



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências



DANIELA CRISTINA FERREIRA

Doutorado

**ANÁLISES MOLECULARES NA SUBFAMÍLIA HYPOPTOPOMATINAE
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE): ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE
SEQUÊNCIAS REPETITIVAS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de *DOCTOR* em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Genética.

Orientador: Dr. Fausto Foresti

BOTUCATU / SP

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: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Ferreira, Daniela Cristina.

Análises moleculares na subfamília Hypoptopomatinae (Siluriformes, Loricariidae) : isolamento, caracterização e mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas / Daniela Cristina Ferreira. – 2009.

Tese (doutoramento) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009

1. Peixe – Genética molecular.

CDD 597.015

Palavras-chave: Hypoptopomatinae; Sequências repetitivas; Heterocromatina; Hibridação *in situ* fluorescente; AFLP



Dedico esse trabalho aos meus queridos pais

Almeirindo e Geni (in memoriam)

por todo amor e dedicação!

Agradecimentos

Deixo aqui expresso os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e o financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti por todo ensinamento, orientação e incentivo durante esses anos e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira, pela valiosa participação em minha vida acadêmica, pelas sugestões, auxílio e discussões durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Patrícia Parise-Maltempo pelo apoio durante a realização dessa tese e principalmente pela amizade construída durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti pelo incentivo constante e pela amizade.

À Prof. Dra. Adriane Pinto Wasko pelas valiosas contribuições para a elaboração dessa tese.

Ao Prof. Dr. Paulino Martínez Portela da Facultad de Veterinaria de La Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, pela oportunidade oferecida para a realização de parte do meu doutorado em seu laboratório. Obrigada pelos momentos alegres, pela confiança e principalmente pelos ensinamentos compartilhados.

À Dra. Laura Casas Castaño por todo ensinamento durante minha estadia na Espanha, pelo auxílio constante na rotina do laboratório. Aos amigos do laboratório de Lugo, Sonia, Adrian, Manel, Maria López, Maria Portela, Peque, Lucía, Belén, Ania, Susi, Carmen, Miguel, Roman, Almudena, pela dedicação e auxílio durante a realização do estágio.

Aos meus amigos inesquecíveis de Lugo, Marlene, Lupe, Karola, Jorge, Christos, Glécio, Carol, Antonio, Daniel, Jerome, Javier, pelas cenas, cañas, tapas e por todos os momentos felizes compartilhados.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Alex, Andreia Alves, Bruno (Guidai), Bruno de Melo, Cláudia, Débora, Elisa, Emanuel, Fábio (Fio), Fernando (Konrado), Glaucia, Gleisy, Gustavo, Guilherme (Varvito), Guilherme Lopes, Jefferson, José Carlos, Juliana, Lessandra, Luis Henrique (Japonês), Luis, Mahmoud, Marlon, Maressa, Natália, Patrícia, Ricardo (Japa), Ricardo Paiva, Ricardo Britzki, Ricardo Benine, Vanessa, Vitor, Waldo, obrigada por todo auxílio, pela alegria, risadas e pelos momentos que passamos juntos.

Aos amigos, Adriana Takako, Kelly Abe e Tatiane Mariguela pela amizade, dentro e fora do laboratório e por todos os momentos felizes que compartilhamos, tenho certeza que vou sentir saudades de vocês.

À Dra. Cristiane Kioko Shimabukuro-Dias, pelas valiosas discussões a respeito da minha tese, pelo auxílio durante a realização das técnicas e principalmente pela amizade durante todos esses anos.

Ao amigo Márcio Chiachio, que esteve presente durante toda a minha trajetória até chegar aqui, muito obrigada por tudo, pelas conversas, risadas, viagens, enfim por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos do Departamento de Morfologia, Andréia Polleto, Irani, Juliana, Danilo, Diogo pela amizade e convívio agradável durante esses anos.

Ao técnico Renato Devidé, pelo auxílio em todas as coletas e, durante as preparações citogenéticas. Muito obrigada por tudo e principalmente pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, á Luciana por todo auxílio durante os anos que passei aqui, à D. Tera e D. Iolanda pela amizade e carinho sempre. Aos funcionários da secção de Pós-graduação pelo apoio.

As amigas queridas de Botucatu, Rosana, Eliane, Juliana e Silvia. Que se transformaram em irmãs, dividindo além de casa, suas vidas, obrigada por todos os momentos felizes, vocês estarão para sempre em meu coração. À Marina, pelos momentos de descontração, pelas risadas, conselhos e por todo carinho.

As amigas queridas de Rio Preto, Eliane e Michelle pela grande amizade e apoio sempre.

Ao meu amado Rodrigo, pelo carinho, paciência e dedicação durante a finalização desse trabalho. Obrigada por fazer meus dias mais felizes.

A família Ferrari e Ferreira pelo incentivo e apoio constante.

As minhas queridas irmãs Katiane e Viviane, pelo companheirismo, amizade e união, obrigada pelo carinho e pelo apoio.

Aos meus queridos avôs, Santa e Luis que sempre me incentivaram a seguir em frente. Obrigada por todo carinho, amor e compreensão pelos meus dias de ausência. Eu amo muito vocês!!!

Aos meus amados pais, Almeirindo e Geni. A minha mãe pelo exemplo de pessoa, pelo amor dedicado durante toda minha vida, eu sei e acredito que você esta presente nessa conquista. Ao meu pai, pela força, dedicação durante toda a realização desse trabalho e pelos inúmeros momentos de incentivo para a que eu prosseguisse minha jornada. Eu amo vocês!!

À Deus por guiar meus passos.

Resumo

Uma grande fração do genoma dos eucariotos é constituída de sequências repetitivas, que estão divididas em duas classes. Na primeira classe estão as sequências repetidas em cadeia, (satélites, minissatélites e microssatélites) e na segunda estão as sequências repetidas dispersas, que podem ser divididas em transposons e retrotransposons. Poucos estudos têm sido realizados acerca dessas sequências para elucidar sua função no genoma, que até pouco tempo eram conhecidas como DNA egoísta ou lixo. Porém, estudos recentes têm revelado que essas sequências estão envolvidas na diferenciação cromossômicas sexuais e na organização funcional e estrutural do genoma, além dessas sequências repetitivas constituírem bons marcadores cromossômicos. A subfamília Hypoptopomatinae é caracterizada citogeneticamente por apresentar-se conservada quando ao número diplóide, que é de $2n=54$ cromossomos para a maioria das espécies analisadas e uma distribuição da heterocromatina bastante heterogênea, o que torna as espécies dessa subfamília bastante interessantes para os estudos das sequências repetidas, uma vez que essas sequências se localizam preferencialmente em regiões heterocromáticas. No presente trabalho foi estudada a localização de sequências repetidas dispersas *Rex1*, *Rex3* via PCR em quatorze espécies da subfamília Hypoptopomatinae e do elemento disperso *HLBam* isolado do genoma de *Hisonotus leucofrenatus* por digestão enzimática. Os elementos *Rex1* e *Rex3* apresentaram-se conservados no genoma da subfamília Hypoptopomatinae, bem como em espécies distantes filogeneticamente. Tanto *Rex1* e *Rex3* quanto *HLBam* se encontram dispersos no genoma, porém este forma blocos em regiões heterocromáticas. Além disso, foi isolado o satélite *PTHind* do genoma de *Pseudotocinclus tientensis*, que encontra-se exclusivamente no genoma da espécie isolada, constituindo um bom marcador para esta espécie. Adicionalmente, foram isoladas, sequências sexo-específicas do genoma de fêmeas de *Hisonotus leucofrenatus*, com o uso da técnica de AFLP. Na subfamília Hypoptopomatinae a maioria das informações existentes estão relacionadas a citogenética e a filogenia, não havendo dados a respeito da organização genômica das sequências repetidas. Desta forma, os dados obtidos constituem os primeiros relatos sobre a organização genômica na subfamília Hypoptopomatinae e devem contribuir para a compreensão do papel desempenhado por esses segmentos genômicos nos representantes da subfamília estudada, e, por conseguinte nos vertebrados.

Palavras-chave: Hypoptopomatinae, Sequências repetitivas, Heterocromatina, Hibridação *in situ* fluorescente, AFLP.

Abstract

A great fraction of eukaryotic genomic is based on repeated sequences, which are divided in two classes. The first are in tandem (satellites, minisatellites and microsatellites) and in the second class are diverse repeated sequences, that can be divided in transposons and retrotransposons. Only few studies had been conducted with these sequences to bring into the light its genomic function, known by the moment as "selfish DNA" or "junk DNA". However, the few researches conducted may indicate that these sequences are related to sexual chromosome differential and functional and structural genomic organization. In addition, repeated sequences can be used as effective chromosome markers. The subfamily Hypoptopomatinae's cytogenetic characteristics are the conservation of diploid number, which are $2n=54$ chromosomes and heterogenic heterochromatic distribution. Based on that, the species of this subfamily became very interesting for analyze and study repeated sequences and also by the fact of these sequences are mostly located in heterochromatic regions. In the present study, *Rex1* and *Rex3* dispersed repeated sequences were isolated by PCR in fourteen species of Hypoptopomatinae subfamily and the dispersed *HLBam* element was isolated in *Hisonotus leucofrenatus* genomic by enzymatic digestion. The *Rex1* and *Rex3* elements are conserved in Hypoptopomatinae subfamily genomic, likewise in phylogenetic distant species. Either *Rex1*, *Rex3* or *HLBam* are dispersed in genomic, however, in block form inside heterochromatic regions. Moreover, the *PTHind* satellite was isolated from *Pseudotocinclus tientensis* genomic, which is exclusively encountered in the genomic of this isolated specie and may be a good marker for the specie. Additionally, sex-specific sequences were isolated by the AFLP technique from the genomic of *Hisonotus leucofrenatus* females. In Hypoptopomatinae subfamily the major part of current information are related with cytogenetic and phylogeny and there is no study about the genomic organization of the repeated sequences. All in all, the data presented in this study are the first about the genomic organization of Hypoptopomatinae subfamily and contributes for the comprehension of repeated sequences in this subfamily and therefore in vertebrates.

Keywords: Hypoptopomatinae, Repeated sequences, Heterochromatin, Fluorescence *in situ* hybridization, AFLP.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Aspectos taxonômico e sistemáticos da subfamília Hypoptopomatinae.....	1
1.2 DNA repetitivo com ênfase em peixe.....	3
1.3 Determinação Sexual em peixes.....	9
1.4 Subfamília Hypoptopomatinae como modelo para os estudos citogenéticos e de sequências repetitivas.....	12
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos	17
3.1 Material.....	17
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Preparação cromossômica.....	18
3.2.2 Extração de DNA.....	19
3.2.3 Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose.....	20
3.2.4 PCR para o isolamento de elementos retrotransponíveis conservados.....	20
3.2.5 Digestão com enzimas de restrição.....	21
3.2.6 Purificação do DNA digerido com enzima de restrição.....	22
3.2.7 Clonagem do DNA repetitivo.....	23
3.2.7.1 Ligação com o vetor.....	23
3.2.7.2 Transformação.....	23
3.2.7.3 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes.....	24
3.2.8 Hibridação em Membrana.....	24
3.2.8.1 Processamento do gel e transferência do DNA para membrana (<i>Southern blotting</i>).....	24
3.2.8.2 Hibridação de DNA imobilizado em membrana.....	25
3.2.9 Reação de amplificação para o sequenciamento.....	26
3.2.10 Purificação do DNA amplificado na reação de sequenciamento e análise das amostras em seqüenciador ABI prism 377.....	27
3.2.11 Edição das sequências.....	30
3.2.12 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	30
3.2.12.1 Marcação da sonda por <i>Nick translation</i>	31
3.2.12.2 Marcação da sonda por PCR.....	32
3.2.12.3 Tratamento das lâminas contendo preparações cromossômicas.....	33
3.2.12.4 Hibridação.....	34
3.2.12.5 Lavagens do FISH.....	34
3.2.12.6 Detecção e amplificação do sinal para sondas marcadas com digoxigenina e biotina.....	35
3.2.12.7 Detecção de duas sondas (Double FISH).....	36
3.2.13 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	36
4. Resultados e Discussão	42
4.1 Capítulo 1 - Mapeamento Cromossômica dos elementos retrotransponíveis <i>Rex1</i> e <i>Rex3</i> em espécies da Subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae).....	43

4.2 Capítulo 2 - Organização genômica de um elemento repetido no genoma de <i>Hisonotus leucofrenatus</i> (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae).....	64
4.3 Capítulo 3 - Isolamento e caracterização de sequências satélites na espécie <i>Pseudotocinclus tietensis</i> (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae).....	80
4.4 Capítulo 4 – Prospecção de sequências sexo específica em <i>Hisonotus leucofrenatus</i> (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae) com o uso da técnica de AFPL.	97
5. Discussão Final.....	113
6. Conclusões.....	118
7. Referências.....	120
8. Anexos.....	128

1. Introdução

1.1 Aspectos taxonômicos e sistemáticos da subfamília Hypoptopomatinae

A ictiofauna neotropical de água doce é extremamente rica e diversificada. Reis *et al.* (2003) fizeram uma estimativa de sua diversidade, sugerindo a existência de cerca de 6.000 espécies de peixes nesta região, sendo que a estimativa para o mundo atingiria um total de 13.000 espécies. Segundo os autores, na região Neotropical são encontradas 71 famílias de peixes, num total de 4.475 espécies válidas e cerca de 1.550 espécies ainda não descritas.

A ordem Siluriformes compreende um grande grupo de peixes extremamente diversificado e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (Burges, 1989; Ferraris, 1995). São peixes que possuem formas e tamanhos extremamente variados e caracterizam-se principalmente por possuírem total ausência de escamas sobre o corpo, presença de barbilhões e frequentemente de acúleos fortes e pungentes, resultantes da modificação do segundo raio da nadadeira dorsal e do primeiro raio das nadadeiras peitorais (“tripé defensivo”) (Alexander, 1965; Burgess, 1989; Ferraris, 1998). O corpo desprovido de escama, pode ser revestido por uma pele espessa, popularmente conhecida como couro ou, então, coberto total ou parcialmente com placas ósseas (Alexander, 1965; Paxton e Eschmeyer, 1998). A família Loricariidae, com cerca de 684 espécies válidas (Nelson 2006), é a maior em número de espécies dentre os Siluriformes e também uma das maiores famílias da ictiofauna mundial (Reis *et al.*, 2003). Segundo este autor, está divididas em seis subfamílias, relacionadas como Hypostominae, Ancistrinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Lithogeninae, dentre as quais Hypoptopomatinae constitui o conjunto de espécies melhor caracterizado como um grupo natural. Os Hypoptopomatinae são considerados um

grupo monofilético dentro da família Loricariidae (Schaefer, 2003). Porém, em um estudo recente, Chiachio *et al* (2008) propuseram uma nova filogenia molecular com base em genes nucleares, onde os autores elevaram ao nível de subfamília as duas tribos pertencentes a Hypoptopomatinae, sendo agora a tribo Hypoptomatini considerada subfamília Hypoptomatinae e a tribo Otothyirini considerada subfamília Otothyirinae. Os autores sugerem ainda a inclusão do gênero *Pseudotocinclus* na subfamília Neoplecostominae, sendo esta intimamente relacionada a Otothyirinae.

Seus representantes são de tamanho pequeno a moderado (30-130 mm de comprimento padrão), na maioria das vezes apresentam corpo alongado e, em alguns casos, fortemente achatado. Todos os membros dessa subfamília compartilham uma característica morfológica peculiar no esqueleto dos raios da nadadeira peitoral (Schaefer, 1991).

De acordo com Schaefer (2003), a subfamília Hypoptopomatinae apresenta 79 espécies, alocadas em 16 gêneros. As espécies de Hypoptopomatinae estão distribuídas ao longo das terras baixas da América do Sul cis-andina, da Venezuela até o norte da Argentina. Estes peixes são geralmente referidos como “cascudinhos” no Brasil, onde o grupo é mais diversificado. Como outros membros da família, os Hypoptopomatinae são tipicamente herbívoros, sendo encontrados primariamente nas cabeceiras de riachos, próximos da porção superior da coluna d’água e em associação direta com estruturas vegetais próximas da superfície, tais como galhos de árvores submersos, macrófitas aquáticas e grammas laminares terrestres que crescem ao longo das margens correntes e estendem-se para dentro da água (Schaefer, 1998).

Estudos extensivos realizados por Armbruster (2004) em representantes da família Loricariidae, dando ênfase às subfamílias Hypostominae e Ancistrinae, tiveram por base caracteres morfológicos externos, osteologia e anatomia do trato

digestivo. A partir destes estudos, o autor apresentou novas hipóteses de relacionamento para Loricariidae, sugerindo que a subfamília Hypoptopomatinae, apesar de monofilética, estaria intimamente relacionada aos gêneros *Neoplecostomus*, *Kronichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Pareiorhina* e *Hemipsilichthys*, pertencentes à subfamília Neoplecostominae.

A grande diversidade de formas biológicas e a ampla distribuição dos representantes de Hypoptopomatinae tornam, assim, os estudos citogenéticos e moleculares nesta subfamília bastante interessantes.

1.2 DNA repetitivo com ênfase em peixes

Uma importante característica dos organismos eucariotos (com exceção dos fungos) é que seus cromossomos apresentam uma significativa quantidade de tipos de segmentos de DNA repetitivo, não encontrados nos procariotos. Nesse grupo, a presença de íntrons, grandes regiões intergenes, sequências satélites, pseudogenes e muitas famílias de elementos transponíveis sugerem a existência de uma quantidade excessiva de segmentos de DNA que aparentemente não são sujeitos a uma forte pressão seletiva (Weiner *et al.* 1986, Charlesworth *et al.* 1994).

Ainda que uma enorme diversidade de sequências repetidas possa estar presente nos vertebrados, incluindo os peixes (Oliveira *et al.*, 2002), a classe mais intensivamente estudada destes segmentos genômicos é a das sequências repetidas arranjadas em cadeia. A complexidade dessas sequências pode variar de 2pb a 2kb e o tamanho total das cadeias formadas pelas múltiplas cópias pode variar de menos de 100pb a mais de 100Mb (Stephan e Cho 1994). De acordo com o comprimento do segmento repetido, as sequências repetidas em cadeia têm sido divididas em três classes e identificadas como microsatélites, minissatélites e satélites (Levinson e Gutman 1987). O significado funcional dessas sequências no

genoma ainda não é totalmente conhecido, mas considera-se que algumas classes de sequências repetidas devem desempenhar papéis importantes no funcionamento celular (Epplen e Epplen-Haupt 2002).

Os DNAs satélites são organizados em grandes *clusters*, principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos. Essas sequências representam o principal componente da heterocromatina, desempenhando assim papéis importantes na estrutura e na função dos telômeros e centrômeros dos cromossomos de peixes (Martins, 2007).

Estudos envolvendo sequências repetitivas, principalmente sequências satélites, tem sido feitos com o propósito de elucidar a provável origem dos cromossomos supranumerários, bem como identificar sequências sexo-específicas. Mestriner *et al.* (2000) foram os primeiros autores a descreverem a composição genética de uma família de DNA repetitivo de um cromossomo B em peixes. Estes autores isolaram uma sequência de DNA satélite de *Astyanax scabripinnis*, denominada *Kpnl* e composta de 51pb. Esse satélite está presente na região terminal de vários cromossomos do complemento A, assim como na região intersticial dos dois braços do cromossomo B dessa espécie, dando reforço à hipótese de que esse B seria um isocromossomo.

Em *Prochilodus lineatus*, espécie que apresenta um número variável de microcromossomos B, uma das sequências satélites isoladas por Jesus *et al.* (2003) está presente nas regiões pericentroméricas de vários cromossomos do conjunto A e em todos os microcromossomos B. Esses resultados levaram os autores a proporem que a origem dos cromossomos B nessa espécie se deu, provavelmente, a partir de elementos do complemento A.

Estudos envolvendo a identificação de sequências repetitivas sexo-específicas foram realizados por Nakayama *et al.* (1994), que isolaram dois fragmentos de DNA

satélite da espécie *Leporinus elongatus*, sendo que um deles, foi utilizado como sonda e hibridou especificamente com o cromossomo W presente em fêmeas dessa espécie. No entanto, três indivíduos ZW não tiveram seus cromossomos W marcados por essa sonda, sugerindo que esses cromossomos sexuais atípicos teriam perdido essas regiões satélites através de eventos de recombinação entre os cromossomos Z e W.

Parise-Maltempo *et al.* (2007) isolaram, através de digestão enzimática do DNA, um elemento repetitivo associado aos cromossomos sexuais de *Leporinus elongatus*. Com a técnica de hibridação *in situ*, os autores propuseram um novo sistema de cromossomos sexuais para a espécie *L. elongatus*, um sistema de cromossomos sexuais múltiplos, já que o elemento isolado hibridou não somente nos pares sexuais já conhecidos ZZ/ZW, como também em um par autossômico, agora identificado como cromossomo sexual. Nesse trabalho fica evidente a ocorrência de um sistema múltiplo para a espécie do tipo $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$.

Em outro estudo, Koehler *et al.* (1997) isolaram e caracterizaram um DNA satélite cromossomo-específico em *Leporinus obtusidens*. A análise desta sequência indicou que este satélite é constituído por 483bp, 60% rico em AT e compreende duas famílias divergentes. Quando hibridado em membrana com DNA de várias espécies do gênero, este satélite apresentou homologia somente com a espécie *L. elongatus*. A hibridação *in situ* fluorescente localizou esta família de DNA satélite sobre as regiões pericentroméricas em um par cromossômico de *L. obtusidens* e *L. elongatus*. Segundo os autores, esse satélite poderia servir como marcador citogenético no gênero *Leporinus*.

Sequências de DNA satélite têm sido aplicadas no mapeamento físico dos cromossomos para marcadores genéticos, contribuindo para o desenvolvimento de marcadores genéticos em peixes. Ferreira e Martins (2008) caracterizaram

sequências de DNA repetitivos no genoma da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando bibliotecas de plasmídeos enriquecidas com sequências repetitivas e Cot-1 DNA. Com o emprego da técnica de FISH, usando as sequências isoladas como sonda, foi possível visualizar uma distribuição predominante de elementos repetitivos em regiões centroméricas e teloméricas. O acúmulo dessas sequências repetitivas nos cromossomos X e Y é diferente, sugerindo que o DNA repetitivo tem um papel importante na diferenciação dos cromossomos sexuais.

