspond to the C-terminal part of the restriction enzyme-like endonuclease of the retrotransposon element (Volf et al., 2001). Previous studies have shown that these transposable elements are widely distributed within fish genomes (Volf et al., 2001; Ozouf-Costaz et al., 2004; Teixeira et al. *in press*).

The chromosome mapping of TEs *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in *Oreochromis niloticus* have shown intense signals in centromeric and terminal areas of several chromosomes and all along the long arm of the largest chromosomal pair, and spread signals overall all chromosomes (Figures 1a, b and c). In *Hemichromis bimaculatus*, *Haplochromis obliquidens*, *Melanochromis auratus* and in the South American cichlids, *Astronotus ocellatus*, *Chaetobranchius flavescens*, *Satanoperca jurupari* and *Heros efasciatus*, the TEs were mapped mainly in the centromeric regions of all chromosomes, besides weak signals in the interstitial regions (Figures 1, 2, 3 and 4). Besides, clusters of *Rex3* TEs were detected in the terminal region of chromosome pair 8 of *Chaetobranchius flavescens* and *Satanoperca jurupari*, and terminal region chromosome pair 11 of *S. jurupari* (Figure 3). In the same way, clusters of *Rex6* TE seem to be in coincidence with *Rex3* TE in the pair 8 and 11 of *S. jurupari* (Figure 4).

The chromosome mapping of repeated elements *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* in the centromeric area coincided with heterochromatin distribution in the cichlid species (Majumdar and McAndrew, 1986; Feldberg et al., 2003, for review). This accumulation could be related to the involvement of repeated DNA elements with centromeric function (Dawe, 2003) or to the lower selective pressure that acts against repeated elements (Eickbush and Furano, 2002). Besides, TEs and related tandem repeats are responsible for the structure and organization of heterochromatin (Lippman et al., 2004).

The *Rex3* demonstrated less intense signals than the other elements in *H. bimaculatus* and *M. auratus*, what can be related with its low copy number in the genome of these species (Figure 1d-i). On the other hand, in *Chaetobranchius flavescens* and *Satanoperca jurupari*, *Rex3* has shown more intense signals than *Rex1* and *Rex6*, as it has been observed for Notothenioidei Antarctic fishes, which *Rex3* was more abundant than *Rex1*, and was widely scattered on the chromosomes with more intense hybridization patterns in some specific chromosomal zones (Ozouf-Costaz et al., 2004). *Rex6* demonstrated more signals in the *Astronotus*

*ocellatus* and *Heros efasciatus* (Figures 2, 3 and 4). This element was already mapped in the cichlid species, *Cichla kelberi*, which shows that this element is not only compartmentalized to centromeric heterochromatin, but is also spread along all the chromosomes (Teixeira et al., *in press*). The differences in the copy number and chromosomal distribution of different *Rex* elements among the fish species suggest that the repetitive sequences of the common ancestor were independently amplified and/or translocated between different chromosomes in the descendant species.

The dispersed chromosome mapping of *Rex* in *Oreochromis niloticus* is similar to the distribution pattern of these retrotransposons in *Cichla kelberi* (Teixeira et al., *in press*), *Tetraodon nigroviridis* (Fischer et al., 2004) and Antarctic fishes (Ozouf-Costaz et al., 2004). In *Chionodraco hamatus*, the retrotransposon *Rex3* have also shown an intercalary band in the long arm of the male Y chromosome (Ozouf-Costaz et al., 2004). According to the authors, the *Rex* could have accumulated in the autosomes before the fusion that originated the Y chromosome, indicating that the transposable elements could be involved in the molecular differentiation of sexual chromosomes in *C. hamatus* (Ozouf-Costaz et al., 2004). In *O. niloticus*, the largest pair was also originated by chromosome fusion (Chew et al., 2002) and is enriched of *Rex* elements (Figures 1a, b and c), suggesting its involvement in the proposed chromosome fusions. Taking in account that the largest chromosome pair of *O. niloticus* may reflect a prior evolutionary history as a differentiated sex chromosome (Cnaani et al., 2008), the accumulation of *Rex* in its long arm, together with other repeated sequences (Harvey et al., 2003, Ferreira and Martins, 2008; Ferreira et al., *in preparation*), indicate that repetitive elements played important roles in the differentiation of this relic-sex chromosome.