Um outro enfoque de aplicação utilizando sequências de DNA satélite tem sido em estudos de filogenia. Garrido-Ramos *et al.* (1994), caracterizaram uma família de sequências de DNA satélite do genoma de *Sparus aurata*. Essa família (chamada família *EcoRI*) é composta de unidades de 186 pb e corresponde a 2% do genoma da espécie. Experimentos de FISH com os cromossomos de *S. aurata* mostraram que todas as sondas derivadas dessa família de DNA satélite hibridam exclusivamente nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, em diversas condições de stringência (Garrido-Ramos *et al.* 1994). Essa família de DNA satélite é ainda conservada em outras dez espécies relacionadas ao gênero *Sparus* (Garrido-Ramos *et al.*, 1995). Mais recentemente foi realizado um estudo intensivo de seqüências satélites de exemplares da família Sparidae, onde foi mostrado que as sequências em diferentes espécies evoluíram "em concerto" e pelo menos dois grupos monofiléticos puderam ser identificados com esse marcador nessa família, com base nessas sequências (Garrido-Ramos *et al.*, 1999).

Robles *et al.*, (2004) isolaram DNA satélite, denominado *PstI* e estudaram as relações filogenéticas de esturjão. Este satélite foi encontrado com alto grau de conservação em 13 espécies analisadas e é um dos mais antigos DNA satélites datados até o momento.

Na espécie *Salmo salar* foi isolada uma sequência satélite denominada *Hpal*, que correspondia a regiões centroméricas (Viñas *et al.*, 2004). Os autores testaram seu grau de conservação em diferentes espécies da família Salmonidae (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *O. kisutch*) e observaram que esta sequência satélite tem homologia apenas com *S. trutta*, apresentando a mesma organização encontrada para *Salmo salar*. Quando pesquisada no *GenBank/EMBL*, esta sequência apresentou uma homologia significativa com a sequência *AluI/RsaI* de *Salvelinus namaycush*, uma espécie pertencente à família Salmonidae. A conservação desta família satélite pode indicar que *Salmo* e *Salvelinus* são mais relacionados dentro da família Salmonidae e que esta sequência homóloga estava presente no ancestral dessas duas espécies.

Uma grande proporção do genoma eucariótico é composta por elementos repetitivos dispersos, que se propagaram fazendo cópias de si mesmos, com mobilidade franqueada para outros locais no genoma. Esses elementos repetitivos são chamados de sequências de transposição e dentre eles destacam-se os que se propagam como fragmentos de DNA, conhecidos como transposons. Uma outra classe de sequências de transposição, chamadas de retrotransposons, se propaga pela ação da transcriptase reversa, uma enzima que pode fazer um filamento de DNA a partir de RNA (Charlesworth *et al.*, 1994). Há dois tipos de retrotransposon encontrados comumente no genoma de eucariontes, os SINEs (short interspersed elements) e os LINEs (long interspersed elements), que se distinguem um do outro pelo comprimento dos segmentos e pela sua estrutura molecular (Singer, 1982; Martin, 1991; Okada, 1991; Charlesworth *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1997). No genoma dos peixes podem ser encontrados todos os tipos de elementos transponíveis (Volf *et al.*, 2003), sendo que alguns desses elementos já foram estudados e mapeados nos cromossomos até o presente.

Esses elementos repetidos estão presentes em todos os organismos, mas em diferentes quantidades. Em mamíferos, transposons compõem mais de 45% do genoma, enquanto que em outros genomas representam apenas uma pequena fração, como aquela em torno de 2,7% encontrada no baiacu *Fugu rubripes* (Aparício *et al.*, 2002). A dinâmica evolutiva e a diversidade dos transposons em insetos, peixes, pássaros e mamíferos são drasticamente diferentes. Genomas de mamíferos contém poucas linhagens, muito abundantes, mas relativamente inativas, enquanto espécies de *Drosophila* e peixes abrigam linhagens diversas, as quais tipicamente possuem baixa abundância, sendo, contudo, aparentemente mais prejudiciais. Em numerosas espécies de insetos e peixes, famílias de relativamente baixo número de cópias de distintas linhagens de elementos transponíveis (TEs) têm persistido ativas por um período de tempo extremamente longo (Eickbush e Furano, 2002; Volff *et al.*, 2003). Abrusán e Krambeck (2006) propõem que a variação da diversidade e atividade dos TEs entre vários genomas animais seja causada pela diferença nos mecanismos de defesa dos hospedeiros em oposição à atividade dos TEs.

Segundo Koga *et al.* (2006), os elementos transponíveis contribuem com a evolução do genoma porque sua atividade de transposição causa mutações e sua natureza repetitiva aumenta a taxa de rearranjos cromossômicas. O processo de excisão do transposon envolve a quebra do cromossomo. Esse processo afeta a função do genoma hospedeiro e se a taxa de excisão é alta, o gene envolvido pode se tornar geneticamente instável. Os autores consideram que o impacto dos elementos transponíveis no genoma de vertebrados pode ser maior que normalmente se supõe, além disso, demonstra a participação destes elementos na geração de maior taxa de mutação que as taxas de mutações espontâneas determinadas para um mesmo organismo. Em medaka (*Oryzias latipes*), foi

verificado que o elemento transponível *To2* contribui com a variação genética, atuando como um mutante natural em seu organismo hospedeiro. Dessa forma, o desenvolvimento e atuação dos elementos transponíveis na evolução genômica dos vertebrados parece ser mais significativo do que geralmente tem sido postulado (Koga *et al.*, 2006).

Embora o DNA repetitivo tenha sido muito estudado em invertebrados e mamíferos (Singer, 1982), em peixes ainda é restrito o número de informações que se tem a respeito da sua sequência e organização genômica, quando comparadas ao grande número de espécies existentes. Estudar estas sequências de DNA repetitivo significa conhecer a organização genômica dos peixes, assim como a dinâmica com que estas sequências têm evoluído nestes organismos. Estas sequências de DNA repetitivo podem ser utilizadas como bons marcadores para estudos evolutivos, na identificação de rearranjos cromossômicos e identificação de diferenças entre machos e fêmeas, entre outras aplicações genéticas.

1.3 Determinação Sexual em Peixes

A identificação sexual é um importante assunto para vários estudos, incluindo comportamento, ecologia, conservação e genética de muitas espécies (Felip *et al.*, 2005). A determinação sexual está relacionada a diversos mecanismos nos diferentes grupos biológicos. Em alguns grupos, esta determinação pode ser decorrente de respostas a fatores ambientais como temperatura e a circunstâncias sociais; em outros grupos, pode estar estritamente relacionada a fatores genéticos (Klug e Cummings 2000).

Genes ligados à determinação sexual de muitos animais têm sua distribuição no genoma de acordo com a herança de um dos cromossomos do par sexual, XX/XY ou ZZ/ZW, determinando o desenvolvimento do zigoto como fêmea ou

macho. O macho (XY) ou a fêmea (ZW) podem ser o parental heterogamético, dependendo da espécie. Cromossomos X e Y ou Z e W diferem não somente no que diz respeito à determinação sexual gênica, como também a vários graus na morfologia e em seu conteúdo de outros genes diferentes dos determinantes do sexo (Traut *et al.*, 1999; Ezaz *et al.*, 2006). No entanto, nem todos os organismos possuem cromossomos sexuais ou heteromórficos. Segundo Ezaz *et al.* (2006), quando não se observa diferenciação entre o complemento cromossômico de machos e fêmeas de determinada espécie, diz-se que essa espécie não possui diferenciação cromossômica sexual visível ou seus cromossomos são homogaméticos.

Contudo, a identificação cromossômica sexual dos organismos é um importante avanço no que se refere aos estudos de evolução, organização genômica e à pesquisa aplicada de cultivo e manejo dos diferentes grupos de animais. Os peixes teleósteos compõem um grupo promissor para o estudo da evolução dos cromossomos sexuais, já que mecanismos de determinação de sexo não são fixos neste grupo. Espécies hermafroditas são abundantes e os mecanismos de determinação de sexo variam muito entre as espécies gonocoristas e, às vezes, entre espécie (Morescalchi, 1992; Baroiller *et al.*, 1999). Mecanismos de determinação sexual ligados a heteromorfismos cromossômicos de ambos os tipos XX/XY e ZZ/ZW ocorrem entre os peixes (Almeida-Toledo *et al.*, 2000).

Entre as mais de 1700 espécies de peixes que já foram caracterizadas citogeneticamente (Arkhipchuk 1995), cerca de 176 espécies (10.4%) apresentam cromossomos heteromórficos ligados ao sexo. Por outro lado, um grande número de espécies apresentam cromossomos sexuais morfologicamente não diferenciados. Nestas últimas, pode ocorrer um sistema de determinação sexual de fator único, sugerindo que algumas sequências sexo-específicas ou rearranjos cromossômicos

estejam presentes e que a evolução de cromossomos sexuais encontra-se, assim, em um estágio mais inicial de divergência (Devlin *et al.*, 2001).

A busca por sequências genômicas envolvidas na determinação e diferenciação sexual representa uma área de estudo extremamente vasta, já que uma das características dos mecanismos de determinação do sexo é sua falta de conservação entre diferentes grupos animais.

Sequências de DNA sexo-específicas têm sido identificadas em várias espécies de peixes, utilizando diferentes técnicas tais como RAPD, RFLP, AFLP e microssatélite (Devlin *et al.*, 2001). Recentemente foi identificado o primeiro gene de determinação sexual em um vertebrado não mamífero, o peixe teleósteo medaka (Matsuda *et al.*, 2002, 2003). Este gene foi chamado de *dmY/dmrt1Y* e é comparado ao gene de determinação de sexo Sry, encontrado no cromossomo Y de mamíferos; contudo, esse não é o gene primário e universal de determinação sexual em peixes. (Volf *et al.*, 2003).

Tal diversidade dos sistemas sexuais, permite explorar mecanismos regulatórios que podem fornecer dados extremamente importantes para a compreensão do processo de determinação e diferenciação sexual dos vertebrados. Além de representarem um material extremamente rico para estudos acadêmicos de determinação e diferenciação sexual, os peixes também constituem uma fonte para estudos aplicados na área de recursos alimentares, já que o eficiente cultivo e reprodução em cativeiro e a predição de impactos ambientais dependem grandemente da compreensão de sua biologia reprodutiva (e.g. Devlin e Nagahama, 2002).

1.4 Subfamília Hypoptopomatinae como modelo para os estudos citogenéticos e de sequências repetitivas

Com relação aos estudos citogenéticos, tem sido demonstrado que nas espécies que compõem a subfamília Hypoptopomatinae o número diplóide de $2n=54$ cromossomos tem sido mais frequente, com duas exceções observadas para *Otocinclus* aff. *vestitus* da bacia Amazônica, que possui $2n=72$ (Andreatta *et al.*, 1993) e para *Otocinclus gibbosus*, que mostrou $2n=58$ cromossomos (Andreatta *et al.*, 2000). Contudo, ainda que a maioria das espécies apresente número diplóide constante, existe enorme variabilidade cariotípica neste grupo, principalmente em relação aos padrões de heterocromatina constitutiva, quando se avalia a estrutura cromossômica dos cariótipos (Andreatta *et al.*, 1992, 1993, 1994; Ferreira *et al.* 2005).

A heterocromatina constitutiva, constituída principalmente por DNA satélite e por outras sequências repetitivas, é um componente importante dos genomas, usualmente representando porções significativas destes. Sua identificação e distribuição no cariótipo constituem-se em importantes informações para a comparação de espécies de um mesmo grupo (Almeida-Toledo *et al.*, 2000). Com relação a esta característica, diferentes tendências evolutivas podem ser observadas dentro de um mesmo grupo. No caso da subfamília Hypoptopomatinae, a distribuição da heterocromatina constitutiva é bastante heterogênea, pois as marcações banda-C positivas são observadas em diferentes cromossomos, podendo estar localizadas nas posições intersticial, pericentromérica, terminal ou subterminal.

Dentre os representantes da subfamília Hypoptopomatinae, o gênero *Hisonotus* (que até recentemente muitas das espécies desse gênero eram identificadas como pertencentes ao gênero *Microlepidogaster*) apresenta características cariotípicas peculiares quanto à estrutura cromossômica e

distribuição da heterocromatina constitutiva. Neste gênero, há espécies que apresentam grandes blocos de heterocromatina constitutiva, assim como cromossomos supranumerários e presença de cromossomos sexuais, o que as tornam bastante interessantes para os estudos citogenéticos e de sequências repetitivas (Andreato *et al.*, 1993).

O estudo citogenético de duas populações de *Hisonotus leucofrenatus* (citado como *Microlepidogaster leucofrenatus*) da bacia do Leste, uma do ribeirão do Poço Grande (Estado de São Paulo) e outra do rio Marumbi (Estado do Paraná), evidenciou aspectos peculiares (Andreato *et al.*, 1993). Embora essas populações apresentassem o mesmo número diplóide, com $2n=54$ cromossomos, foi observada a ocorrência de cromossomos supranumerários e sistema cromossômico determinação sexual, além de uma expressiva diferenciação cromossômica morfológica, decorrente principalmente da variação na quantidade e localização dos segmentos heterocromáticos. A população paranaense de *H. leucofrenatus* apresentou blocos heterocromáticos em pelo menos oito pares cromossômicos, enquanto a população paulista apresentou apenas cinco pares marcados pela banda C. A presença de grandes blocos de heterocromatina em posição terminal, como aqueles identificados nos exemplares da população do Paraná, não foi detectada na população de São Paulo, o que permitiu uma segura distinção entre essas populações. As análises cariotípicas realizadas permitiram identificar o papel da heterocromatina constitutiva no processo de diferenciação cromossômica em nível populacional em *H. leucofrenatus* (Andreato *et al.*, 1993).

Em estudos citogenéticos realizados em representantes do gênero *Hisonotus*, Andreato (2002) caracterizou dois grupos neste gênero, quando comparou os padrões de heterocromatina constitutiva. O primeiro grupo seria formado pelas espécies *H. nigricauda* e *Hisonotus* sp. D., que apresentaram poucos segmentos de

heterocromatina, enquanto que o grupo formado pelas espécies *H. leucofrenatus* e *H. insperatus* apresentou grandes blocos de heterocromatina constitutiva. Estes resultados também foram confirmados por Ferreira *et al.* (2005).

A espécie *Pseudotocinclus tietensis* apresenta-se bastante interessante para os estudos citogenéticos e moleculares devido à presença de cromossomos sexuais. Andreato *et al.* (1992), estudando citogeneticamente exemplares de *P. tietensis* coletados no rio Tietê, evidenciaram um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, onde o cromossomo identificado como Y apresentou um grande bloco de heterocromatina constitutiva, não encontrado no cromossomo X. Essa espécie apresentou número diplóide de $2n=54$ cromossomos e NOR intersticial nos exemplares de ambos os sexos.

As análises moleculares já realizadas na subfamília Hypoptopomatinae estão restritas a apenas duas espécies, *Hisonotus leucofrenatus* (Andreato, 2002) e *Hisonotus insperatus* (Ferreira, 2005). Em *H. leucofrenatus* foram isolados fragmentos repetitivos, que eram constituídos de um monômero e um dímero de uma mesma sequência, organizada em cadeia, constituindo um satélite rico em AT. Sua localização corresponde às frações de heterocromatina polimórficas que estão localizadas nas regiões terminais de alguns pares de cromossomos. O experimento de hibridação em membrana com DNA de várias espécies relacionadas à *H. leucofrenatus* revelou que a sequência repetitiva isolada ocorre somente em *H. leucofrenatus* (Andreato, 2002). Já em *H. insperatus* foi isolado um fragmento constituído por monômeros organizados *in tandem*, com predominância de 68% de A e T. Este satélite denominado His-HaeIII também hibridou com seqüências do genoma de *H. leucofrenatus* (Ferreira, 2005).

O estudo das sequências repetitivas, analisadas sob o enfoque citogenético e molecular, pode fornecer informações de grande valor para o entendimento evolutivo e estrutural dessa porção representativa do genoma de eucariontes. Dessa forma, estudos de representantes da subfamília Hypoptopomatinae envolvendo as sequências repetitivas podem contribuir para o entendimento da organização estrutural, funcional e evolução do genoma dos peixes, em particular no que se refere à heterocromatina.

2. Objetivos

O presente trabalho está inserido em um programa geral de estudos citogenéticos de peixes neotropicais que visa a um melhor conhecimento da estrutura cromossômica das células eucariotas e em particular dos peixes, procurando identificar os mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica e nos processos de especiação nesse grupo. Como objetivo específico, foi proposto estudar as sequências repetitivas no genoma das espécies da subfamília Hypoptopomatinae, em particular do gênero *Hisonotus* e na espécie *Pseudotocinclus tietensis* procurando:

- 1- Isolar, caracterizar a estrutura molecular e mapear sequências repetitivas no genoma das espécies de peixes do gênero *Hisonotus* e da espécie *Pseudotocinclus tietensis*, e compará-las com as espécies da Subfamília Hypoptopomatinae,
- 2- Conhecer, de maneira extensiva, as características moleculares da heterocromatina em espécies da Subfamília Hypoptopomatinae;
- 3- Identificar sequências sexo-específicas no genoma da espécie *Hisonotus leucofrenatus*, a fim de se conhecer a estrutura e constituição dos cromossomos sexuais na espécie em questão.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Para a realização da extração do DNA genômico e posterior isolamento e caracterização das seqüências repetitivas, foram utilizadas amostras de fígado, brânquias e músculos dos exemplares de *Hisonotus insperatus*, *Hisonotus* sp B. e *Corumbataia cuestae*, do ribeirão Alambari, Botucatu (SP); *C. tocantinensis*, do rio Vermelho, Goiás (GO); *Otocinclus vitattus*, do rio Taquari, em Coxim (MS); *O. flexilis* do alto rio Negro; *O. gibbosus*, do rio Betari em Iporanga (SP), *Parotocinclus maculicauda*, do rio do Peixe, no Município de Pedro de Toledo (SP) *Hisonotus leucofrenatus* do rio Canela, Joinvile (SC); *Hypoptotoma guentheri* do rio Pirar, em Poconé (MT); *Pseudotothyris obtusa* do afluente rio Preto, Itanhaém (SP); *Otothyris travassossi* do riacho rosário, em Canavieras (BA); *Hypoptopoma* sp do lago do Vanico, em Carero (AM); *Pseudotocinclus tietensis* e *Neoplecostomus paranensis* do rio Paraitinguinha, em Salesópolis (SP); *Kronichthys* sp. do rio Coruja, em Tapiraí (SP). Para os experimentos de FISH foram protocolos para a obtenção de preparações cromossômicas em exemplares *Hisonotus leucofrenatus*, *Parotocinclus maculicauda* e *Pseudotocinclus tietensis*. Todos os exemplares coletados foram fixados em formol 4% e conservados em álcool 70%, e encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, IB-UNESP de Botucatu, SP.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação cromossômica

Para obtenção de preparações cromossômicas foi utilizada a técnica descrita por Foresti *et al.*, (1981), como segue:

- a) injetar intraperitonealmente colchicina a 0,025% na proporção de 1mL para cada 100g de peso do animal vivo;
- b) deixar o peixe em aquário aerado por 40 minutos;
- c) sacrificar o animal e retirar fragmentos do rim anterior, brânquias;
- d) lavar o material em placa de Petri com solução hipotônica (KCl 0,075 M);
- e) dissociar o material com auxílio de pinças de ponta fina para obter uma suspensão de células,
- f) retirar a suspensão da placa de Petri e colocá-la em tubo de centrífuga. Colocar o tubo em estufa a 37°C por 21 minutos;
- g) retirar o material da estufa e adicionar oito gotas de fixador (metanol e ácido acético glacial 3:1) gelado e recém-preparado. Agitar levemente a mistura com pipeta Pasteur. Deixar por mais cinco minutos à temperatura ambiente;
- h) após os 5 minutos, dobrar o volume do fixador no tubo;
- i) pipeta 150 vezes,
- j) centrifugar por 10 minutos a 1.000 rpm, descartando o sobrenadante;
- k) adicionar 6 mL de fixador no tubo;
- l) centrifugar por 7 minutos a 1.000 rpm, descartando o sobrenadante;
- m) repetir os itens k e l por mais duas vezes;
- n) após a última centrifugação, eliminar o sobrenadante e adicionar fixador na proporção de 1:1 de precipitado, ressuspendendo-o. Com auxílio da pipeta Pasteur, pingar duas gotas da suspensão celular sobre uma lâmina limpa ou guardar o material em tubos de 1,5 mL a 4°C;

- o) secar a lâmina com a suspensão celular à temperatura ambiente, corar com Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato 0,06M, pH 6,8, por 10 minutos.

3.2.2 Extração de DNA

Amostras de fígado, brânquias e músculos de representantes das espécies citadas acima foram utilizadas para extração de DNA visando análises de DNA repetitivo e isolamento de sequências repetidas. Essa técnica segue o procedimento básico descrito por Sambrook *et al.* (2001) e consiste sucintamente da liberação do DNA celular pela ação combinada de detergentes, proteinase K e RNase, lavagem com fenol/clorofórmio e precipitação do DNA pelo cloreto de sódio e etanol, conforme procedimentos descritos a seguir:

- a) fragmentar os pedaços de fígado, brânquias e músculos em cadinhos com N₂ líquido;
- b) adicionar ao tecido 3,98 ml de solução digestão (NaCl 0,1M; Tris-HCl 0,01M pH=8,0; EDTA 0,025M pH=8,0; SDS 0,5%; RNase 100µg/ml; H₂O q.s.p.);
- c) transferir o tecido macerado com 3,98ml de solução de digestão para tubo Falcon de 15ml;
- d) colocar em banho-maria a 50°C por meia hora. Adicionar 20µl de proteinase K, permanecendo por mais duas horas no banho a mesma temperatura;
- e) retirar os tubos do banho-maria e adicionar 4ml de Fenol : Clorofórmio : Álcool isoamílico (50:48:2);
- f) agitar manualmente os tubos suavemente por cerca de 15 minutos, até misturar bem os componentes;
- g) centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm;
- h) transferir a camada superior do tubo (DNA) para tubos novos, tomando cuidado para não pegar a camada de proteínas;

- i) acrescentar 0,2 volumes de NaCl 1M de acordo com o volume obtido no item anterior + 2 volumes de etanol 100% gelado e agitar suavemente para precipitar o DNA;
- j) centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm;
- k) descartar o sobrenadante, acrescentar cerca de 4mL de etanol 70% gelado e centrifugar como no item anterior;
- l) descartar o sobrenadante e levar o tubo para a estufa a 37°C. Deixar 12-16h até secar o DNA;
- m) adicionar até 1mL de TE para solubilizar o DNA.

3.2.3 Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose

O desenvolvimento desta técnica segue o procedimento seguinte:

- a) preparar o gel de agarose a 1% (0,5g de agarose/50ml de tampão TAE 1x);
- b) depositar a agarose, ainda líquida, sobre a placa. Colocar o pente e esperar solidificar. Retirar o pente e cobrir com TAE diluído (1x) na cuba de eletroforese;
- c) aplicar o *Ladder* 1kb plus (Invitrogen) (40ng/μl), depois a amostra de DNA (4μl do DNA extraído; 4μl do corante *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia);
- d) fotografar o gel em câmera digital e analisar as bandas obtidas por meio do programa Kodak "Electrophoresis Documentation and Analysis System 120", a partir do marcador utilizado.

3.2.4 PCR para o isolamento de elementos retrotransponíveis conservados

As amplificações dos elementos transponíveis nas espécies da Subfamília Hypoptopomatinae foram realizadas com os *primers* que já foram isolados e se encontram disponíveis em trabalhos científicos. Os *primers* utilizados foram: RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3'), RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3'), RTX3-F1 (5'-TACGGAGAAAACCCATTTTCG-3') e RTX3-R1 (5'-

AAAGTTCCTCGGTGGCAAGG-3') (Volf *et al.* 1999, 2000). Para cada amostra a ser amplificada com os *primers* Rex (1 e 3), foi preparada a reação (MIX):

Soluções	Volume
<i>Taq</i> Buffer (10X)	2,5 µl
dNTP (8mM)	0,5 µl
<i>Primer</i> F (10µM)	0,5 µl
<i>Primer</i> R(10µM)	0,5 µl
MgCl ₂ (10mM)	1,0 µl
<i>Taq</i> Polimerase (5U/µl)	0,1 µl
H ₂ O Autoclavada	19,9 µl
DNA (100-200ng)	1,0 µl
Volume Final	25,0 µl

O programa utilizado para a amplificação dos retrotransposons consiste em uma etapa inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 34 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C e uma etapa final de 5 minutos a 72°C, seguida de 4°C.

3.2.5 Digestão com enzimas de restrição

Foram utilizadas enzimas de restrição para isolar sequências repetitivas seguindo-se o procedimento descrito abaixo:

- colocar em um tubo de 1,5 mL para cada enzima de restrição: 30µl de DNA genômico (100ng/µl); 3 U de enzima; 10µl de tampão e H₂O milli-Q q.s.p. para 100µl de volume final;
- digerir por 12-16h em banho-maria a 37°C;
- fracionar os DNAs digeridos em gel de agarose e submetê-los a 100V e 220 mA por 4 horas. No mesmo gel, fracionar um marcador de peso molecular conhecido.

3.2.6 Purificação do DNA digerido com enzima de restrição

Para a purificação das amostras de DNAs digeridas, foi utilizado o Kit Rapid Gel Extraction (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante:

- a) cortar a área do gel que contém o fragmento de DNA com uma gilete limpa. Minimizar a quantidade de agarose ao redor do fragmento cortado;
- b) pesar o pedaço de gel. Se o gel for $\leq 2\%$, colocar 400 mg de gel em um tubo de polipropileno de 1,5 mL. Dividir os pedaços de gel que excederem a 400 mg em tubos adicionais. Adicionar 30 μ l do tampão de solubilização de gel (L1) para cada 10mg de gel.
- c) incubar a 50°C por 15 minutos. Misturar a cada três minutos para a dissolução total do gel. Após os pedaços de gel parecerem dissolvidos, incubar por mais cinco minutos;
- d) colocar a coluna dentro do tubo de lavagem de 2 mL. Pipetar a mistura do passo c dentro da coluna. Centrifugar a mistura em microcentrífuga a 12.000x g por um minuto. Descartar o líquido do fundo do tubo de lavagem;
- e) colocar a coluna de volta no tubo de lavagem de 2 mL. Adicionar 500 μ l do L1 na coluna. Incubara à temperatura ambiente por um minuto e centrifugar a mistura em microcentrífuga a 12.000x g por um minuto. Descartar o líquido do fundo do tubo de lavagem;
- f) recolocar a coluna dentro do tubo de lavagem de 2 mL. Adicionar 700 μ l do tampão de lavagem L2 na coluna. Incubar à temperatura ambiente por cinco minutos. Centrifugar a mistura em microcentrífuga a 12.000x g por um minuto. Descartar o líquido do fundo do tubo de lavagem.
- g) centrifugar novamente por um minuto para remover o tampão de lavagem residual;
- h) colocar a coluna no eppendorf de 1,5mL. Adicionar 50 μ l de TE.

3.2.7 Clonagem do DNA repetitivo

Os fragmentos de DNA digeridos e extraídos do gel de agarose foram clonados com o Kit pMos Blue (GE Healthcare). O Protocolo consiste em:

3.2.7.1 Ligaçãõ com vetor

Para cada fragmento a ser clonado preparar uma reação de pK: (Segundo o protocolo do Kit)

- a) colocar em um eppendorf 2,5µl de H₂O milli-Q;
- b) adicionar 1µl do tampão pK 10x;
- c) adicionar 0,5µl de DTT 100mm;
- d) adicionar 5µl do produto a ser clonado;
- e) incubar a 22 °C por 40 minutos;
- f) aquecer a reação à 75 °C por 10 minutos;
- g) colocar no gelo por 2 minutos

Após a preparação da reação de pK, preparar a ligaçãõ:

- a) colocar em um tubo de eppendorf 10µl do produto obtido da reação de pK;
- b) adicionar 1µl do vetor pBluescript II KS+ (Stratagene)
- c) adicionar 1µl de DNA ligase.
- d) incubar por um intervalo de 2 a 16 horas a 22 °C.

3.2.7.2 Transformaçãõ

- a) pipetar 20µl de células competentes (*E. coli* DH5α) em um tubo de Eppendorf;
- b) adicionar 4µl do produto obtido na ligaçãõ nas células competentes, misturar suavemente;
- c) incubar as células no gelo por 30 minutos;
- d) dar um choque térmico nas células por exatos 40 segundos no banho-maria a 42 °C;

- e) colocar no gelo por 2 minutos;
- f) adicionar 80µl de meio soc em cada tudo;
- g) colocar no shaker a 225 rpm por uma hora;
- h) enquanto isso, adicionar 30µl de X-gal 2% para cada placa que vai ser usada;
- i) incubar a 37 °C de 12-16h.
- j) estocar a 4 °C em saco plástico fechado.

3.2.7.3 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes

Bactérias transformadas foram plaqueadas em meio L.B./ágar contendo ampicilina e X-gal. A placa foi deixada na estufa a 37 °C *overnight*. As colônias recombinantes (colônias brancas) foram retiradas com ponteiros estéreis e inoculadas em 5 mL de meio L.B. líquido contendo ampicilina, conforme descrito abaixo:

- a) fazer 200mL de meio L.B (1g de peptone 140; 0,5g extrato de levedura; 1g NaCl; 96 ml H₂O);
- b) colocar 5 mL de meio nos tubos de ensaio autoclavados e quando o meio estiver morno, adicionar ampicilina (200µl H₂O/0,010ng de ampicilina);
- c) selecionar as bactérias transformadas (colônias brancas) e, com um tip, raspá-las e colocá-las no tubo de ensaio;
- d) colocar os tubos de ensaio no shaker a 37 °C por 12-16h com 225 rpm.

3.2.8 Hibridação em membrana

3.2.8.1 Processamento do gel e transferência do DNA para membrana (*Southern blotting*) de acordo com Sambrook *et al.* (2001)

- a) colocar o gel em vasilha e cobrir com solução de depurinação (HCl 0,25N). Agitar de 10 a 12 minutos;
- b) descartar a solução de depurinação e lavar o gel com água destilada;

- c) cobrir o gel com solução de desnaturação (NaCl 1,5M, NaOH 0,5). Agitar por 25 minutos;
- d) descartar a solução de desnaturação e lavar o gel com água destilada;
- e) cobrir o gel com solução de neutralização (NaCl 1,5M, Tris-HCl 0,5M, pH 7,5). Agitar por 30 minutos. Enquanto neutraliza, iniciar o preparo do “capillary blotting”;
- f) colocar 20xSSC em uma vasilha e colocar um suporte de vidro por cima. Colocar uma folha de papel de filtro (saturado com 20xSSC), com as pontas imersas no 20xSSC da vasilha;
- g) colocar o gel no papel de filtro e sobre esse, a membrana de nylon, sem formar bolhas;
- h) sobre a membrana de nylon, colocar 3 folhas de papel de filtro umidecidas em 20xSSC, cortadas no tamanho do gel;
- i) cobrir com papel absorvente (6-7 cm de altura);
- j) colocar uma placa de vidro e um peso (0,5 Kg) sobre a pilha de papel absorvente. Deixar transferir *overnight*;
- k) desmanchar o blotting e lavar a membrana em 6xSSC por 5 minutos;
- l) colocar a membrana entre dois papéis de filtro e secar em estufa 75 °C por 1h 45 minutos.

3.2.8.2 Hibridação de DNA imobilizado em membrana

Para a marcação da sonda de DNA repetitivo, hibridação e detecção dos sinais foi utilizado o kit quioluminescente ECL – *direct nucleic acid labelling and detection systems*, da GE Healthcare. O protocolo seguiu a descrição do fabricante:

- a) colocar a membrana em uma solução de pré-hibridação (NaCl 0,5M, agente de bloqueio 5% e tampão de hibridação) a 42 °C, com leve agitação por 1 hora;

- b) desnaturar 100ng do DNA da sonda, na concentração de 10ng/ μ l de água, e colocar no gelo por 5 minutos;
- c) adicionar *DNA labelling reagent* e glutaraldeído (ambos do kit), em volumes equivalentes ao da sonda. Agitar levemente;
- d) incubar 20 minutos a 37°C;
- e) após a marcação, juntar a sonda com tampão de hibridação e colocar em um tubo de vidro contendo a membrana. Hibridar a 42°C em forno de hibridação com *shaker*, de 12 á 16 horas.
- f) descartar o tampão de hibridação e adicionar 100mL de 5xSSC ligeiramente aquecido. Agitar no forno de hibridação por 5 minutos;
- g) descartar o 5xSSC e colocar 100mL de tampão primário (Uréia 6M, SDS 4g 0,4% e 12,5ml de 20xSSC). Agitar 10 minutos no forno de hibridação;
- h) repetir o item g 2 vezes;
- i) colocar a membrana em uma vasilha e cobrir com tampão secundário (2xSSC) por 5 minutos;
- j) repetir o item i;
- k) detectar a marcação, envolvendo a membrana em filme de PVC e expondo-a a um filme de raio-X por 30 minutos;
- l) revelar e fixar o filme.

3.2.9 Reação de amplificação para o sequenciamento

Os *primers* utilizados na reação de PCR de sequenciamento são os mesmos das reações de amplificação dos retrotransposons, *Rex1*, *Rex3* e também o M13 para os produtos clonados. Foram feitas duas réplicas do *primer forward* para cada produto de PCR purificado.

- a) Foi utilizado o Kit DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare) para as reações de PCR de sequenciamento.

b) Para cada amostra a ser sequenciada preparar a reação (MIX):

Soluções	Volume
Pré-Mix (KIT)	2,0 μ l
Primer F ou R (3,3 mMol)	1,0 μ l
DNA *	Até 5,0 μ l
Água estéril	X μ l
Volume Final	9,0 μ l

*Concentração final = 200-500ng para plasmídeo ou 40-100ng para DNA purificado.

O programa utilizado para o sequenciamento consiste em uma etapa inicial de 2 minutos a 96°C seguido de 36 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C e uma etapa final de 4°C.

3.2.10 Purificação do DNA amplificado na reação de sequenciamento e análise das amostras em sequenciador ABI PRISM 377.

Após o final da amplificação procedeu-se, como descrito abaixo, a purificação das amostras visando a eliminação dos nucleotídeos terminadores não incorporados:

- adicionar 2 μ l de acetato de sódio 3M e 80 μ l de etanol 95% em temperatura ambiente em cada tubo contendo o produto de seqüenciamento.
- misturar no vórtex rapidamente e centrifugar a 20°C por 30 minutos a 14000g. Remover o sobrenadante cuidadosamente por aspiração.
- adicionar 400 μ l de etanol 70% em temperatura ambiente e, em seguida centrifugar a 20°C por 5 minutos a 14000g.
- descartar cuidadosamente o sobrenadante por aspiração e deixar o *pellet* secar por uma hora em temperatura ambiente protegido da luz. O *pellet* seco pode ficar guardado por um mês a 4°C protegido da luz.

As amostras amplificadas e purificadas foram analisadas em um sequenciador automático *ABI PRISM 377* de acordo com os procedimentos a seguir:

- a) lavar as placas com detergente Alconox 2%, enxaguar bem (aproximadamente 15 minutos) com água da torneira quente e, em seguida, enxaguar com 1,5 l de água Milli-Q a 85°C. Colocar em suporte adequado para secagem.
- b) colocar o cassete de montagem da placa sobre a bancada e sobre este a placa anterior. Sobre as bordas da placa anterior, colocar os espaçadores e, em seguida colocar a placa posterior. As anotações em relevo na placa devem ficar voltadas para fora.
- c) alinhar as placas e deslizá-las até o encaixe do recorte da placa anterior com o pino existente na extremidade do cassete.
- d) fechar as presilhas e colocar o adaptador onde será encaixada à seringa com o gel de poliacrilamida.
- e) preparar o gel de poliacrilamida (5% Long Ranger, 6M Uréia, 1X TBE) como segue:

Soluções	Volume
Uréia	18 g
H ₂ O Milli-Q Autoclavada	25 ml
Long Ranger 50%	5 ml
TBE 10X	5 ml
Persulfato de Amônia 10%	250 µl
TEMED	35 µl

- f) misturar os quatro primeiros reagentes e filtrar em membrana com poros de $\leq 0,45$ μm . Adicionar o APS e o TEMED no momento da aplicação do gel nas placas.
- g) misturar gentilmente a solução e, em seguida, transferir o gel para uma seringa de 50 mL que deve ser imediatamente acoplada ao local de aplicação do gel para preenchimento das placas anteriormente preparadas.
- h) aplicar o gel nas placas e, em seguida colocar o pente invertido no local apropriado entre as placas (lado oposto ao da aplicação).
- i) após meia hora de polimerização, colocar papel toalha embebido em tampão sobre as extremidades das placas e cobrir com filme plástico. Esperar duas horas para total polimerização.
- j) remover o pente e lavar as placas sem retirá-las do cassete. As placas deverão estar completamente limpas, sem restos de poliacrilamida ou fragmentos de papéis utilizados para limpeza e secagem.
- k) preparar 1,4 litro de TBE 1X para encher as cubas anódica e catódica.
- l) colocar a cuba de cor âmbar na parte de baixo do seqüenciador, encaixar o cassete com as placas no seqüenciador e fechar as presilhas.
- m) fechar a porta do sequenciador e fazer um *Plate check* das placas para verificar se elas estão limpas.
- n) encher as cubas com tampão TBE 1X. Não se deve ultrapassar os limites marcados como máximo.
- o) iniciar a pré-corrída para estabilização do meio e para atingir a temperatura de 51°C.
- p) durante a pré-corrída ressuspender as amostras em 3,5 μl de tampão de carregamento (Formamida:Blue dextran-5:2). Passar os tubos pelo vórtex e

- desnaturar as amostras por 5 minutos a 95°C. Colocá-las imediatamente no gelo após a desnaturação.
- q) após 10 minutos de corrida, aplicar cerca de 50 µl de tampão de carregamento no gel. Fechar a porta e deixar correr por dois minutos. Abrir a porta e retirar o excesso de corante com a seringa cheia de tampão de corrida.
 - r) colocar o pente de modo que toque todo o gel ao mesmo tempo, deslizando-o de forma que não se incline. Introduzi-lo apenas 2 mm no gel. Depois de introduzido não pode ser removido, pois ocasionará vazamento das amostras.
 - s) aplicar até 2 µl de amostra em cada pocinho dependendo da intensidade do sinal.
 - t) fechar a porta do seqüenciador e esperar a pré-corrída atingir 15 minutos.
 - u) cancelar a pré-corrída.
 - v) verificar o número de linhas, o tamanho da placa, a matriz adequada, o número de horas de corrida e importar a lista de amostras.
 - x) iniciar a corrida.
 - z) após o término da corrida, posicionar as linhas sobre as amostras que aparecem na imagem do gel.

3.2.11 Edição das sequências

Para o alinhamento das sequências foram utilizados os programas *Bioedit* (Hall, 1999), *Dambe* (Xia, 2000).

3.2.12 Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente foi realizado de acordo com Pinkel *et al.*, (1986) com algumas modificações.

3.2.12.1 Marcação da sonda por *nick translation*

Método de nick translation utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen). Mix para uma lâmina:

- a) 1µl de DNA (200µg/µL);
- b) 1µl de dNTP mix;
- c) 1µl de enzima mix;
- d) H₂O para completar 9µl.
- e) misturar bem, centrifugar brevemente e incubar por 30 minutos a 16° C (no termociclador);
- f) Parar a reação com a adição de 1µl de Stop Buffer;
- g) acrescentar 1/10 do volume (1µl) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume (22µL) de etanol 100% gelado;
- h) misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70° C por 1 hora;
- i) centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4° C;
- j) descartar o sobrenadante e adicionar 50µL de etanol 70% gelado;
- l) centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4° C;
- m) descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
- n) ressuspender em 6µL de água Milli Q.

3.2.12.2 Marcação da sonda por PCR

Marcação via PCR utilizando Digoxigenina 11 dUTP

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Tampão da enzima	10X	5.0 µl
DNA		Variável 10-100ng
dATP	2mM	1,0 µl
dCTP	2mM	1,0 µl
dGTP	2mM	1,0 µl
dTTP	2mM	0,7 µl
Digoxigenina 11dUTP	1mM	0,6 µl
Primer F	10mM	0,5 µl
Primer R	10mM	0,5 µl
MgCl ₂	50mM	2,0 µl
dH ₂ O		
Taq polimerase	5U/ µl	0,5 µl
Total		50 µl

Marcação via PCR utilizando Biotina 14 dATP

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Tampão da enzima	10X	5.0 µl
DNA		Variável 10-100ng
dATP	2mM	1,0 µl
dCTP	2mM	1,0 µl
dGTP	2mM	1,0 µl
dTTP	2mM	0,5 µl
Biotina 14 dATP	1mM	0,5 µl
Primer F	10mM	0,5 µl
Primer R	10mM	0,5 µl
MgCl ₂	50mM	2,0 µl
dH ₂ O		
Taq polimerase	5U/µl	0,5 µl
Total		50 µl

- a) após a amplificação, checar o produto de PCR em gel de agarose 1%;
- b) precipitar o produto de PCR com 1/10 do volume da reação com acetato de sódio-3M e duas vezes o volume total da reação com etanol PA gelado;
- c) incubar a -20°C overnight;

- d) centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos;
- e) descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 50 µl etanol 70%;
- f) centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos;
- g) descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir 40µl de água.

3.2.12.3 Tratamento das lâminas contendo preparações cromossômicas

Usar lâminas recém preparadas ou descongelar as lâminas em temperatura ambiente uma hora antes do uso.

- a) Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente (com agitação);
- b) Desidratar as lâminas em séries alcoólica 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (com agitação);
- c) Incubar as lâminas em 100µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
- d) Lavar 3 x por 5 minutos em 2xSSC (com agitação);
- e) Lavar durante 5 minutos em PBS 1x;
- f) Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37°C;
- g) Lavar em PBS 1x durante 5 minutos a temperatura ambiente (com agitação);
- h) Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- i) Lavar em PBS 1x por 5 minutos (com agitação);
- j) Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100%) por 5 minutos cada;
- k) Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;

- l) Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- m) Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada.

3.2.12.4 Hibridação

- a) preparar a câmara úmida a 37°C;
- b) montar cada lâmina com 50µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C;

Solução de Hibridação: (estringência 77%) sonda única

- 200µl Formamida (50% de Formamida);
- 80µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 72µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda seca.
- Volume final 400µl

Solução de Hibridação: (estringência 77%) duas sondas (Double FISH)

- 200µl Formamida (50% de Formamida);
- 80µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 24µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda A
- 24µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda B
- Volume final 400µl

3.2.12.5 Lavagens do FISH

- a) lavar 2 vezes em formamida 15%/ 0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada (com agitação);

- b) lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada (com agitação);
- c) incubar as lâminas em tampão 5% NFD/4xSSC por 15 minutos;
- d) lavar 2 vezes 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação).

3.2.12.6 Detecção e Amplificação do Sinal para sondas marcadas com biotina e digoxigenina.

- a) incubar as lâminas com 100µl de FITC (1µl FITC/1000µl NFD) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C;
- b) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação);
- c) incubar com 100µl de anti-avidina (10µl anti-avidina/990µl de NFD) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C;
- d) Lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação)
- e) Incubar as lâminas com 100µl de FITC (1µl FITC/1000µl NFD) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C;
- f) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação);
- g) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (secar);
- h) incubar as lâminas com 100µl de anti digoxigenina rodamina conjugada (5µl anti digoxi rodamina / 995µl NFD) durante 1 hora em câmara úmida e escura, a 37°C;
- i) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação);

j) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (secar).

3.2.12.7 Detecção de duas sondas (Double FISH)

- a) montar um mix contendo 994 μ l + 1 μ l de avidina FITC conjugada + 5 μ l de anti digoxigenina rodamina conjugada;
- b) incubar as lâminas com 100 μ l cada do mix de anticorpos durante 1 hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- c) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação);
- d) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (secar).