The *O. niloticus*, *Chaetobranchius flavescens* and *Satanoperca jurupari* have shown a distribution pattern of *Rex*, with weak interstitial signals, similar to the results observed in *Cichla kelberi* (Teixeira et al., *in press*). The species *S. jurupari* and *C. flavescens* and *C. kelberi* belong to Cichlinae subfamily and *O. niloticus* to Pseudocrenilabrinae family (Smith et al., 2008). According to these authors *Cichla* is the sister-group of all cichlins and species of *Heros efasciatus* clade are more distantly related to the basal group. The karyotype of *H. efasciatus* have more m/sm chromosomes than *C. flavescens*, *S. jurupari* (Figures 2, 3 and 4) and *C. kelberi* (Teixeira et al., *in press*), which is more related to the possible ancestral karyotype for the cichlid groups, with  $2n=48$  st/a (Teixeira et al., *in press*). The change in the

karyotype could reflect the genome changes. Then, the accumulation of *Rex* in interstitial areas is more related with a karyotype with few changes, such as observed in *Cichla kelberi* (Teixeira et al, *in press*). More changes in the genome could be eliminating the transposable elements of interstitial sites and then they might be accumulated in the heterochromatic and centromeric areas.

The results obtained gave contributions in understanding the chromosome rearrangements that took place during the evolutionary history of cichlids. The chromosomal distribution and nucleotide sequences of these elements can provide information on the structure of the genome, the process of chromosomal evolution and the phylogenetic relationships among cichlids species.

## References

A bibliografia do presente trabalho está listada no item número 6 – Referências Bibliográficas, da tese, na página 66.

## Table

Table 1: Species of cichlids analyzed and their origin.

Species	Origin of specimens
<b>Cichlids from Africa</b>	
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tietê river, Botucatu, SP, Brazil
<i>Haplochromis obliquidens</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil
<i>Melanochromis auratus</i>	Aquarium, Botucatu, SP, Brazil
<b>Cichlids from South America</b>	
<i>Astronotus ocellatus</i>	Tietê River, Botucatu, SP, Brazil
<i>Chaetobranchus flavescens</i>	Araguaia River, São Félix do Araguaia, MT, Brazil
<i>Satanoperca jurupari</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil
<i>Heros efasciatus</i>	Araguaia River, São Félix do Araguaia, MT, Brazil

## Figure captions

Figure 1: Chromosome mapping of *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6*, respectively, in *Oreochromis niloticus* (a, b, c), *Hemichromis bimaculatus* (d, e, f), *Melanochromis auratus* (g, h, i) and *Haplochromis obliquidens* (j). The chromosomal sites of the *Rex* retrotransposons were labeled with FITC (yellow) and the chromosomes were counterstained with propidium iodide (red).

Figure 2: Chromosome mapping of *Rex1* in *Astronotus ocellatus* (a), *Chaetobranchius flavescens* (b), *Satanoperca jurupari* (c) and *Heros efasciatus* (d). The chromosomal sites of the *Rex* retrotransposons were labeled with FITC (yellow) and the chromosomes were counterstained with propidium iodide (red). The meta/submetacentric (m/sm) and subtelo/acrocentric (st/a) chromosomes are indicated.

Figure 3: Chromosome mapping of *Rex3* in *Astronotus ocellatus* (a), *Chaetobranchius flavescens* (b), *Satanoperca jurupari* (c) and *Heros efasciatus* (d). The chromosomal sites of the *Rex* retrotransposons were labeled with FITC (yellow) and the chromosomes were counterstained with propidium iodide (red). The meta/submetacentric (m/sm) and subtelo/acrocentric (st/a) chromosomes are indicated.

Figure 4: Chromosome mapping of *Rex6* in *Astronotus ocellatus* (a), *Chaetobranchius flavescens* (b), *Satanoperca jurupari* (c) and *Heros efasciatus* (d). The chromosomal sites of the *Rex* retrotransposons were labeled with FITC (yellow) and the chromosomes were counterstained with propidium iodide (red). The meta/submetacentric (m/sm) and subtelo/acrocentric (st/a) chromosomes are indicated.