Montagem das lâminas com iodeto de propídeo

- a) misturar 200 μ l de *antifading* com 8 μ l de iodeto de propídeo (50 μ g/ml);
- b) colocar 25 μ l da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

Montagem das lâminas com DAPI

- a) misturar 400 μ l de *antifading* com 1 μ l de DAPI (0,2 mg/ml);
- b) colocar 50 μ l da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

3.2.13 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

A técnica de AFLP é baseada na amplificação, via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição. Após a clivagem do DNA, é ligado a esses fragmentos adaptadores e posteriormente é realizado a amplificação desses fragmentos. Esta técnica permitiu buscar polimorfismos dentro do genoma. As reações de AFLP foram realizadas conforme descrito por Vos *et al.* (1995), com modificações e consiste nas seguintes etapas:

Restrição do DNA Genômico

Foram utilizadas duas enzimas de restrição:

- a) Uma enzima de corte freqüente: *Taq* I (enzima de restrição de 4pb)
- b) Uma enzima de corte raro: *Eco* RI (enzima de restrição de 6 pb).

Que produzam três tipos de fragmentos:

- 1- Com cortes por *Eco* RI em ambas as extremidades.
- 2- Com cortes por *Taq* I em ambas extremidades.
- 3- Com corte por *Eco* RI em uma extremidade e por *Taq* I na outra extremidade.

a) Digestão 1: 1h 30' a 65 C

Reagentes	Quantidade na Reação	Concentração da Solução de Trabalho	Volume
DNA	500-700 ng	100 ng	5 µl
<i>Taq</i> I endonuclease	5U	800U/µl	0,1 µl
Tampão OPA (one phor all)	1X	10X	2,5 µl
BSA	1250 ng	500ng/ µl	2,5 µl
DTT	5mM	5mM	1 µl
H ₂ O	X	_____	13,9 µl
Volume Total			25 µl

b) Digestão 2: 2h a 37°C

Foi preparado um mix de 15 µl total, contendo os reagentes que estão no quadro a seguir. Após 1h30' da Digestão 1 adicionamos aos tubos os 15 µl da reação de Digestão 2 (obtendo um volume final de 40 µl) e se inicia uma nova incubação por 2h a 37°C.

Reagentes	Quantidade na Reação	Concentração da Solução de Trabalho	Volume
<i>Eco</i> RI endonuclease	5U	50U/µl	0,1 µl
Tampão OPA (one phor all)	1X	10X	1,5 µl
BSA	750 ng	500ng/ µl	1,5 µl
DTT	5mM	5mM	1 µl
H ₂ O	X	_____	10,9 µl
Volume Total			25 µl

c) Ligação: 16-18h a 16 C (*overnight*)

Nos 40  l da digestão, adicionar 10  l de uma soluço que contenha:

Reagentes	Quantidade na Rea�o	Concentra�o da Solu�o de Trabalho	Volume
T4 DNA ligase	1U	1u/�l	1 �l
Adaptador <i>EcoRI</i>	5 pmol	5 pmol/�l	1 �l
Adaptador <i>Taq I</i>	50 pmol	50 pmol/�l	1 �l
ATP	1 mM	1mM	1 �l
Tamp�o OPA (one phor all)	1X	10X	1�l
BSA	500 ng	500ng/ �l	1 �l
DTT	5mM	5mM	1 �l
H ₂ O	X	_____	3 �l
Volume Total			10 �l

Diluir a rea o de 50 l em 2X com TE.

d) Amplifica o Pr -seletiva:

Os *primers* usados neste passo consistem em uma seq ncia comum (Tabela 01), uma seq ncia específica enzimática e uma extensão seletiva de base única no extremo 3'. A PCR   feita da seguinte maneira:

Reagentes	Quantidade na Rea�o	Concentra�o da Solu�o de Trabalho	Volume
DNA diluido	25-50ng	3ng	15 �l
<i>Primer EcoRI*</i> (+1 base seletiva)	10pmol/�l (75ng)	10pmol/�l (75ng)	1 �l
<i>Primer Taq I</i> (+1 base seletiva)	10pmol/�l (75ng)	10pmol/�l (75ng)	1 �l
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	5 �l
<i>Taq</i> Polimerase (Bioline)	1U	5u/�l	0,2�l
Tamp�o	1X	10X	5 �l
MgCl ₂	3mM	50mM	3 �l
H ₂ O	X	_____	19,8 �l
Volume Total			50 �l

O programa utilizado para a pr -amplifica o consiste em uma etapa inicial de 2 minutos a 94 C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94 C, 1 minutos a 56 C e 1 minuto a 72 C e uma etapa final de 5 minutos a 72  C, seguida de 4 C.

Diluir novamente o produto da PCR em 6 vezes com TE.

e) Amplificação

Utilizar agora os *primers* (Tabela 01) marcados (os *EcoRI*) nos quais a sequência é idêntica aos *primers* da pré-seleção + 2 nucleotídeos seletivos adicionados na extremidade 3'. Esses dois nucleotídeos adicionais podem ser quaisquer das 16 possíveis combinações dos 4 nucleotídeos dois a dois.

Reagentes	Quantidade na Reação	Concentração da Solução de Trabalho	Volume
DNA preamplificado diluído	5µl	3ng	5 µl
<i>Primer EcoRI*</i> (+3 base seletiva)	5pmol/µl	10pmol/µl	0,5 µl
<i>Primer Taq I</i> (+3 base seletiva)	10pmol/µl	10pmol/µl	3 µl
dNTPs	0,2 mM	2 mM	2 µl
<i>Taq</i> Polimerase (Bioline)	1U	5u/µl	0,2µl
Tampão	1X	10X	2 µl
MgCl ₂	1,5mM	25mM	1,2 µl
H ₂ O	X	_____	6,1 µl
Volume Total			20 µl

Programa Termociclador

- 1- 94°C - 2 min
- 2- 94°C - 30 seg
- 3- 65°C – 30 seg, -0.7°C por ciclo partindo do próximo ciclo até chegar a 56°C
- 4- 2°C – 1 min
- 5- repetir os passos 2 a 4 por 13 vezes
- 6- 30X - 94°C – 30seg
56°C – 30 seg
72°C – 1 min
- 7- 72°C – 10 min
- 8- 4°C ∞

f) Análise de fragmentos no sequenciador automático de capilar:

Para realizar a análise dos resultados, foram utilizados 1µl do produto amplificado, 0,25µl de padrões internos (marcador size standard) e 18,75µl de formamida deionizada.

As reações obtidas foram analisadas em sequenciador automático (sequenciador ABI PRISM 3100 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) usando capilares de 36 cm, polímero POP4_{TM} como meio de separação e Gene Scan_{TM}-500 LIZ_{TM} como marcador (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os resultados foram analisados através do programa ABI Prism® Genemapper Software versão 3.7 e o programa ABI Prism® Genemapper Software versão 4.0 de AFLPs.

Tabela 1. Adaptadores e *primer* com suas sequências correspondentes usados para buscar sequências sexo-específica em *H. leucofrenatus* através da técnica de AFLP.

Nome		Sequências
Adaptadores <i>EcoRI</i>	<i>Eco</i> top strand	5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'
	<i>Eco</i> bottom strand	5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'
Adaptadores <i>TaqI</i>	<i>Taq</i> top strand	5' GACGATGAGTCCTGAC 3'
	<i>Taq</i> bottom strand	5' CGGTCAGGACTCAT 3'
<i>Primers EcoRI</i>	E01	5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
	E32	*5' GACTGCGTACCAATTCA AC 3'
	E33	*5' GACTGCGTACCAATTCA AG 3'
	E35	*5' GACTGCGTACCAATTCA CA 3'
	E37	*5' GACTGCGTACCAATTCA CG 3'
	E38	*5' GACTGCGTACCAATTCA CT 3'
	E40	*5' GACTGCGTACCAATTCA GC 3'
	E42	*5' GACTGCGTACCAATTCA GT 3'
<i>Primers TaqI</i>	T01	5' GATGAGTCCTGACCGAA 3'
	T02	5' GATGAGTCCTGACCGAC 3'
	T32	5' GATGAGTCCTGACCGAA AC 3'
	T33	5' GATGAGTCCTGACCGAA AG 3'
	T37	5' GATGAGTCCTGACCGAA CG 3'
	T38	5' GATGAGTCCTGACCGAA CT 3'
	T48	5' GATGAGTCCTGACCGA CAC 3'
	T49	5' GATGAGTCCTGACCGA CAG 3'
	T50	5' GATGAGTCCTGACCGA CAT 3'
	T54	5' GATGAGTCCTGACCGA CCT 3'

*primers marcados

4. Resultados e Discussão

As informações obtidas nos estudos moleculares realizados com representantes da subfamília Hypoptopomatinae foram organizadas na forma de artigos científicos que são relacionados a seguir como capítulos.

4.1 Capítulo 1 - Mapeamento cromossômica dos elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* em espécies da Subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae).

4.2 Capítulo 2 - Organização genômica de elemento repetido no genoma de *Hisonotus leucofrenatus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae).

4.3 Capítulo 3 - Isolamento e caracterização de sequências satélites na espécie *Pseudotocinclus tietensis* (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae).

4.4 Capítulo 4 - Prospecção de sequências sexo-específicas em *Hisonotus leucofrenatus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae) com o uso da técnica de AFLP.

4.1 Capítulo 1

**Mapeamento cromossômico dos elementos retrotransponíveis
Rex1 e *Rex3* em espécies da Subfamília Hypoptopomatinae
(Teleostei, Siluriformes, Loricariidae).**

Resumo

Elementos repetidos dispersos, transposons e retrotransposons, representam uma grande porção do genoma dos organismos eucariontes. Esses elementos repetidos são chamados de sequências de transposição e podem ser definidos como entidades genéticas capazes de inserir-se em posições diferentes dentro do genoma e alterar a função de genes com os quais são associados. Tais elementos transponíveis têm um papel importante na manutenção estrutural e funcional do genoma e seu estudo tem permitido conhecer tanto aspectos da sua organização nos peixes, quanto da dinâmica do processo evolutivo destas sequências nestes organismos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi isolar, identificar e mapear fisicamente as sequências dos elementos transponíveis *Rex1* e *Rex3* presentes no genoma de espécies de peixes da subfamília Hypoptopomatinae, pertencente a ordem Siluriformes. As espécies desta subfamília apresentam uma ampla distribuição na América na Sul. Os elementos retrotransponíveis foram identificados através da amplificação com os *primers Rex1* e *Rex3* e a composição nucleotídica dos retrotransposons foi determinada por sequenciamento. Foi verificado em todas as espécies analisadas que o elemento retrotransponível *Rex1* contém de 520 à 563pb, enquanto o *Rex3* apresentou de 407 à 454pb. A análise comparativa destes retroelementos com informações já disponíveis na literatura revelou que os retrotransposons *Rex1* e o *Rex3* apresentaram uma alta similaridade com sequências de diferentes ordens de peixes. Na análise de distância genética, o elemento *Rex3* apresentou-se mais divergente que *Rex1*, porém os dois elementos formam grupos monofiléticos. Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente foram realizados para as espécies *Pseudotocinclus tientensis*, *Parotocinclus maculicaudas* e *Hisonotus leucofrenatus*, utilizando como sonda os elementos retrotransponíveis isolados para a espécie. Os elementos retrotransponíveis apresentaram um padrão de dispersão similar e tanto *Rex1* quanto o *Rex3* estão dispersos em todos os cromossomos da espécie. A ampla distribuição destes retrotransposons nos peixes sugere que os elementos *Rex* podem ter sido incorporados há muito tempo em seus genomas e que vem desempenhando um papel importante na evolução deste grupo.

Palavras-chave: Peixes, Genoma, Retrotransposon, Heterocromatina.

Introdução

Uma grande porção do genoma eucariótico é composta de elementos repetidos dispersos, que se propagaram fazendo cópias de si mesmos, com mobilidade franqueada para outros locais no genoma. Esses elementos repetidos são chamados de sequências de transposição e dentre eles destacam-se os que se propagam como fragmentos de DNA, conhecidos como transposons. Uma outra classe de sequências de transposição chamadas de retrotransposons, se propaga pela ação da transcriptase reversa, uma enzima que pode fazer um filamento de DNA a partir de RNA (Charlesworth *et al.*, 1994). No genoma dos eucariotos, dois tipos de retrotransposons podem ser comumente encontrados, os SINEs (“short interspersed elements”) e os LINEs (“long interspersed elements”), que se distinguem um do outro pelo comprimento dos segmentos e pela sua estrutura molecular (Singer, 1982; Martin, 1991; Okada, 1991; Charlesworth *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1997). No genoma dos peixes podem ser encontrados todos os tipos de elementos transponíveis (Volf *et al.*, 2003), porém poucos desses elementos foram estudados e mapeados nos cromossomos até o presente.

Segundo Koga *et al.* (2006), os elementos transponíveis participam da evolução do genoma porque sua atividade de transposição causa mutações estruturais e sua natureza repetitiva aumenta a taxa de rearranjos cromossômicos. O processo de transferência do transposon envolve sua excisão do cromossomo e este processo pode afetar a função do genoma hospedeiro; se a taxa de excisão é alta, certos genes podem se tornar geneticamente instáveis. Os autores consideram que o impacto dos elementos transponíveis no genoma de vertebrados pode ser maior do que normalmente se supõe e demonstram a participação destes elementos na geração de maior taxa de mutação que as taxas de mutações espontâneas determinadas para um mesmo organismo. Em medaka (*Oryzias latipes*), o elemento

transponível *To2* contribui com a variação genética atuando como um mutante natural em seu organismo hospedeiro. Dessa forma, o desenvolvimento e atuação dos elementos transponíveis na evolução genômica dos vertebrados parece ser mais significativo do que geralmente se postula (Koga *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram isolados e caracterizados os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* dispersos no genoma de peixes da subfamília Hypopotomatinae, pertencente a ordem Siluriformes. Essa subfamília é composta por 80 espécies, alocadas em 16 gêneros (Schaefer, 2003), distribuídas ao longo das terras baixas da América do Sul cis-andina, da Venezuela até o norte da Argentina. Estes peixes são geralmente referidos como “cascudinhos” no Brasil, onde o grupo é mais diversificado. Estudos envolvendo genética molecular são escassos nesse grupo e, desta forma o objetivo do presente trabalho foi isolar, caracterizar e mapear fisicamente em espécies da subfamília Hypoptopomatinae, os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3*, que têm se mostrado ativos durante a evolução de diferentes linhagens de peixes (Volff *et al.*; 1999, 2000, 2001b).

Material e Métodos

Extração de DNA e análises das amostras

Amostras de DNA total foram extraídas de exemplares de quatorze espécies da subfamília Hypoptopomatinae: *Hisonotus insperatus*, *Hisonotus* sp B. e *Corumbataia cuestae*, do ribeirão Alambari, Botucatu (SP); *C. tocantinensis*, do rio Vermelho, Goiás (GO); *Otocinclus vitattus*, do rio Taquari, em Coxim (MS); *O. flexilis* do alto rio Negro; *O. gibbosus*, do rio Betari em Iporanga (SP), *Parotocinclus maculicauda*, do rio do Peixe, no Município de Pedro de Toledo (SP) *Hisonotus leucofrenatus* do rio Canela, Joinville (SC); *Hypoptotoma guentheri* do rio Pirar, em Poconé (MT); *Pseudotothyris obtusa* do afluente rio Preto, Itanhaém (SP); *Otothyris travassossi* do riacho rosário, em Canavieiras (BA); *Hypoptopoma* sp do lago do

Vanico, em Carero (AM); *Pseudotocinclus tietensis* do rio Paraitinguinha, em Salesópolis (SP) . O DNA destas espécies foi extraído a partir de fragmentos de tecido do fígado, brânquias e músculos fixados em álcool absoluto, utilizando o método fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001). Após a purificação, a qualidade e a quantidade do DNA foram analisadas em gel de agarose e por espectrofotometria.

PCR para o isolamento de elementos retrotransponíveis conservados

Sequências parciais foram isoladas dos elementos retrotransponíveis RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3'), RTX1-R1 (5'-TCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3') e RTX3-F1 (5'-TACGGAGAAAACCCATTTTCG-3'), RTX3-R1 (5'-AAGTTCCTCGGTGGCAAGG-3') (Volf *et al.* 1999, 2000) foram amplificados por PCR.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µl contendo 100ng de DNA genômico, 0,2µM de cada *primer* citado acima, 0,16mM de dNTPs, 0,002U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1x tampão. As condições para a realização da técnica de PCR foram inicialmente uma desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de 95°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e de 72°C por 2 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%.

Hibridação *in situ* fluorescente

Cromossomos mitóticos dos exemplares foram preparados de células da região anterior do rim após tratamento *in vivo* dos exemplares por colchicina (Foresti, *et al.*, 1981) e foram submetidos a técnica de FISH (Pinkel, *et al.*, 1986). Os elementos *Rex1* e *Rex3* amplificados por PCR foram marcados e utilizados como sondas, que foram marcadas por PCR com Biotina (Biotin- 14-dATP) e Digoxigenina 11 dUTP.

As lâminas com cromossomos metafásicos foram incubados com RNase (40µg/ml) por 1h a 37°C e, após a desnaturação do DNA em formamida 70%/2xSSC por 2 minutos a 70°C, foram passada pela série alcoólica 70, 85 e 100%. Após secagem, o mix de hibridação foi colocado sobre o material das lâminas (100ng de sonda, 10mg/ml sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida em 30µl de volume final. A hibridação foi feita a 37°C *overnight* em câmara úmida. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas por 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada (com agitação), seguindo-se 3 lavagens em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada (com agitação); foram então, incubadas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos e lavadas com Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente (com agitação). Para a detecção da sonda, a preparação foi coberta com solução de avidina-FITC (Sigma) 0,07% conjugada com tampão NFDM/4xSSC por 30 minutos, seguida de uma amplificação do sinal usando 2.5% de anti-avidina-biotina conjugada (Sigma) com tampão NFDM/4xSSC, por 30 minutos. Os tratamentos com avidina-FITC e anti-avidina-biotina foram conduzidos a 37°C em câmara úmida.

Após cada passo para a detecção do sinal, as lâminas foram lavadas com Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente por três vezes. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídeo (PI) (0,2%) diluído com antifade (Vector) para as marcações com Biotina e coradas com *antifade*/DAPI para as marcações com digoxigenina. Os cromossomos foram analisados usando o microscópio Olympus BX 61 e as imagens foram capturados com câmera digital Olympus DP70 com software Image Pro MC.

Análise das sequências

As reações de sequenciamento foram feitas usando o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare). O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado em um sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 377 - Applied Biosystems). As sequências foram processadas e submetidas a pesquisas em bancos de sequências (DDBJ, EMBL, GenBank) com o programa BLAST/N (Altschul *et al.* 1990) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) – website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Após a análise, as sequências foram alinhadas usando os programas *Bioedit* (Hall, 1999) e *Dambe* (Xia e Xie, 2001) e submetidas à análise de distância genética pelos do programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007).

Resultados e Discussão

Os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* foram amplificados em 14 espécies da subfamília Hypoptopomatinae (*Hisonotus leucofrenatus*, *Pseudotocinclus tietensis*, *Otothyris travassossi*, *Pseudotothyris obtusa*, *Hypoptopoma guentheri*, *Hypoptopoma* sp., *Otocinclus flexilis*, *O. vitattus*, *O. gibbosus*, *Parotocinclus maculicaudas*, *Corumbataia cuestae* e *C. tocantinensis*, *Hisonotus insperatus* e *Hisonotus* sp. B).

Para 13 das 14 espécies em que foram utilizadas as sequências amplificadas, o elemento retrotransponível *Rex1* apresentou uma banda de aproximadamente 550pb (Figura 1), enquanto o *Rex3* apresentou bandas de aproximadamente 450pb (Figura 2) para as 14 espécies em análise. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Ozouf-Costaz *et al.* (2004) onde os autores identificaram os elementos transponíveis *Rex1* e *Rex3* em 13 espécies de peixes da Antártida.

A identificação das sequências parciais dos elementos retrotransponíveis foi realizada nas espécies *O. flexilis* (*Rex1*, *Rex3*), *H. leucofrenatus* (*Rex1* e *Rex3*), *P. tietensis* (*Rex1* e *Rex3*) e *C. cuestae* (*Rex3*) (Figuras 3 e 4). E os resultados das análises que o elemento retrotransponível *Rex1* é composto por 563pb em *O. flexilis*, 553pb em *H. leucofrenatus* e 520pb em *P. tietensis*, enquanto o elemento retrotransponível *Rex3* apresentou 454pb na espécie *P. tietensis*, 448pb para *H. leucofrenatus*, 407pb para *C. cuestae* e 413pb para *O. flexilis*. A análise comparativa destes retroelementos com informações já disponíveis na literatura revelou que o retrotransposon *Rex1*, em todas as espécies sequenciadas, tem uma alta similaridade com sequências encontradas em espécies das ordens Perciformes (71-76%), Anguilliformes (75%), Beloniformes (77%), Cyprinodontiformes (75%), sendo que a maior similaridade em espécies encontrada para *Rex1* foi com espécies da ordem Perciformes. O retrotransposon *Rex3* apresentou também alta similaridade com sequências encontradas em espécies das ordens Tetraodontiformes (77%), Esociformes (78%), Cypriniformes (74-79%), Perciformes (76-78%). A alta similaridade encontrada entre as diferentes ordens indica que os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* estão conservados nos diferentes grupos de peixes e em vertebrados em geral.

Na análise da distância genética utilizando as sequências identificadas no presente trabalho e as sequências das espécies obtidas no *GenBank*, os representantes da subfamília Hypoptopomatinae formam um clado monofilético, tanto para *Rex1* quanto para *Rex3* (Figuras 5 e 6). Porém, o elemento *Rex3* é mais divergente na subfamília Hypoptopomatinae que em outros grupos de peixes (Figura 6).

Para se determinar a localização cromossômica dos elementos isolados *Rex1* e *Rex3* foram realizados experimentos de hibridação *in situ* fluorescente nas

espécies *H. leucofrenatus*, *Pseudotocinclus tientensis* e *Parotocinclus maculicaudas* (Figura 07), utilizando como sonda os elementos retrotransponíveis isolados para cada espécie. As sondas foram hibridadas tanto juntas (*double FISH*), como separadamente. Para todas as espécies analisadas, tanto o elemento retrotransponível *Rex1* quanto *Rex3* apresentaram um padrão de dispersão similar, sendo que os dois elementos retrotransponíveis estão organizados em pequenos *clusters* e dispersos em todos os cromossomos das espécies. Em todas as espécies analisadas o *Rex3* apresentou-se mais disperso que o *Rex1*. (Figuras 7).

Também foram realizadas hibridações usando sondas de uma espécie para a outra, além de sondas isoladas da espécie e ambas apresentaram resultados similares, mostrando que há um alto percentual de nucleotídeos idênticos para *Rex1* e para *Rex3* em nível interespecífico. Quando realizado a *double FISH* na espécie *Hisonotus leucofrenatus*, verificou-se que há cromossomos em que os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* estão localizados no mesmo *cluster* (Figura 8). Na hibridação usando as duas sondas, fica evidente que o elemento *Rex3* é mais disperso e mais abundante que o elemento *Rex1*. Os *clusters* formados na hibridação com os elementos *Rex1* e *Rex3* nas espécies analisadas coincidem com algumas regiões anteriormente (Andreatta *et al.*, 1992, 1993; Ferreira *et al.*, 2005).

Descrições de retrotransposons do grupo *Rex* ainda são pouco comuns entre os peixes. A localização de *Rex1* e *Rex3* foi mapeada em cromossomos de baiacu, *Tetradon nigroviridis* (Dasilva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004), em 13 espécies de peixes da Antártida (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004) e em *Astronotus ocellatus* (Mazuckelli e Martins, 2009). Todos estes trabalhos mostram que *Rex1* e *Rex3* apresentam-se preferencialmente acumulados em regiões de heterocromatina nos cromossomos e também podem estar associados com outros elementos transponíveis como é o caso do elemento retrotransponível *Zebulon*, que está

presente no genoma de baiacu, concomitantemente com *Rex3* (Bouneau *et al.*, 2003). Fischer *et al.* (2004) mostraram que os elementos transponíveis e retrotransposons muito frequentemente são colocados com minisatélites e normalmente acumulados em regiões de heterocromatina. Usando a técnica de FISH, os autores demonstram que *Tc1* e *Rex3* estão localizados na região da grande maioria dos centrômeros e de alguns telômeros, não estando presentes, contudo, em alguns cromossomos em preparações metafásicas de baiacu *Tetraodon nigroviridis*. Os autores destacam a diversidade de elementos transponíveis observada no genoma desta espécie de peixe, não encontrada em humanos e ratos.

Outros elementos transponíveis isolados em peixes também coincidem com regiões heterocromáticas, como é o caso do transposon *Tc1* isolado por Capriglione *et al.* (2002) na espécie *Chionodraco hamatus*. Em experimento de hibridação *in situ* fluorescente, esse elemento evidenciou marcações preferencialmente nas regiões heterocromáticas, tanto pericentroméricas como teloméricas. Esses dados são similares aos encontrados por Ozouf-Costaz *et al.* (2004) em estudos com os elementos *Rex3* e *Tc1* na mesma espécie.

O padrão de distribuição encontrado no presente trabalho para os elementos *Rex1* e *Rex3* nas espécies da subfamília Hypoptopomatinae é observado também para outros elementos transponíveis. Oliveira *et al.* (2003) mostraram a distribuição de duas sequências SINE denominadas ROn-1 e ROn-2 nos cromossomos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por hibridação *in situ* fluorescente. Nesse estudo os autores evidenciaram que ambas as sequências SINEs estão organizadas em pequenos *clusters* e distribuídas em todos os cromossomos desta espécie.

Os dados encontrados no presente trabalho, assim como os resultados de vários estudos descritos na literatura, identificam uma alta concentração dos

elementos repetidos dispersos nas regiões heterocromáticas dos cromossomos de peixes. Considerando que a atividade de transposição desses elementos pode causar mutações e que sua natureza repetitiva aumenta a taxa de rearranjos cromossômicos, sua aparente neutralização poderia explicar sua concentração em regiões heterocromáticas, caracterizadas pela menor quantidade de genes e de sequências de DNA importantes nessas regiões cromossômicas.

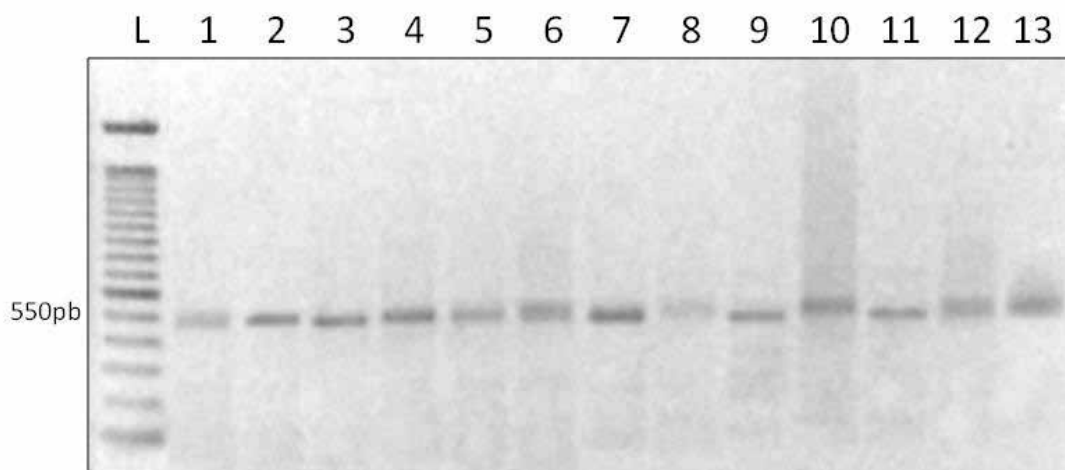


Figura 1. Gel com produto da amplificação com os *primers* para o retrotransposon *Rex1*. **a)** L) Ladder 1Kb plus; 1) *Otothyris travassossi*; 2) *Pseudotothyris obtusa*; 3) *Corumbataia tocantinensis*; 4) *Hypoptopoma guentheri*; 5) *Hypoptopoma* sp.; 6) *O. gibossus*; 7) *Otocinclus vitattus*; 8) *Hisonotus leucofrenatus*; 9) *Pseudotocinclus tietensis*; 10) *Otocinclus flexilis*; 11) *Hisonotus* sp. B; 12) *Parotocinclus maculicauda*; 13) *Corumbataia cuestae*.

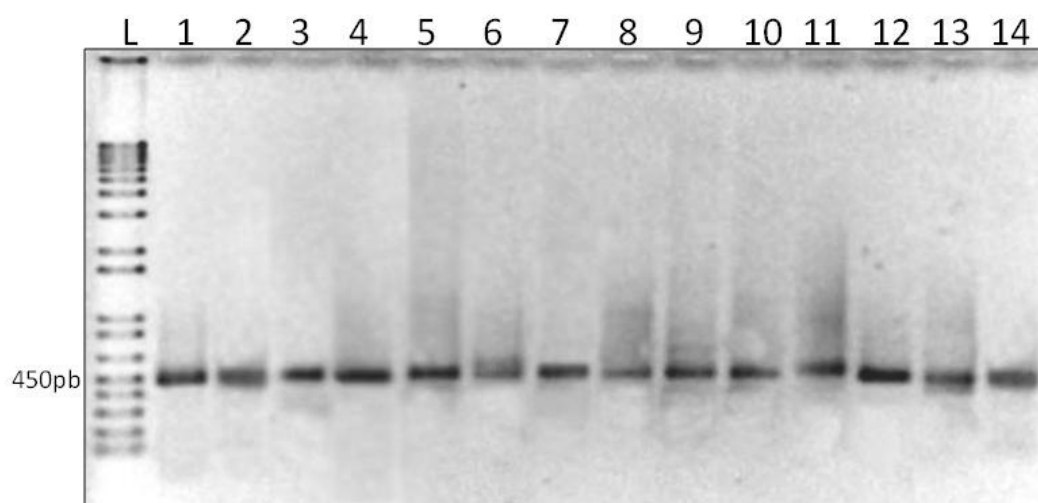


Figura 2. Gel com produto da amplificação com os *primers* para o retrotransposon *Rex3*. L) Ladder 1Kb plus; 1) *Otothyris travassossi*; 2) *Pseudotothyris obtusa*; 3) *Corumbataia tocantinensis*; 4) *Hypoptopoma guentheri*; 5) *Hisonotus insperatus*; 6) *Hypoptopoma* sp; 7) *Otocinclus gibbosus*; 8) *Otocinclus vitattus*; 9) *Hisonotus* sp B; 10) *Hisonotus leucofrenatus*; 11) *Otocinclus flexilis*; 12) *Corumbataia cuestae*; 13) *Parotocinclus maculicauda*; 14) *Pseudotocinclus tietensis*.


```

O._flexilis      CCTTCCTTTACAGCCTGACTCTGAAGGACAAGCTGGATTAAT-TGGAGTGGATGCACACATG-ACAAACTGGATCATGGA
H._leucofrenatus ---C...GACT...ACTCT.....A....AC.CAG.....CAGT...C..-T.C.....TC....
P._tietensis     -----...ACTTC...T....CAGT...C..GT.T.....AC....

O._flexilis      CTACCTCACCCATCGACCTCAATATGTGAGGACACGGGACTGTGTCTGACTTGGTGGTCTGTAGTACAGGAGCCCCGC
H._leucofrenatus .....A.C....A..G.....A.....A.....A.C.AC....G..A..T.
P._tietensis     .....A.C....A.....G.....C.T.A..AA.....A...C..G..G.TG..T.

O._flexilis      AAGGAACCGTCTTGGCGCCATTCCCTTTTACCCTGTACACCGCAGACTTTAAGTACAGCTCACTGAAGTGTACACCTACAG
H._leucofrenatus .G....G...C...A.....C.....T..T....C.T.....C.....T...T...
P._tietensis     .....A..C.....--...C....AG.....T..T....C.T.....C..C.....T.AC...

O._flexilis      AAGTTCTCTGATGACTCTGCTGTTGTTGGTCTCATTCTGATGAGGACGACCGGGAATACAGACAGGTGATTGAGAACTT
H._leucofrenatus .....A.....A..GA.C..A..C....AAA.A.....G...A.C..G.....G.AC....A..GTT..
P._tietensis     .....T.....C..GA...C..C..T..AA.CA....A.G...A.TA.G...A.GGAC.A....AG...

O._flexilis      TGTGGACTGGTGCCTATATAACCGCCTCCAGATTAACATTGGGAAAACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTTCGTAGACGGC
H._leucofrenatus .....T..GCGG...A.....T.CA....G...A..A.....C..C..GT..A
P._tietensis     ...A.....T..GC.A...AT..A...T.A...CA..A..G...A..A.....A..C..C...TC.A

O._flexilis      TCACCCTCTTCAACACCGGTGAACATCCAGGGAATGGACATCGACATGGTGGACAGTTACAAGTACCTGGGTGTTACCT
H._leucofrenatus A-G.AT..CC.TC..T.A.....T.....G.GA...T.TC...T.....
P._tietensis     A-.A.AAC.TTC..T.T..A.....A...A...T.CA.GA....TC...TGT.....-T.

O._flexilis      TAACACAAAAGTGGACTGGTCCGACAACACTGCTGCAGTGTATAAAAAAGGACAGAGCAGACTCTTTTCTGCTGAGGGAA
H._leucofrenatus A..T.AC..G.....A.TT....CA.....C..C.....-..C.....-.....
P._tietensis     A..T.AC...T.....A.TT...T.CT.....T..C.GG..-..C.C.....-.....
    
```

Figura 3. Alinhamento das sequências do elemento retrotransponível *Rex1* de *Otocinclus flexilis*, *Hisonotus leucofrenatus* e *Pseudotocinclus tietensis*.

```

P._tietensis      CCTACGGAGTCACCTCTCACTGGAAACAAGTCTGACTTACTGCCGTCATGCGAAATAAAGCTCCTGCTCTGTGTAC
H._leucofrenatus  .....TGC.-...ATTG.....CT.....A..AAGG.....CAC..-...AAA.....AGA....
C._cuestae       -----G..G.....CC..-...A..C.....
O._flexilis      -----G.....CC..G-.....C.....

P._tietensis      AGGGACTGAATGGCCCGTGGTAGGGAGCCATGTACCCCTGACTACCGAAGCACCTCCCACAAAAACCTCAAGGAACACA
H._leucofrenatus  .A...C.T....T..CC.A..C..T..TG...T..CA....C..G.....G...CT...GG.....G
C._cuestae       .....A..A.....CA....G.....CT.....C.G.....
O._flexilis      .....A.....-.....T.....-.....

P._tietensis      GTCGAATGCCTTCTCTAATCCACAAAGCACATGTGGACTGTTGGGCAAACCTCTCATGAACTGTTGAGGATCCTGGAGA
H._leucofrenatus  ...AT.....A.....TG...A..G..GAGTA..G..T..C....CC.CC.CA.TC...TGT..A.
C._cuestae       .....A.G.....A....G.....C.....CC.CG.....A...
O._flexilis      .....A.....A....G.....C.....CC.C.....T.-.

P._tietensis      GAGTAAA-ATCTGGTCCAGTGTGTTTATGATCAGGACGAAACCCGCACTGCTCCTCCTGAATCAGAGGTTCAACTATTAGC
H._leucofrenatus  AG....G.GT.....TA...CC...GC.....T...T..T....AA...CT.....G....CG.A
C._cuestae       .....G.G.....CC.C..C.....T...T..TC....A....C...A..G....C...
O._flexilis      .....G.G.....C-...CC.C..C.....-.....T.....G....CG.T

P._tietensis      TGGACTCTCCTCTAGTACCCCTGTGTAGACTTACCAGGGAGGCTGAGGAGTGTGATTCCCCCTGTAGTTGAAACACAC
H._leucofrenatus  CA..T.....T..C..C...TTG.CA.....C.T..C.....T..A....A..G..A.GA..A...GC.G..TT
C._cuestae       C.....T...C.....CA.....A...A.....T...A..G.....
O._flexilis      C.....-T...C.....-...-...-G-...-...G-...-...-...AGG.G-...-...

P._tietensis      CGTCCCAGGGGGGACCCCTTCTTAAAAAGAGGCACCACCACCCAGTCTGCCAA-
H._leucofrenatus  TC...-----TC.....T..G...TG..A.....T.....-
C._cuestae       .C...-----TC.....-...G...A
O._flexilis      .CC...-----C..T.....A...C..C..C.....T.G..A-
    
```

Figura 4. Alinhamento das seqüências do elemento retrotransponível *Rex3* das espécies *Pseutocinclus tietensis*, *Hisonotus leucofrenatus*, *Corumbataia cuestae* e *Otocinclus flexilis*.

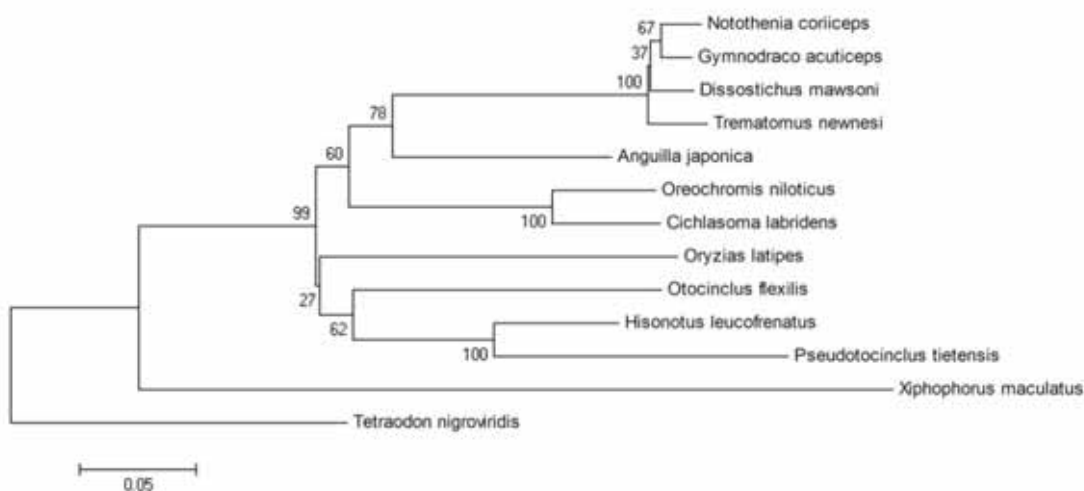


Figura 5. Análise filogenética com base nos dados das sequências parciais do elemento *Rex1* isoladas de três espécies da subfamília Hypoptopomatinae. O comprimento dos ramos é proporcional a distância evolutiva e os valores de *bootstrap* são indicados.

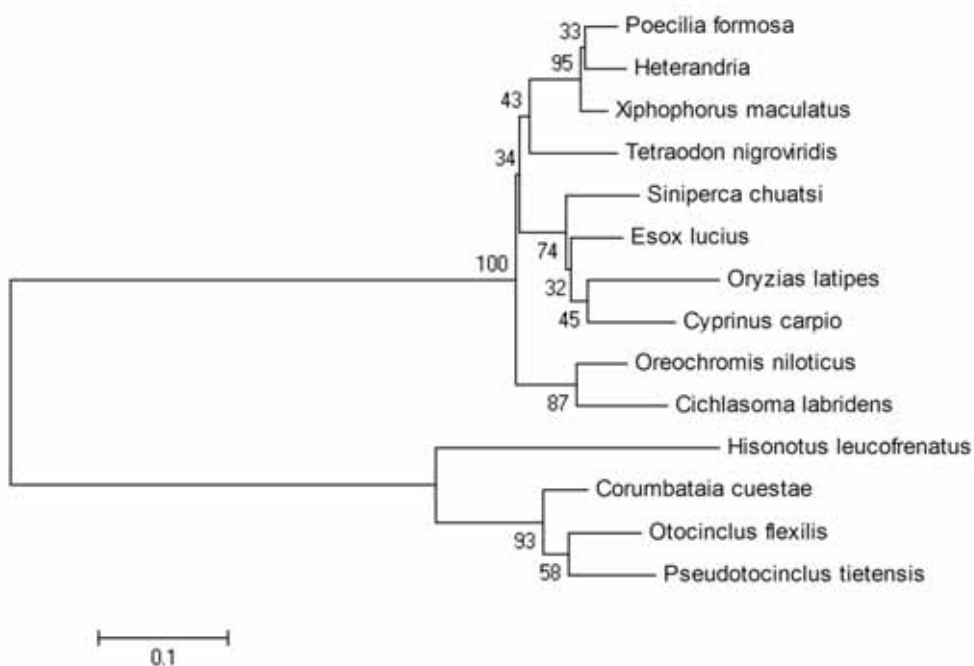


Figura 6. Análise filogenética com base nos dados das sequências parciais do elemento *Rex3* isoladas de quatro espécies da subfamília Hypoptopomatinae. O comprimento dos ramos é proporcional a distância evolutiva e os valores de *bootstrap* são indicados.

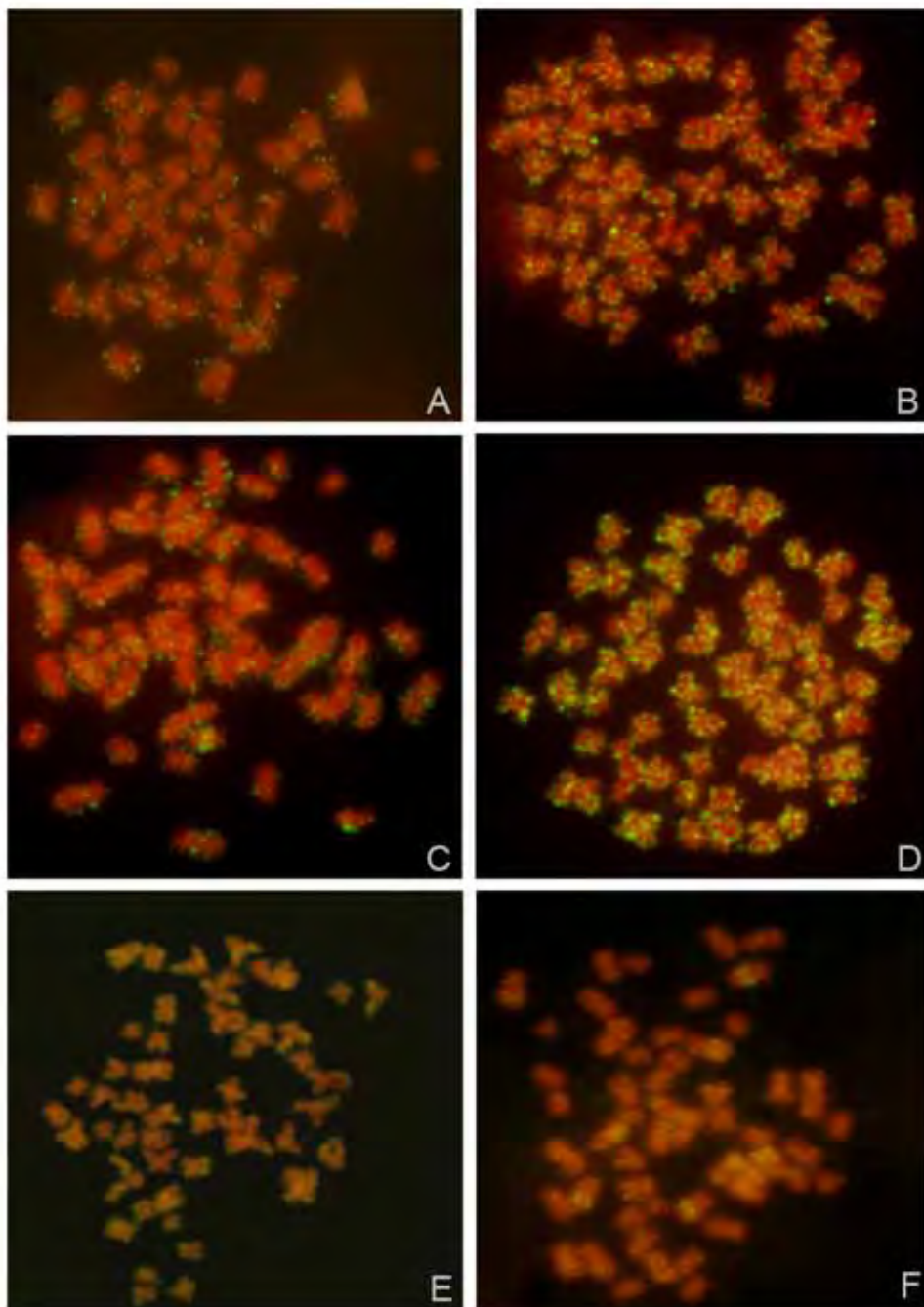


Figura 7. Metáfase das espécies da subfamília Hypoptopomatinae submetida à técnica de FISH com sonda do elemento transponível *Rex1* e *Rex3*: A) *Parotocinclus maculicaudas*-*Rex1*; B) *Parotocinclus maculicaudas*-*Rex3*; C) *Pseudotocinclus tietensis*-*Rex1*; D) *Pseudotocinclus tietensis*-*Rex3*; E) *Hisonotus leucofrenatus*-*Rex1*; F) *Hisonotus leucofrenatus*-*Rex3*.