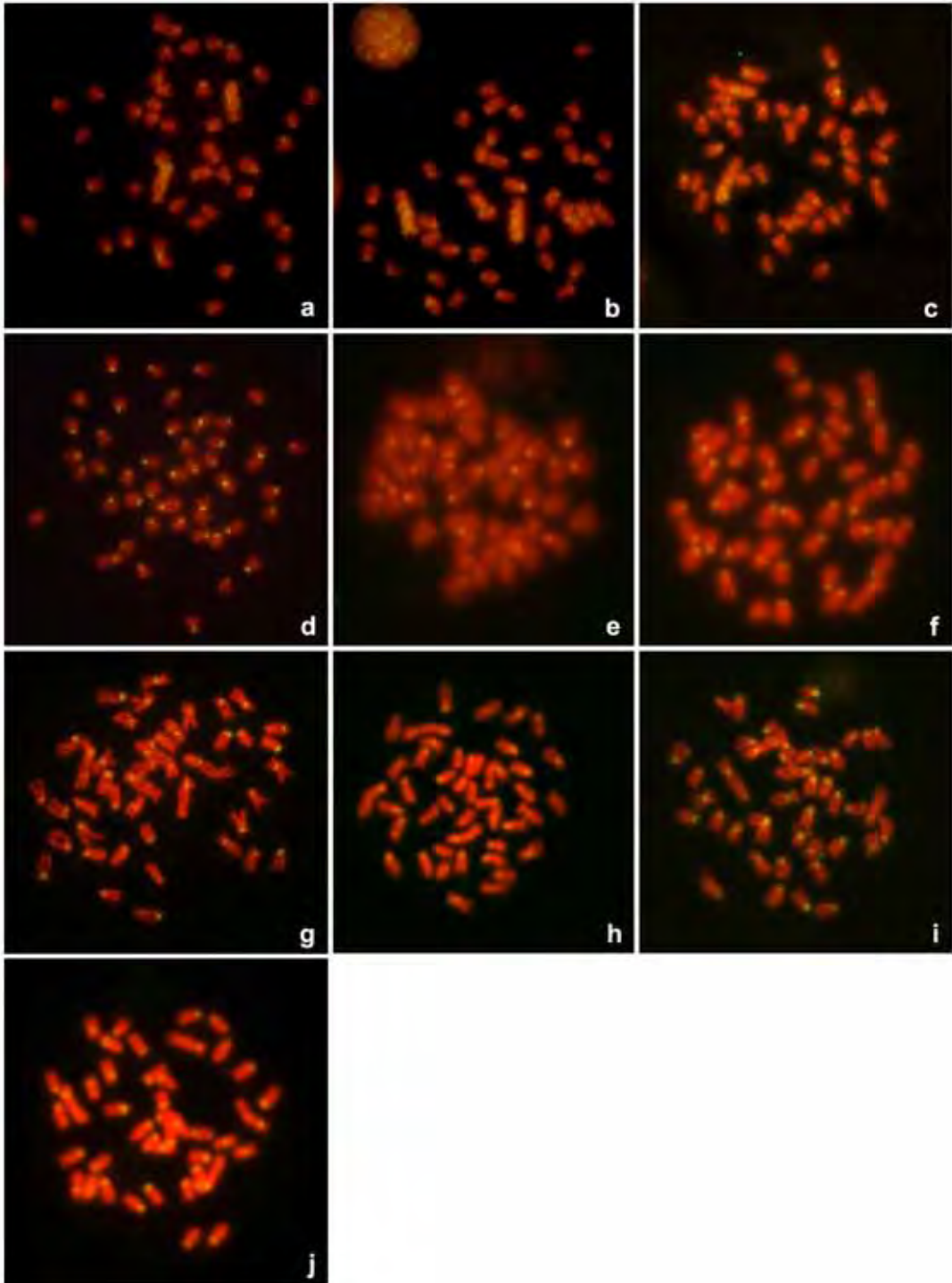


Figure 1

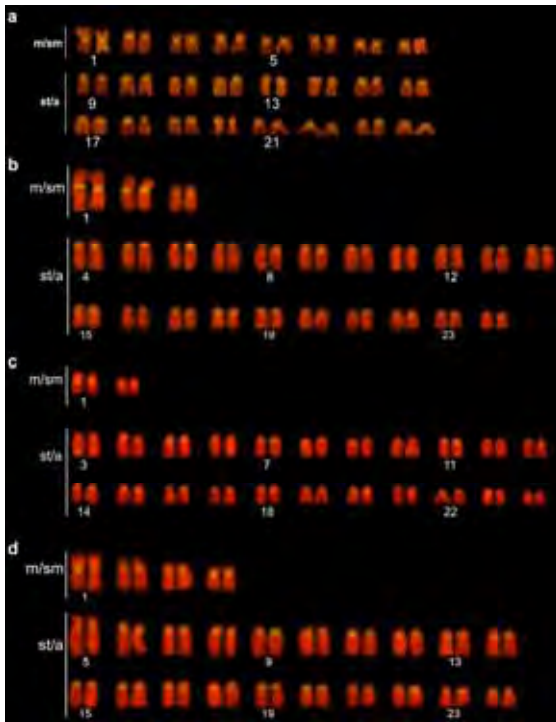


Figure 2