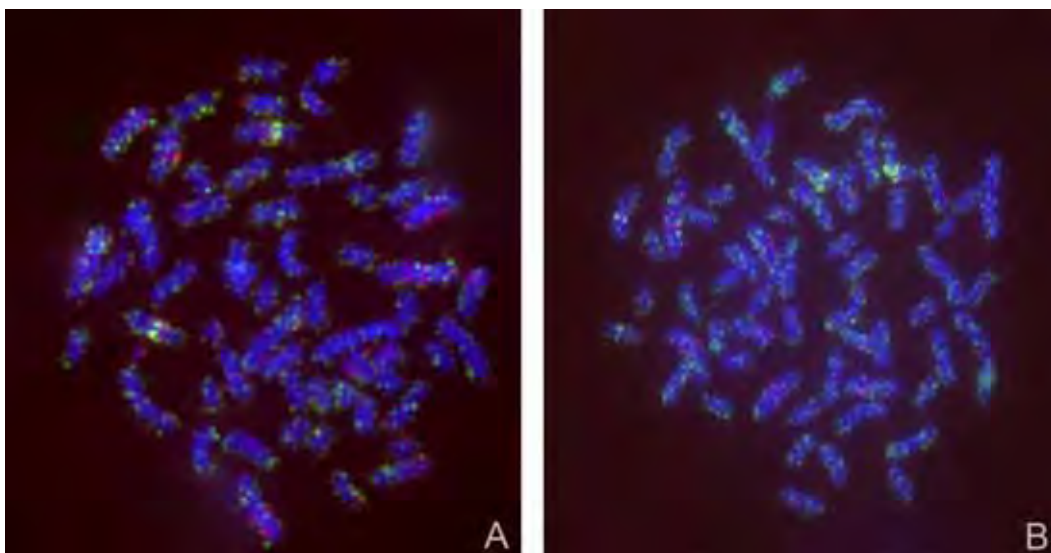


Figura 8. Metáfase de *Hisonotus leucofrenatus* submetida a técnica de *double FISH* com sondas dos elementos transponíveis *Rex1*(digoxigenina) e *Rex3* (biotina) (A-B).

Referências

- Altsuhul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.A.; 1990. Basic local alignment sear tool. *J. Mol. Biol*, 215, 403-10.
- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho S.A., 1992. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY Sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57, 369-372.
- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S., 1993. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63, 215-220.
- Bouneau, L.; Fisher, C.; Ozouf-Costaz, C.; Froschauer, A.; Jaillon, O.; Coutanceau, J.P.; Körting, C., Weissenbach, J.; Bernot, A.; Volff, J.N., 2003. An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research.* 13, 1686-1695.
- Capriglione, T.; Odierna, G.; Caputo, V.; Canapa, A.; Olmo, E., 2002. Characterization of a *Tc1*-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. *Gene* 295, 193-198.
- Charlesworth, B.; Snlegowski, P.; Stephan, W., 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Dasilva C.; Hadji H.; Ozouf-Costaz C.; Nicaud S.; Jaillon O.; Weissenbach J.; Crollius H.R., 2002. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99 (21), 1636-1641.

- Ferreira, D.C.; Chiachio, M.C.; Takako, A.K.; Andreato, A.A.; Oliveira, O.; Foresti, F., 2005. Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Caryologia* 58 (4), 387-395.
- Fischer, C; Bouneau, L.; Coutenceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volf, J.N.; Ozouf-Costaz, C., 2004. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336, 175-183.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. and Toledo, S.A., 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogen. Cell Genet.* 31, 137-144.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Koga, A., Iida, A., Hori, H., Shimada, A., Shima, A., 2006. Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: The medaka fish Tol2 element contributes to genetic variation without recognizable traces. *Mol. Biol. Evol.*; **23**, 1414–1419.
- Martin, S.L., 1991. LINEs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 505-508.
- Mazzuchelli, J. and Martins, C., 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-008-9346-7.
- Okada, N., 1991. SINEs. *Curr. Opinion Genet. Dev.* 1, 498-504.
- Okada, N; Hamada, M.; Ogiwara I and Ohshima K., 1997. SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* 205, 229-243.
- Oliveira, C; Wang, Y; Bryden, L.J.; Wright, J.M., 2003. Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent *in situ* hybridization. *Caryologia* 56, 177-185.

- Ozouf-Costaz, C., Brandt, J., Korting, C., Pisano, Eva., Bonillo, C., Coutanceau, J.P., Volff, J.N., 2004. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16 (1), 51-57.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW.: 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2934–2938.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F., 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaefer, S.A., 2003. Subfamily Hypoptopomatinae (Armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferreris Jr, C.L. (Eds) *Cheek List of the freshwater fishes of South America*. Porto Alegre: Edipucrs, p.321-329.
- Singer, M.F., 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76: 67-112.
- Stephan, W.; Cho, S. (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136, 333-341.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Sweeney, K. and Scharl, M., 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1427–1438.
- Volff, J.-N., Körting, C. and Scharl, M., 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1673–1684.

Volff, J.-N., Körting, C., Meyer, A. and Schartl, M., 2001b. Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. *Molecular Biology and Evolution* 18, 427–431.

Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C., 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*. 19, 74-678.

Xia, X. and Xie, Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.

4.2 Capítulo 2

Organização genômica de elemento repetido no genoma de

Hisonotus leucofrenatus

(Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae).

Resumo

Hisonotus leucofrenatus é identificada como espécie de peixe pertence à subfamília Hypoptopomatinae. Esta subfamília é representada por cerca de 80 espécies, conhecidas popularmente como “cascudinhos”. A espécie *H. leucofrenatus* apresenta cariótipo com $2n=54$ cromossomos e sistema de determinação sexual cromossômica do tipo ZZ/ZW, caracterizado pela presença de um bloco heterocromático adicional no cromossomo W. Tais características tornam esta espécie um bom modelo para estudos de diferenciação cromossômica e identificação de heterocromatina e DNA satélite. O objetivo do presente trabalho foi isolar sequências repetidas de exemplares de *H. leucofrenatus* coletados no ribeirão Cavalão, Joinville (SC). Para se isolar essa sequência foi realizada extração de DNA total com 8 enzimas de restrição (*Sspl*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI*, *AvaI*, *PvuII*, *BamHI*, *HinfI*). Nas análises em gel de agarose, foi visualizada uma banda de aproximadamente 300 pares de bases (pb), evidenciada na digestão com a enzima *BamHI*. Que foi purificada, inserida em um plasmídeo e clonada em bactérias. Através do sequenciamento foi possível verificar que o fragmento denominado *HLBam* é composto por 310pb e rico em AT (63%). Na análise comparativa com sequências já disponíveis no *Genbank*, essa sequência apresentou similaridade com parte de um transposon de Lepidoptera. Em experimento de hibridação em membrana, foi evidenciado que a sequência *HLBam* esta dispersa no genoma de *H. leucofrenatus*. Quando realizado o experimento de FISH, foi observado que *HLBam* também se encontra disperso nos cromossomos da espécie *H. leucofrenatus*, formando *clusters* em alguns pares nas regiões pericentroméricas, que são regiões que também revelam a presença de heterocromatina constitutiva. A distribuição deste elemento de modo disperso, no genoma e sua localização preferencial em regiões heterocromáticas, que apresentam poucos genes ativos e, portanto, são pouco influenciadas por mutações associadas a presença e efeito dinâmico destes segmentos repetidos no genoma, poderia explicar seu comportamento conservado e persistente nos organismos.

Palavras-chave: Elemento repetido, genoma, hibridação *in situ* fluorescente, heterocromatina

Introdução

O genoma dos eucariotos tem como características a presença de uma grande diversidade de sequências repetidas. Essas sequências são geralmente classificadas como sequências repetidas em cadeia, chamadas de microssatélites, minissatélites e satélites e os elementos dispersos, conhecidos como transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994). Estes elementos estão presentes em todos os organismos, mas em diferentes quantidades e distribuição no genoma. Em mamíferos, transposons ativos e fósseis compõem mais de 45% do genoma, enquanto que em outros organismos representam apenas uma pequena fração, como aquela em torno de 2,7% encontrada no baiacu, *Fugu rubripes* (Aparício *et al.*, 2002).

As sequências repetidas eram consideradas frequentemente como DNA egoísta ou sequências sem função dentro dos genomas (Doolittle e Sapienza, 1980; Nowak, 1994; Orgel e Crick, 1980). Porém, mais recentemente, diversos trabalhos têm sugerido a importância dessas sequências no genoma, tendo sido já identificado seu envolvimento com a diferenciação de cromossomos sexuais (Anleitner e Haymer; 1992; Kraemer e Schmidt, 1993, Parise-Maltempo *et al.*, 2007) e na regulação e reparo de genes (Messiar *et al.*, 1996). Além disso, as sequências repetidas podem ser importantes também na organização estrutural e funcional do genoma (Schueler *et al.*, 2001). Essas sequências estão intimamente associadas a regiões heterocromáticas dos cromossomos de muitas espécies de peixes (Viñas *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2005; Mazzuchelli e Martins, 2009; entre outros).

Embora as sequências de DNA repetido tenham sido muito estudadas em invertebrados e mamíferos (Singer, 1982), em peixes ainda é restrito o número de informações que se tem a respeito da sua estrutura e organização genômica, quando comparado ao grande número de espécies existentes. Estudar essas

sequências repetidas de DNA significa, então, gerar informações sobre a organização genômica dos peixes, assim como a dinâmica com que estas sequências têm evoluído nestes organismos. Essas sequências de DNA repetido podem ser utilizadas como bons marcadores em estudos evolutivos, na identificação de rearranjos cromossômicos e na identificação de diferenças entre sexos nas espécies, entre outras aplicações genéticas.

Hisonotus leucofrenatus pertence à subfamília Hypoptopomatinae, Ordem Siluriformes. Esta subfamília é representada por cerca de 80 espécies de peixes, conhecidas popularmente no Brasil como “cascudinhos” (Schaefer, 2003). A espécie apresenta cariótipo com $2n=54$ cromossomos e sistema de determinação sexual cromossômica do tipo ZZ/ZW, caracterizado pela presença de um bloco heterocromático adicional no cromossomo W (Andreatta *et al.*, 1993). Tais características tornam esta espécie um bom modelo para estudos de diferenciação cromossômica, identificação de heterocromatina e DNAs satélites. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi o de isolar sequências repetidas do tipo dispersas no genoma da espécies *H. leucofrenatus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração de DNA

Amostras de DNA total foram extraídas de exemplares da espécie *Hisonotus leucofrenatus*, coletados no ribeirão Cavalão, Joinville, SC. O DNA foi extraído a partir de fragmentos de tecidos do fígado, brânquias e músculos fixados em álcool absoluto, utilizando o método de fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001). Após a purificação, a qualidade e quantidade do DNA foram analisadas em gel de agarose e por espectrofotometria.

Identificação e Clonagem do DNA repetido

Amostras de DNA de *H. leucofrenatus* foram digeridas com 08 enzimas de restrição (*Sspl*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI*, *AvaI*, *PvuII*, *BamHI*, *HinfI*). Uma banda contendo fragmentos de DNA de aproximadamente 300pb foi identificada na digestão com a enzima *BamHI*. Os fragmentos de DNA desta banda foram extraídos do gel de agarose 1%, ligados ao plasmídio pMOS (Kit pMOS Blue – GE Healthcare), sendo a construção recombinante resultante utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α . Dez clones positivos foram identificados, caracterizados e estocados em freezer a -70 °C.

Sequenciamento dos clones e análise das sequências

Plasmídios recombinantes foram purificados a partir das bactérias e utilizados em reações de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram feitas usando o Kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare). O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado em um sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 377 - Applied Biosystems). As sequências foram processadas, retirando-se as regiões dos plasmídios e submetidas à pesquisa em banco de sequências (Genbank) com o programa BLAST/N (Altschul *et al.* 1990) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) – website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Após a análise, as sequências foram alinhadas usando os programas *Bioedit* (Hall, 1999) e *Dambe* (Xia e Xie, 2001).

Hibridação em membrana

Para as análises de *Southern blotting*, foram realizadas inicialmente digestões parciais das amostras de DNA de *H. leucofrenatus* utilizando a enzima *BamHI*, que foram separada em gel de agarose 1% e transferidas para membrana de nylon. A marcação da sonda, hibridação e a detecção das bandas foi realizada usando-se um

método de quimioluminescência (ECL Labelling and Detection System – GE healthcare). A sonda utilizada foi a LHBam-3. E a hibridação foi realizada a 42°C, durante 16 horas.

Hibridação *in situ* fluorescente

Cromossomos mitóticos foram preparados de células da região anterior do rim dos exemplares de *Hisonotus leucofrenatus* após tratamento *in vivo* com colchicina (Foresti *et al.*, 1981) e submetidos a técnica de FISH (Pinkel *et al.*, 1986). Os clones foram marcados pela técnica de PCR com Biotina (Biotin- 14-dATP) e foram utilizados como sonda. As lâminas com cromossomos metafásicos foram tratadas com RNase (40µg/ml) por 1h a 37°C. Após a desnaturação do DNA em solução de formamida 70%/2xSSC por 2 minutos a 70°C, as lâminas foram passada pela série alcoólica a 70, 85 e 100%. Após a secagem, 30µl do mix de hibridação (100ng de sonda, 10mg/ml sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida em 30µl de volume final) foram colocadas sobre as preparações. A hibridação foi realizada a 37°C *overnight* em câmara úmida. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas por 2 vezes em solução de formamida 15% / 0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada (com agitação), seguindo-se de mais 3 lavagens em 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada (com agitação); foram, em seguida, incubadas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos e lavadas com Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, à temperatura ambiente (com agitação). Para a detecção da sonda, foi utilizada solução 0,07% de avidina- FITC (Sigma) conjugada com tampão NFDm/4xSSC por 30 minutos, seguida de uma amplificação do sinal usando 2.5% de anti-avidina biotina conjugada (Sigma) com tampão NFDm/4xSSC, por 30 minutos. Os tratamentos com avidina-FITC e anti-avidina-biotina foram conduzidos a 37°C em câmara úmida. Após cada passo para a detecção do sinal, as lâminas foram lavadas

com Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente por três vezes. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídeo (PI) (0,2%) diluído com *antifade* (Vector). E as preparações foram analisadas usando microscópio Olympus BX 61, sendo as imagens capturados com câmera digital Olympus DP70 com software Image Pro MC.

Resultados e discussão

Para se isolar sequências repetidas, foram realizados tratamentos de digestão enzimáticas com o DNA extraído de indivíduos de *H. leucofrenatus*. Foram realizados testes com 8 enzimas (*Sspl*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI*, *AvaI*, *PvuII*, *BamHI*, *HinfI*), sendo que apenas com a enzima *BamHI* foi evidenciada uma banda, identificando um fragmento de restrição de tamanho estimado de 300pb (Figura 1). Posteriormente, esta banda foi isolada e purificada, os fragmentos foram ligados ao plasmídeo pMOS e inseridos em linhagens de *E. coli* competentes. Dez clones positivos foram obtidos (Figura 2) e estocados em freezer -70°C, com glicerol.

Através do sequenciamento foi possível realizar a sequência consenso dos 10 clones sequenciaos e verificar que o fragmento isolado é composto 310pb e rico em AT (63%) e foi chamando de *HLBam*. Esta sequência foi analisada no *Genbank* e apresentou pequena similaridade com parte do transposon *Eomt1* de *Ectropis obliqua*, uma espécie de Lepidoptera, que contém 436pb (Figura 3). Posteriormente foram realizados experimentos de hibridação em membrana e verificou-se que esse fragmento isolado não está organizado em cadeia e sim disperso pelo genoma (Figura 4).

A espécie *H. leucofrenatus* apresenta um cariótipo composto 54 cromossomos, ocorrendo também à presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e cromossomos supranumerários. Além disso, grandes blocos de heterocromatina constitutiva estão localizados em vários pares cromossômicos

(Andreatta *et al.*,1993). Quando realizado o experimento de hibridação *in situ* com o elemento repetido *HLBam*, foram observadas marcações dispersas em todos os cromossomos da espécie, formando *clusters* em alguns pares nas regiões pericentroméricas, que se caracterizaram pela presença de heterocromatina constitutiva (Figura 5). Este tipo de marcação é uma característica encontrada para os elementos repetidos dispersos, que apresentam-se espalhados no genoma, porém mostram-se acumulados em regiões heterocromáticas (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). Não foi encontrada nenhuma marcação preferencial do elemento *HLBam* nos cromossomos sexuais da espécie em análise. Com os dados encontrados para a hibridação em membrana e para o FISH, fica evidente que o elemento isolado repetido *HLBam* parece tratar-se de um elemento disperso do tipo transposon.

Elementos dispersos já foram descritos em peixes, como é o caso dos elementos dispersos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* (Ozouf-Costal *et al.*,2004; Volff *et al.*,1999, 2000, 2001, 2003) *Tc1-like* (Capriglione *et al.*,2002) *Zebulon* (Bouneau *et al.*, 2003), *Tol2*, *Buffy1* e *Babar* (Fischer *et al.*,2004), *AoSat*, *AoRex3* e *AoLine* (Mazzuchelli e Martins, 2009), entre outros. Esses elementos dispersos apresentam-se acumulados preferencialmente em regiões heterocromáticas, o que parece indicar que essas regiões, que são pobres em genes, poderia servir como reservatório desses elementos dispersos. Além disso, já foi sugerido que há uma alta pressão seletiva sobre estes elementos em regiões ricas em genes (Kidwell e Lich, 1997), o que resultaria num tipo de controle seletivo para estes segmentos genômicos nos organismos.

Em outros grupos animais, os transposons e retrotransposons também acumulam-se mais em regiões heterocromáticas. Em *Drosophila*, o acúmulo se dá próximo aos centrômeros e telômeros (Bartolomé *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis thaliana*, há um acúmulo dos elementos transponíveis nas regiões centroméricas e

pericentroméricas e esses elementos dispersos representam 14% do genoma nos representantes deste grupo (The Arabidopsis Genome Initiative, 2001). Porém, em mamíferos, esses elementos se encontram localizados em diferentes regiões dos cromossomos e muitas vezes são detectados em regiões eucromáticas (Volf *et al.*, 2003).

Os dados obtidos no presente trabalho reforçam os achados em peixes onde estudos anteriores indicam que as sequências repetidas em cadeia, como os microsátélites, minisátélites e satélites são geralmente encontradas formando grandes blocos (Jesus *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2005; Ferreira e Martins, 2008; Mazuckelli e Martins, 2009, entre outros), enquanto sequências do tipo transposon e retrotransposon são encontradas dispersas em todos os cromossomos (Dasilva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003, Oliveira *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004, Ozouf-Costaz *et al.*, 2004 e presente estudo). A constatação da sua maior concentração em regiões heterocromáticas provavelmente ocorre porque essas regiões apresentam menos genes ativos e, portanto, são menos influenciadas por mutações associadas à presença e dinamismo destes elementos repetidos no genoma das espécies.

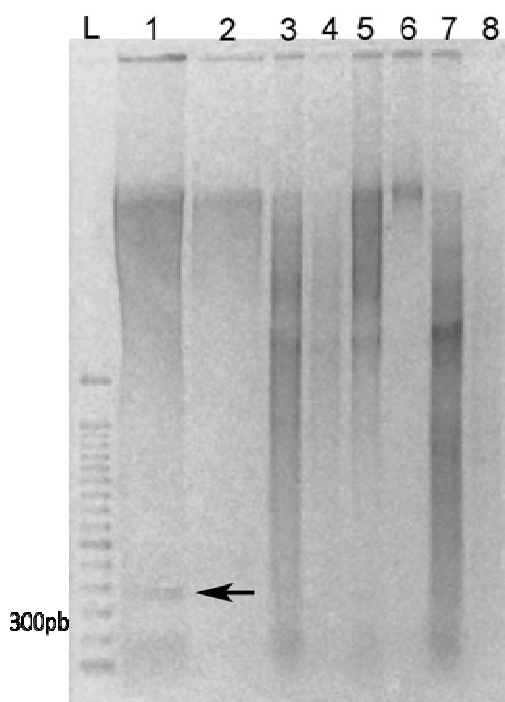


Figura 1: Gel de agarose mostrando o produto da digestão do DNA da espécie *Hisonotus leucofrenatus*, com diferentes enzimas de restrição. L) Ladder 1Kb plus; 1) *Bam*HI; 2) *Ssp*I; 3) *Eco*RI; 4) *Pvu*II; 5) *Eco*RV; 6) *Xba*I; 7) *Ava*I; 8) *Hin*FI. A seta indica um fragmento de cerca de 310 pares de bases, obtida com a enzima *Bam*HI.