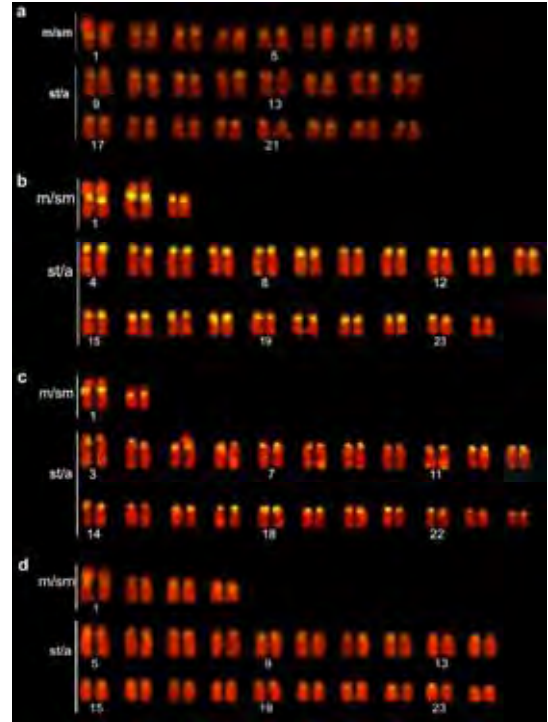


Figure 3

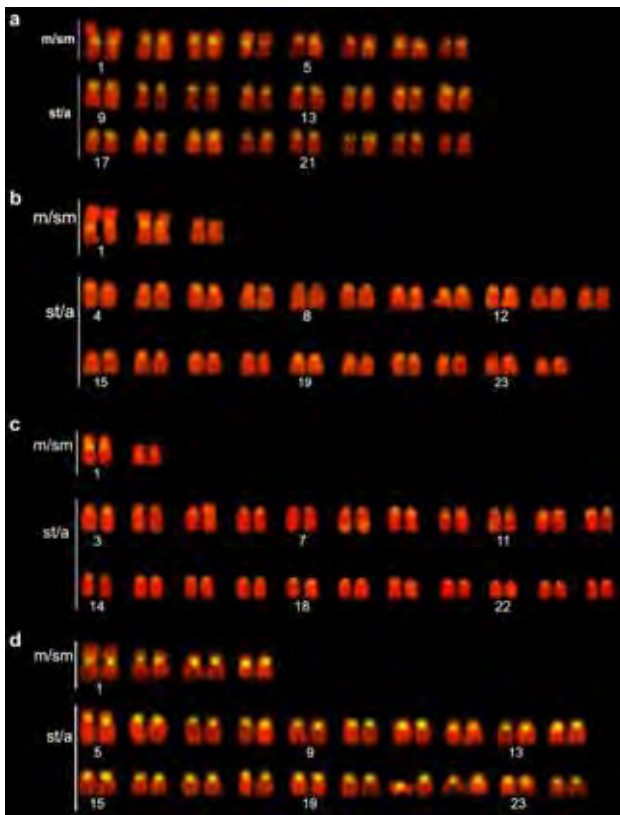


Figure 4