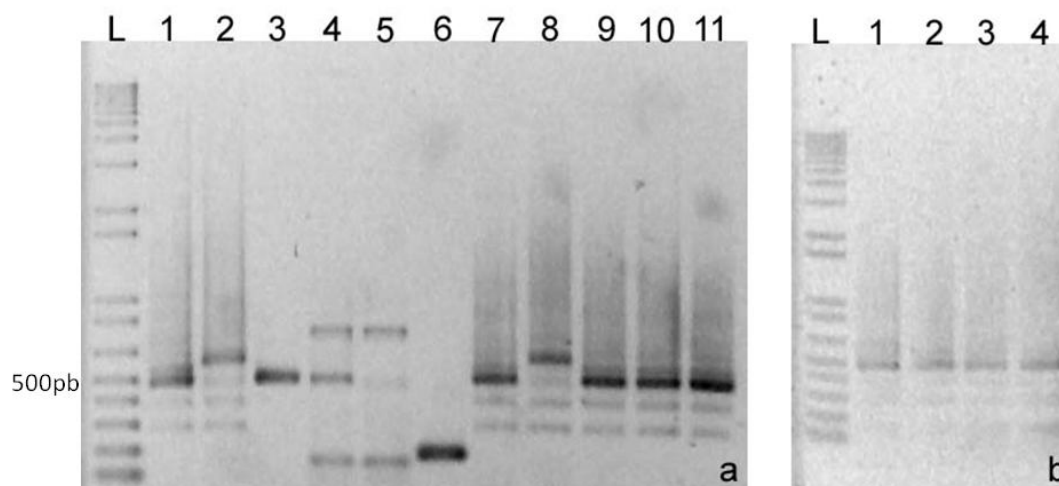


Figura 2: Gel do produto de PCR dos clones obtidos da espécie *H. leucofrenatus* com a enzima *Bam*HI. **a)** L) Ladder 1Kb plus; 1-11) Clones amplificados com o *primer* M13. **b)** Gel do produto de PCR dos clones obtidos da espécie *H. leucofrenatus* com a enzima *Bam*HI. L) Ladder 1Kb plus; 1-4) Clones amplificados com o *primer* M13.

```

LHBAM      ATGGATTAGTAAAACCGTTTCTTAGTGAGCACCTAAGAGGTAAGACGAACCTGTGTTCCAATTTTCATGTAAATCCGTTT
transposon T..-----T..CC.T..-----..G.C..TG.----...C.C.TC.AA.----..GC..T.CA..----.T..T

LHBAM      AGTGGTTCCAGAGATTTCTTGATGAGTCAGTCAGTC-----AGTCAGTGGTATTTACGTATAT-----
transposon .A.T...--.T.T...A.GT...TACT.AA.TAA.ATAGTGAAA...A.T.AA.G...T.A...G..AAAAAAATGT

HLBAM      -----ATAGCTGTAGGG-----ATTTTCTCA---TTGACCAAT-----GTGT
transposon TTTTCTATATTACA...TT.A.G.CAAGACTTT...A...AAC.G....G.AAGATATTAGTGCCAGGCGCA...

HLBAM      TACATTTCCATGC-----CGACTCTTTTGAT--TAGTATTTCAAC-----AATTTAAGGTTTTTGTC----
transposon ...AAATT.C..ATCCTA.T.TG..G...C.TG..A....T..ATGCGAAAGTTG...G.T..A.G...GTTGTT

LHBAM      -----TTTGG----CATATCTGACTCC-----ACC
transposon TGTGCTCAATCACGTCGGAACGCTGAACGGATTGGGTTGAAA....AACA...C...CG..TATGTGTCCAA..T

HLBAM      CCAATACA-----ATACTATAGAAATAAATAGATTATACAT?ATTGGTGATTGTAAGGATCATCG
transposon T...TA.TCTAATTT...G.C.G...TA.C.C...C.T.T...C.....--C..C..AAGG.GA.-
    
```

Figura 3: Alinhamento da sequência consenso obtida dos Clones HLBam, identificados em *Hisonotus leucofrenatus*, com a sequência do transposon Eomt1 da espécie *Ectropis obliqua*.

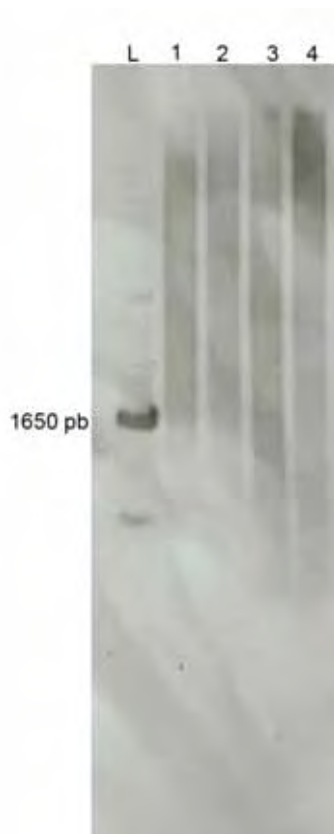


Figura 4: Organização genômica do elemento transponível HLBam. Southern blotting com DNA genômico da espécie *H. leucofrenatus*, com digestão parcial com a enzima *Bam*HI. L) Ladder 1 kb plus; 1) 10 min; 2) 20 min; 3) 40 min; 4) overnight.

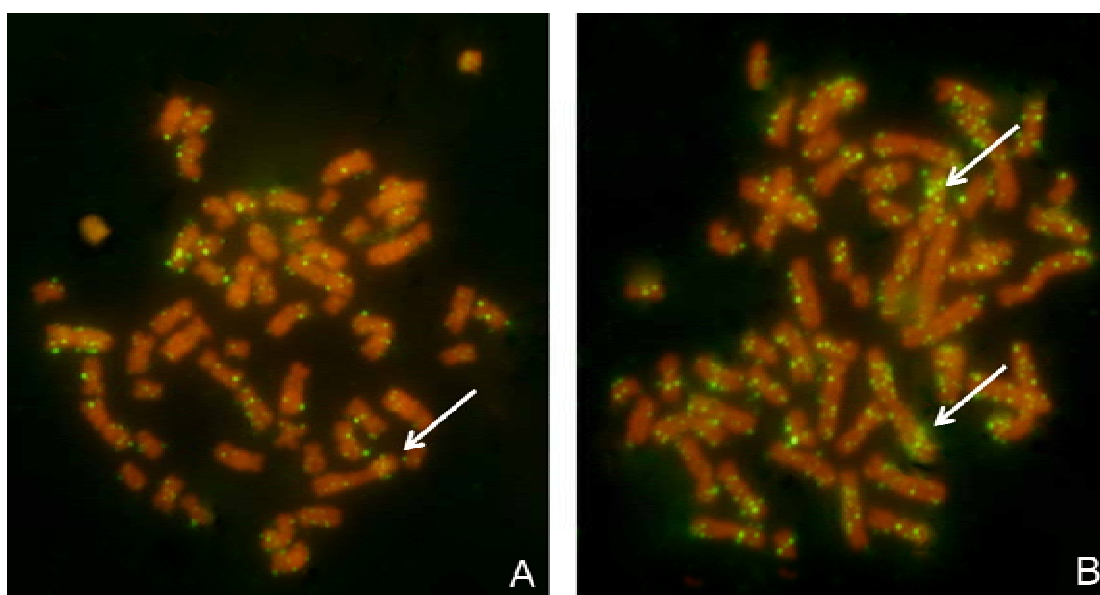


Figura 5: A-B) Metáfases de *Hisonotus leucofrenatus* submetidas à técnica de FISH com sonda do elemento repetido isolado HLBam. Notar a distribuição dispersa das marcações e alguns agrupamentos mais conspícuos. (Seta)

Referências

- Aparicio, S. et al (2002). Whole-Genome shotgun assembly and analyses of the genome *Fugu rubripes*. Science, vol: 297.
- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S. (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. Cytogenet. Cell Genet. 63: 215-220
- Anleitner, J.E. and Haymer, D.S. (1992). Y enriched an Y specific DNA sequence from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Chromossoma. v. 101: 271-278.
- Azevedo, M.F.C.; Oliveira, C.; Martins, C.; Wasko, A.P and Foresti, F. (2005). Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). Genetica 125: 205-210.
- Bartolomé, C.; Maside, X.; Charlesworth, B. (2002). On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. Molecular Biology and Evolution 19:926–937.
- Bouneau, L.; Fisher, C.; Ozouf-Costaz, C.; Froschauer, A.; Jaillon, O.; Coutanceau, J.P.; Körting, C., Weissenbach, J.; Bernot, A.; Volff, J.N. (2003). An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. Genome Research. v13, p1686-1695.
- Capriglione, T.; Odierna, G.; Caputo, V.; Canapa, A.; Olmo, E. (2002) Characterization of a *Tc1*-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. Gene. 295: 193-198.
- Charlesworth, B.; Snlegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371:215-220.
- Dasilva C.; Hadji H.; Ozouf-Costaz C.; Nicaud S.; Jaillon O.; Weissenbach J.; Crollius H.R. (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v99, n21, 1636-1641.

- Dootittle, W.F. and Sapienza, C. (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature (London)* 284: 601-603.
- Ferreira, I.A. and Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.
- Fischer, C; Bouneau, L.; Coutenceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volf, J.N.; Ozouf-Costaz, C. (2004). Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336: 175-183.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. and Toledo, S.A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogen. Cell Genet.* 31: 137-144.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Jesus, C.M.; Galetti Jr, P.M.; Valentini, S.R. and Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genética*, 118: 25-32.
- Kidwell, M.G. and Lisch, D. (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.94, p.7704-7711.
- Kraener, C. and Schimidt, E.R. (1993). The sex determination region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. *Chromosoma* 102: 553-562.
- Mazzuchelli, J. and Martins, C., 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-008-9346-7.
- Messier, W.; Li, S.H.; Stewart, C.B. (1996). The bird microsatellites. *Nature (London)* 381-483.
- Nowak, R. (1994) Mining treasures from "junk DNA". *Science* 263: 608-610.
- Oliveira, C; Wang, Y; Bryden, L.J.; Wrigth, J.M., 2003. Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent *in situ* hybridization. *Caryologia* 56, 177-185.

- Orgel, L.E. and Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.
- Ozouf-Costaz, C., Brandt, J., Korting, C., Pisano, Eva., Bonillo, C., Coutanceau, J.P., Volff, J.N. (2004). Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16 (1): 51-57.
- Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F.(2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic and Genome Research* 116: 218-223.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaefer, S.A. (2003) Subfamily Hypoptopomatinae (Armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferreris Jr, C.L. (Eds) *Cheek List of the freshwater fishes of South America*. Porto Alegre: Edipucrs, p.321-329.
- Schueler, M.G.; Higgins, A.W.; Rudd, M.K., Gustashaw, K.; Willard, H. (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294:109-115.
- Singer, M.F. (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76: 67-112.
- Stephan, W.; Cho, S. (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136: 333-341.
- The arabidopsis genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815
- Viñas, A.; Abuín, M.; Pardo, B.G.; Martínez, P. and Sanches, L. (2004) Characterization of a new *HpaI* centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. *Genética*. 121: 81-87.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K. and Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1427–1438.

- Volff, J.-N., Körting, C., Meyer, A. and Schartl, M. (2001). Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 427–431.
- Volff, J.-N., Körting, C. and Schartl, M. 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1673–1684.
- Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*. 19:74-678.
- Xia, X. and Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92: 371-373.

4.3 Capítulo 3

Isolamento e Caracterização de Sequências Satélites na Espécie

Pseudotocinclus tietensis

(Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae).

Resumo

Sequências repetidas de DNA organizadas em longos arranjos *in tandem*, são definidas como DNA satélite, que são regiões não codificadoras do genoma, universalmente encontradas em regiões heterocromáticas pericentroméricas e/ou regiões teloméricas dos cromossomos de todos os organismos eucarióticos. Estas sequências funcionam como marcas para cromossomos, conjuntos de cromossomos ou mesmo regiões cromossômicas específicas, representando ferramentas úteis para definir a estrutura e revelar a evolução do genoma de diversas espécies através da detecção de rearranjos específicos. A espécie *Pseudotocinclus tietensis* pertence à subfamília Hypoptomatinae, representada por cerca de 80 espécies de peixes conhecidas popularmente como “cascudinhos”. *P. tietensis* apresenta um cariótipo com 54 cromossomos e sistema de determinação sexual cromossômica do tipo XX/XY, caracterizado pela presença de um bloco heterocromático diferencial no cromossomo Y. Análises moleculares foram realizadas a fim de se isolar sequências repetitivas no genoma da espécie. Os exemplares foram coletados no rio Paraitinga, bacia do Alto rio Tietê, região de Salesópolis, SP. Para se isolar sequências satélites, foi extraído o DNA dos exemplares e realizados testes com 5 enzimas de restrição, *Bam*HI, *Scal*, *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV, sendo que com a enzima *Hind*III foram evidenciadas três bandas de aproximadamente 200, 450 e 650pb. A banda de 200pb foi purificada, inserida em um plasmídeo e clonada em bactérias, sendo isolado sete clones que foram utilizados como sondas para experimentos de hibridação em membrana e sequenciamento. A composição nucleotídica do fragmento isolado foi determinada por sequenciamento, mostrando que os fragmentos são compostos de 214pb e apresentam uma predominância de adenina e timina (56%) e sugerindo que as sequências isoladas pertencem a uma família de DNA satélite. Os resultados da hibridação em membrana com digestão parcial do DNA genômico de *P. tietensis* mostraram que o fragmento isolado representa uma sequência de DNA repetitivo, formada por unidades monoméricas de aproximadamente 200 pb organizadas em cadeia e esse satélite é exclusivo do genoma da espécie *P. tietensis*, constituindo assim um bom marcador para a espécie em questão.

Palavras-chave: DNA satélite, Hypoptomatinae, Genoma, Hibridação em membrana

Introdução

Sequências repetidas representam uma grande fração do genoma dos eucariotos e podem variar de 25% em algumas espécies até 50% em outras (Wagner *et al.* 1993; The genome internacional sequencing consortium 2001). No estudo realizado por Schmidtke *et al.* (1979), os autores estimaram que até 84% do DNA em truta arco-íris seria composto por DNA repetitivo.

Entre os elementos repetidos encontrados no genoma, destacam-se as sequências satélite, que são sequências não codificadoras de DNA, organizadas *in tandem*, formando longas cadeias de repetições (Plohl *et al.*, 2008), consideradas até pouco tempo como DNA lixo (Nowak, 1994) ou DNA egoísta (Doolittle e Sapienza, 1980; Orgel e Crick, 1980), sem função conhecida. No entanto, em estudos recentes, verificou-se que esta classe de sequências repetidas tem um papel importante na estrutura e manutenção dos cromossomos. As sequências satélites são encontradas principalmente em *clusters* nas regiões de centrômeros e telômeros dos cromossomos (Charlesworth *et al.* 1994)

Estas sequências funcionam como marcas para cromossomos, conjuntos de cromossomos ou mesmo regiões cromossômicas específicas, representando ferramentas úteis para definir a estrutura e revelar a evolução do genoma de diversas espécies de peixes através da detecção de rearranjos específicos (Oliveira *et al.*, 1999; Jesus *et al.*, 2003 entre outros). Além disso, DNA satélite pode ser utilizado em estudos de filogenia de espécies próximas pela comparação de suas sequências (Garrido-Ramos *et al.*, 1995,1999; Canapa *et al.*, 2002), uma vez que possuem um modelo de evolução rápida (Charlesworth *et al.*, 1994; Pimpinelli *et al.*, 1995). Estes elementos genômicos também têm sido estudados para elucidar a provável origem dos cromossomos supranumerários (Mestriner *et al.*,2000; Jesus *et*

al.,2003) e o processo de diferenciação cromossômica sexual em peixes (Nakayama *et al.*, 1994; Parise- Maltempi *et al.*,2007).

A subfamília Hypoptopomatinae é representante da ordem Siluriformes e é constituída por 80 espécies de peixes (Schaefer, 2003). Para as espécies cariotipadas até o presente, esta subfamília apresenta um número diplóide constante de $2n=54$ cromossomos. Porém, quando se analisa os padrões de heterocromatina constitutiva dos representantes nesta subfamília, nota-se uma grande diversidade na sua distribuição (Andreatta *et al.*, 1992,1993, 1994; Ferreira *et. al.*, 2005). Assim, os membros dessa subfamília são vistos com interesse para o estudo de DNA satélite, uma vez que o componente principal da heterocromatina é formado por sequências repetidas (Martins, 2007).

A espécie *P. tientensis*, representante desta subfamília, apresenta cromossomos sexuais do tipo XX/XY, com o cromossomo identificado como Y apresentando um grande bloco de heterocromatina constitutiva, não encontrado no cromossomo X. Além disso, a heterocromatina constitutiva apresenta-se distribuída também nos centrômeros de todos cromossomos e na região pericentromérica de alguns pares cromossômicos (Andreatta *et al.*,1992). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o isolamento e a caracterização de sequências satélites no genoma da espécie *Pseudotocinclus tientensis*, a fim de se conhecer a composição da heterocromatina e sua compartimentalização no genoma dos peixes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração de DNA

Amostras de DNA total foram extraídas de exemplares da espécie *P. tietensis* provenientes do rio Paraitinga, bacia do Alto Rio Tietê, região de Salesópolis, SP. O DNA foi extraído a partir de fragmentos de tecidos do fígado, brânquias e músculos fixados em álcool absoluto, utilizando o método fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001). Após a purificação, a qualidade e quantidade do DNA obtido foram analisadas em gel de agarose e por espectrofotometria e processadas para a verificação da sua composição e estrutura.

Identificação e Clonagem do DNA Satélite

Amostras de DNA de *P. tietensis* foram digeridas com 5 enzimas de restrição: *Bam*HI, *Sca*I, *Hind*III, *Eco*RI e *Eco*RV. Três bandas contendo fragmentos de DNA de aproximadamente 200, 450 e 650pb foram identificadas na digestão com a enzima *Hind*III. Os fragmentos de DNA destas bandas foram extraídos do gel de agarose 1%, ligados ao plasmídeo pMOS (Kit pMOS Blue – GE Healthcare) e a construção recombinante resultante foi utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α . Sete clones positivos foram identificados, caracterizados e estocados em freezer a -70°C. Destes, três foram selecionados para a realização de experimentos de hibridação em membrana e sequenciamento.

Sequenciamento e análise das sequências

Plasmídios recombinantes foram purificados a partir das bactérias e utilizados em reações de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram feitas usando o DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare) e o sequenciamento das amostras de DNA foi realizado em um sequenciador automático (ABI 377 – PRISM Applied Biosystems). As sequências foram

processadas, retirando-se as regiões dos plasmídios e submetidas à pesquisa em banco de sequências (*GenBank*), utilizando-se o programa BLAST/N (Altschul et al. 1990) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) – website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Após a análise, as sequências foram alinhadas usando-se os programas *Bioedit* (Hall, 1999) e *Dambe* (Xia e Xie, 2001).

Hibridação em membrana

Para as análises de *Southern blotting* foram realizadas inicialmente digestões parciais das amostras de DNA de *P. tietensis* utilizando a enzima *HindIII*, que foram separada em gel de agarose 1% e transferidas para membrana de nylon. A marcação da sonda, hibridação e detecção foram realizadas usando-se um método de quimioluminescência (ECL Labelling and Detection System – GE healthcare). A hibridação foi realizada a 42°C, durante 16 horas. Para se determinar o grau de conservação deste fragmento foram feitos experimentos de *Southern blotting* usando espécies relacionadas filogeneticamente a *P. tietensis*. As amostras de DNA das espécies *Parotocinclus maculicauda*, *Corumbataia. cuestae* *Hisonotus leucofrenatus*, *H. insperatus*, *Otocinclus vitatus*, *Kronichthys* sp. e *Neoplecostomus paranensis* foram digeridas com *HindIII* e o procedimento usado para hibridação em membrana foi o mesmo descrito acima.

Resultados e Discussão

A fim de se isolar sequências satélites em *P. tietensis*, foram realizados testes de digestão enzimática do DNA desta espécie com 5 enzimas de restrição (*BamHI*, *Scal*, *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*), sendo que apenas com a enzima *HindIII* foram evidenciadas bandas, de aproximadamente 200, 450 e 650pb (Figura 1). Todas as bandas foram purificadas, mas apenas o fragmento de 200pb foi clonado em plasmídio. O fragmento clonado foi amplificado com o *primer* M13, sendo obtidos sete clones positivos (Figura 2). Que foram estocados em freezer -70°C, em glicerol.

Adicionalmente, foi realizada a extração de DNA dos plasmídeos dos clones positivos (Figura 3). O fragmento isolado foi denominado *PTHind*.

A composição nucleotídica dos fragmentos *PTHind-3*, *PTHind-6* e *PTHind-7* foi determinada por sequenciamento (Figura 4). Verificou-se que o fragmento *PTHind-3* é composto de 208pb, o *PTHind-6* por 197pb e o *PTHind-7* por 185pb, sendo que todos apresentam uma predominância de adenina e timina (56, 61, 57% respectivamente). Todos os clones foram submetidos a análises comparativas com sequências do *GenBank*; entretanto, nenhuma similaridade foi encontrada com outras sequências previamente publicadas.

Os resultados da hibridação em membrana com digestões parciais do DNA genômico de *P. tietensis* mostraram que o fragmento isolado *PTHind* representa uma classe de DNA repetida, formada por unidades monoméricas de 200 pb organizadas em cadeia (Figura 5), sugerindo que as sequências isoladas pertencem a uma família de DNA satélite, como descrito ocorrer em DNA satélite de peixes marinhos e de água doce (Ecker *et al.*, 1992; Garrido-Ramos *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 2005). Adicionalmente foram realizados experimentos de hibridação em membrana para se determinar o grau de conservação desse satélite entre espécies da subfamília Hypoptopomatinae (*Parotocinclus maculicauda*, *Corumbataia. cuestae*, *Hisonotus leucofrenatus*, *H. insperatus*, *Otocinclus vitatus*, *Isbrueckrichtys epakmos* e *Neoplecostomus paranensis*), revelaram que o satélite isolado na espécie *P. tietensis* não está presente em nenhuma delas (Figura 6), sendo portanto o satélite *PTHind* espécie-específico, exclusivo do genoma de *P. tietensis*. Esta característica encontrada para *P. tietensis* já foi encontrada em outras espécies analisadas (Koeher, *et al.*, 1997; Vinãs *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2005). Sequências satélites vêm sendo estudadas em muitas espécies de peixes. Porém, entre os representantes da ordem

Siluriformes, apenas as espécies *Hisonotus leucofrenatus* (Andreato, 2002) e *H. insperatus* (Ferreira, 2005) tiveram segmentos de DNA satélite isolados. Para outros grupos de peixes, vários trabalhos já foram realizados visando entender a função das sequências repetidas no genoma dos peixes (Canapa *et al.*, 2002; Jesus *et al.*, 2003; Viñas *et al.*, 2004, Ferreira e Martins, 2008; Mazuchelli e Martins, 2009, entre outros).

Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram realizados, a fim de conhecer a organização da sequência satélite isolado e sua localização física no genoma de *P. tietensis*, porém não foram obtidos resultados satisfatórios. Provavelmente o satélite *PTHind* estaria organizado em pequenos *clusters* no genoma da espécie, não permitindo a sua identificação física nos cromossomos com o emprego dessa metodologia.

Os dados disponíveis na literatura indicam que as sequências satélites localizam-se nas regiões heterocromáticas, principalmente nas regiões centroméricas, sugerindo que essas sequências poderiam desempenhar uma função importante na manutenção da estrutura cromossômica da espécie (Martins, 2007).

A sequência isolada *PTHind* constitui um bom marcador específico para *Pseudotocinclus tietensis*, visto que apresenta um padrão exclusivo de organização no genoma desta espécie, permitindo sua diferenciação em relação às demais espécies da subfamília Hypoptopomatinae.

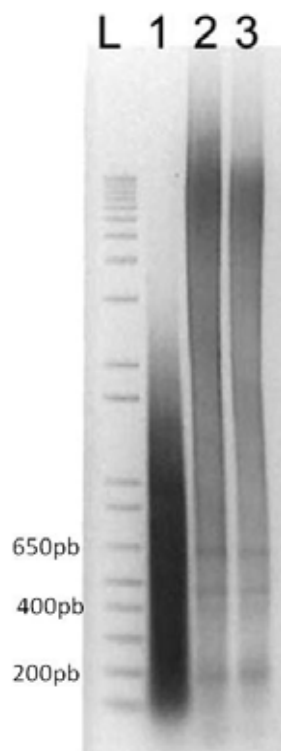


Figura 1: Gel de agarose mostrando o produto da digestão com a enzima *Hind*III L) Ladder 1Kb plus; 1-3) Bandas identificadas e tamanhos dos fragmentos da digestão do DNA em *Pseudotocinclus tietensis*.

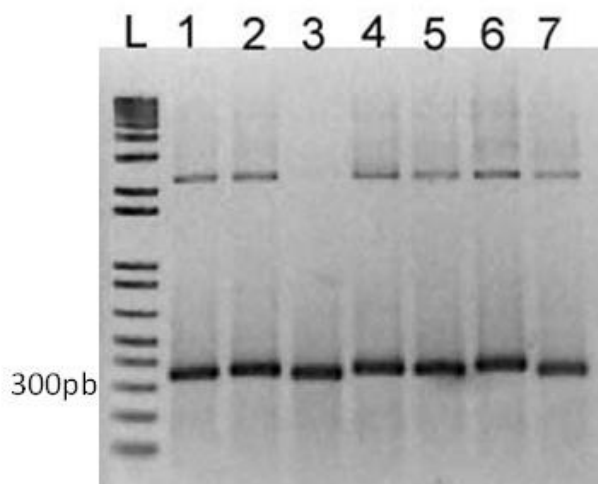


Figura 2: Gel do produto de PCR dos clones obtidos para a espécie *P. tietensis* a partir do fragmento de 200pb, identificados com a enzima *Hind*III. L) Ladder 1Kb plus; 1-7) Clones amplificados com o *primer* M13.

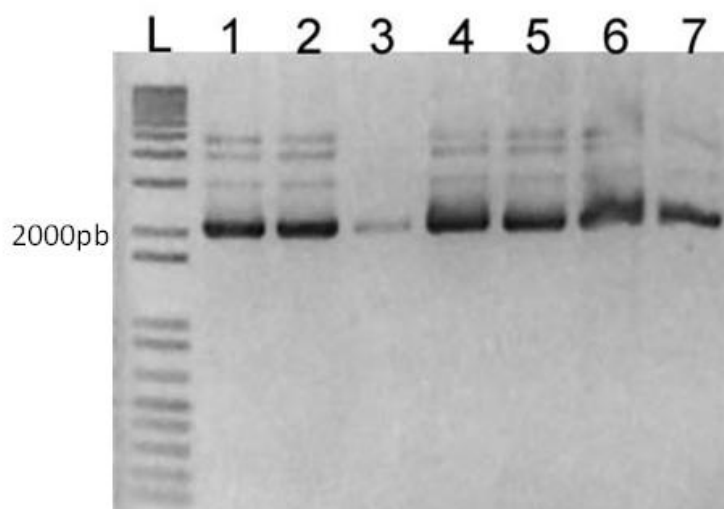


Figura 3: Gel com o produto do mini-prep dos clones obtidos para a espécie *P. tietensis*. L) Ladder 1Kb plus, 1-7) Mini-prep clones.

```

PTHind-3  CCTCCGCGGGAATTCGACCGG-TACCGGGA--TCCGATGAGATAAAATT----GCTG--TGCTAGGAAAAGAAAATTACT
PTHind-6  -----CCTT...T...A..TG...TCCT.A..T....AA--.....
PTHind-7  -----CC.G...TA..TG...TGAC.CT...G.CC-----T.T--CA..T.A..G.C.....G.

PTHind-3  TA-GTTGC---TGGCTGAATT--ACACT---GGGAATGGCTTGAAAT-CCCAGTTTGAGTTGT-ATTGC---ACAAGC-
PTHind-6  ..A.....--.....--.....-.....--.....-.....
PTHind-7  ..ACCA-----..AC.CC--..CA,---...G.T-.A.-C---TGG..AGC..T.G.A.-.G-..---TTTG..T

PTHind-3  ----CTGGTTTGCAGG-ACATTCTT-GTAGGTTTCAAATA---CTT--AGGTTA-----TATCTAGTATG----AA---
PTHind-6  -----.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
PTHind-7  CTTA..AA...T----GT...T-.-T..AA...A..TG.ACCAA--C..AG.T-----C.GCT...CCA-----.....

PTHind-3  --AAGCTATCCATATGA
PTHind-6  --.....
PTHind-7  --.....
    
```

Figura 4: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos clones PTHind-3, PTHind-6 e PTHind-7 , isolados para a espécie *Pseudotocinclus tietensis*.

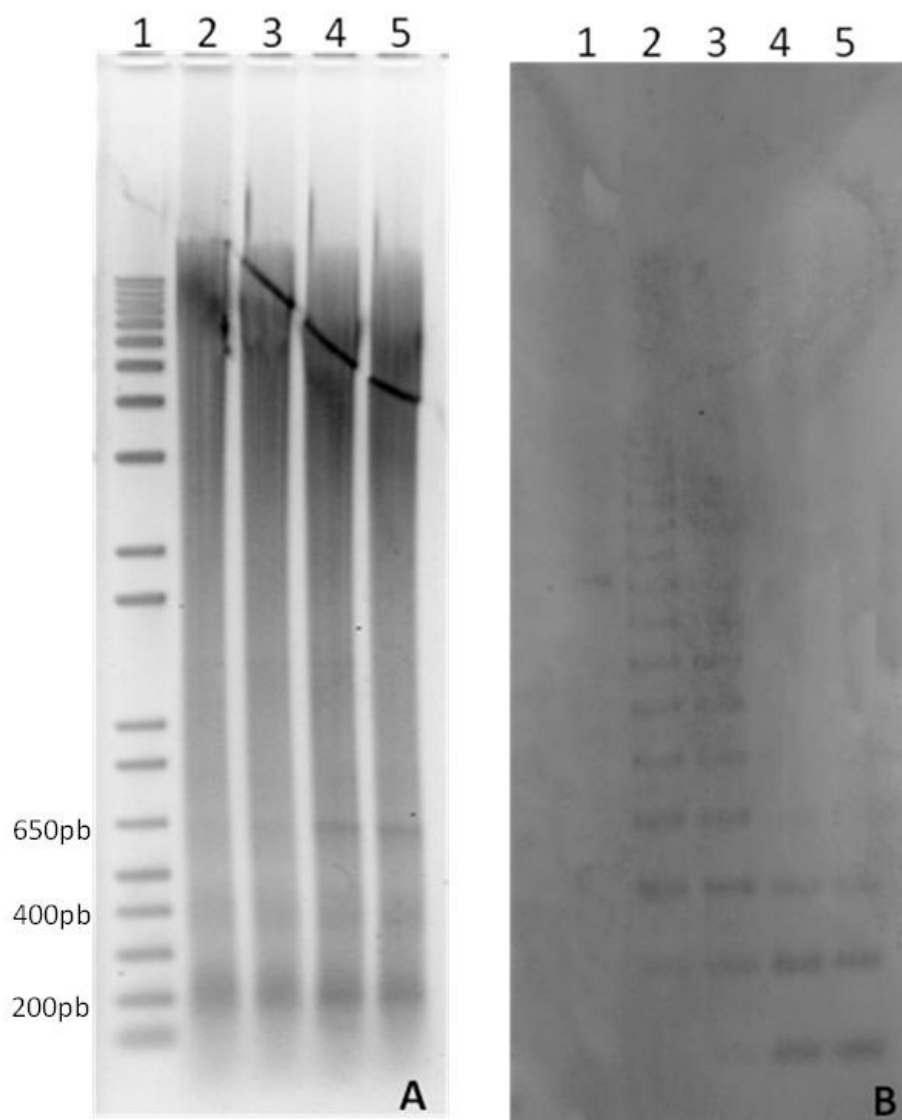


Figura 5: A) Gel de agarose mostrando o produto da digestão do DNA da espécie *P. tietensis* com a enzima de restrição *Hind*III em diferentes intervalos de tempo. 1) Ladder; 2) 10 min; 3) 20 min; 4) 30 min; 5) *overnight*. **B)** O mesmo DNA da figura (A) hibridado com uma sonda isolada da espécie *Pseudotocinclus tietensis*.

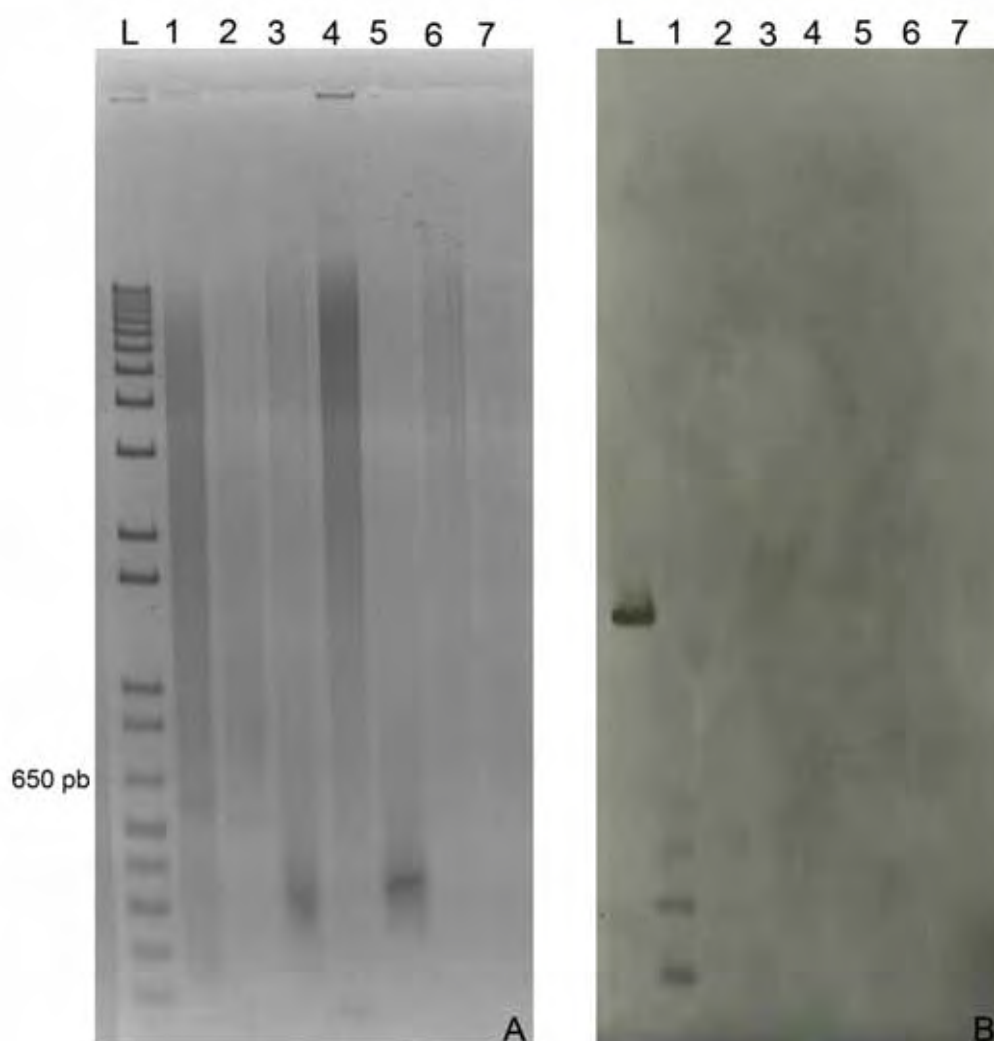


Figura 6: A) Gel de agarose mostrando o produto da digestão dos DNAs das espécies da Subfamília Hypoptopomatinae com a enzima de restrição *Hind*III. Ladder; 1) *Pseudotocinclus tietensis* 2) *Corumbataia. cuestae* 3) *H. leucofrenatus*; 4) *H. insperatus*; 5) *O. vitatus*; 6) *Isbrueckrichtys epakmos* 7) *Neoplecostomus paranensis*; **B)** Os mesmos DNAs da figura (A) hibridados com a sonda *PTHind-6* isolada da espécie *Pseudotocinclus tietensis*.

Referências

- Altsuhul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.A. (1990). Basic local alignment sear tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-10.
- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho S.A. (1992) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY Sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57: 369-372
- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S. (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220
- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S. (1994) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): III. Analysis of seven species. *Caryologia* 47: 27-37
- Andreato AA, Alves AL, Foresti F, Oliveira C (2000) *Hisonotus gibbosus* (Teleostei, Loricariidae), segundo hypoptopomatineo com número diplóide diferente de 54 cromossomos. *Genet. Mol. Biol.* 23: 57.
- Andreato A.A. (2002) Estudos citogenéticos no gênero *Microlepidogaster* (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). Tese (doutorado) – Instituto de Biociência de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Azevedo, M.F.C.; Oliveira, C.; Martins, C.; Wasko, A.P and Foresti, F. (2005). Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). *Genetica* 125: 205-210.
- Canapa, A.; Cerioni, P.N.; Barucca, M.; Olmo, E. and Caputo, V. (2002). A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatic compactness in gobiid fish. *Chromosome. Research.* 10: 297-304.
- Charlesworth, B.; Snlegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Doolittle, W.F. and Sapienza, C. (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature (London)* 284: 601-603.

- Ecker, M., Fritz, A and Westerfield, M. (1992). Identification of two families of satellite-like repetitive DNA sequences from the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics* 13: 1169-1173.
- Ferreira, D.C. (2005) Estudos citogenéticos e caracterização de DNA satélite em espécies da subfamília Hypoptopomatinae (Pisces, Loricariidae). Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociência de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Ferreira, D.C.; Chiachio, M.C.; Takako, A.K.; Andreato, A.A.; Oliveira, O.; Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Cariologia* 58 (4): 387-395.
- Ferreira, I.A. and Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.
- Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Crollius, H.R, Dasilva, C., Jaillon, O., Bouneaus, L., Bonillo, C., Weissenbach., J. e Bernot, A., (2000). Karyotype and chromosome location of characteristics tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenet. Cell Genet.* 88: 50-55.
- Garrido-Ramos, M.A.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M. (1994). Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 65: 233-237.
- Garrido-Ramos, M.A.; De La Herran, R.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Rejon, C.R.; Rejon, M.R. (1999) Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformres). *Mol Phylogenet Evol* 12: 200-204.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Jesus, C.M.; Galetti Jr, P.M.; Valentini, S.R. and Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genética*, 118: 25-32.
- Koehler, M.R.; Haaf, T.,Guttenbach, M.; Scharl, M.; Schmid, M. (1997). Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) II. Molecular cytogenetics,

- organization and evolutionary conservation of a chromosomo-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Genetica*, 5: 325-331.
- Martins C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.
- Mazzuchelli, J. and Martins, C. (2009). Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, *in press*.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr., P.M.; Valentin, S.R.; Ruiz., I.R.G.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, v. 85, p. 1-9.
- Nakayama, I.; Foresti, F.; Tewari, R.; Scharl, M. & Chourrout, D. (1994) Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* 103: 31-39
- Nowak, R. (1994) Mining treasures from "junk DNA". *Science* 263: 608-610.
- Oliveira, C.; Chew, J.S.K.; Porto-Foresti, F.; Dobson, M.J e Wright, J.M (1999). A LINE-like repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma* 108: 457-468.
- Orgel, L.E. and Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.
- Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F.(2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic and Genome Research* 116: 218-223.
- Pimpinelli, S., Berloco M., Fanti L., Dimitri, P. Bonaccorsi, S., Marchetti, E., Caizzi R., Caggese, C. e Catti, M. (1995). Transposable elements are stable components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3804-3808.
- Plohl, M.; Luchetti, A.; Mesjtrović, N.; Mantovani, B. (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene* 409:72–82.

- Reed, K.M., Dorschner, M.O. e Phillips, R.B. (1997). Characteristics of two salmonid repetitive DNA families in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 79: 184-187.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaefer, S.A. (2003) Subfamily Hypoptopomatinae (Armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferreris Jr, C.L. (Eds) *Cheek List of the freshwater fishes of South America*. Porto Alegre: Edipucrs, p.321-329.
- Schmidtke, J.; Schmitt, E.; Matzke, E.; Engel, W. (1979) Non-repetitive DNA sequence divergence in phylogenetically diploid and tetraploid teleostean species of the family Cyprinidae and the order Isospondyli. *Chromosoma* 75: 185-198.
- The genome international sequencing consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Viñas, A.; Abuín, M.; Pardo, B.G.; Matínez, P. and Sanches, L. (2004) Characterization of a new *HpaI* centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. *Genética*. 121: 81-87.
- Wagner, R.P.; Maguire, M.P.; Stallings, R.L. (1993) *Chromosomes: a synthesis*. Wiley- Liss, Inc., New York.
- Xia, X. and Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92: 371-373.

4.4 Capítulo 4

Prospecção de sequências sexo específicas em *Hisonotus leucofrenatus* (Loricariidae, Hypoptopomatinae) com o uso da técnica de AFLP.

Resumo

Marcadores genéticos sexo-específicos, especialmente citogenéticos e de DNA, têm sido isolados e caracterizados em espécies de peixes, visando não somente a diferenciação entre machos e fêmeas, como também sua utilização em estudos sobre os mecanismos de determinação sexual, manipulação genética e sexagem de indivíduos adultos. Esses marcadores de DNA sexo-específicos têm sido identificados em várias espécies de peixes utilizando diferentes técnicas e uma delas é a técnica de AFLP, que permite que fragmentos não conhecidos no genoma sejam amplificados por PCR. *Hisonotus leucofrenatus* apresenta um cariótipo com $2n=54$ cromossomos e sistema de determinação sexual cromossômica do tipo ZZ/ZW, caracterizado por um bloco heterocromático presente no cromossomo W. Essas características tornam esta espécie um modelo interessante para estudos de identificação de marcadores sexo-específicos. Para o isolamento destes marcadores, foram analisados os polimorfismos em 4 *pools*, sendo 2 de machos e 2 fêmeas. Cada *pool* foi formado pelo DNA de 4 indivíduos. Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas a digestões enzimáticas, ligação de adaptadores e duas amplificações por PCR, uma pré-amplificação e uma amplificação seletiva. O material obtido foi amplificado utilizando um total de 56 combinações de *primers* e após a amplificação seletiva, os fragmentos obtidos foram analisados no programa ABI Prism® Genemapper Software versão 3.7 e com o programa Software versão 4.0. Através das análises comparando a ausência e presença de polimorfismos entre machos e fêmeas, foram detectadas algumas diferenças entre os *pools*, sendo que quatro combinações de *primers* evidenciaram bandas somente nos *pools* de fêmeas. Com a combinação de *primers* Eco32-Taq62, foi visualizada uma banda de 98pb, enquanto a combinação Eco34-Taq31 gerou uma banda de 84pb, a combinação Eco34-Taq57, apresentou uma banda de 189pb e a combinação Eco41-Taq36, permitiu identificar duas bandas de 58pb e 123pb. A presença destas bandas associadas ao sexo foi confirmada mediante a amplificação individual das amostras de DNA. A identificação desses polimorfismos em *H. leucofrenatus* contribui com informações para a compreensão dos mecanismos de determinação sexual na espécie e, por conseguinte, nos vertebrados.

Palavras-chave: AFLP, Sequência sexo-específica, *Hisonotus leucofrenatus*, Hypoptopomatinae

Introdução

A determinação de sexo está associada a diversos mecanismos nos diferentes grupos biológicos. Em alguns grupos, a determinação sexual pode ser decorrente de respostas a fatores ambientais como temperatura e circunstâncias sociais e, em outros, pode estar estritamente relacionada a fatores genéticos. Em peixes, a determinação sexual está geralmente sob controle de um par de genes ou de um pequeno número de genes (Kulg e Cumming, 2000).

As sequências de DNA sexo-específicas têm sido identificadas em muitas espécies de peixes com o uso de diferentes técnicas moleculares, incluindo RAPD, RFLP, AFLP e microssatélites (Devlin *et al.* 2001). Um gene de determinação sexual foi identificado em um vertebrado não mamífero, o peixe teleósteo medaka (Matsuda *et al.*, 2002, 2003). Este gene foi chamado de *dmY/dmrt1Y* e é comparado ao gene de determinação de sexo Sry, encontrado no cromossomo Y de mamíferos; contudo segundo Volff *et al.*, (2003a), esse parece não ser o gene principal para determinação sexual em peixes.

A espécie *Hisonotus leucofrenatus*, constitui um representante da subfamília Hypoptopomatinae, pertencente à ordem Siluriformes. Essa espécie de peixe tem se mostrado bastante interessante para estudos genéticos, principalmente no que diz respeito à investigação de sequências relacionadas à determinação de sexo. Os representantes dessa espécie apresentam número diplóide de $2n=54$ cromossomos e a presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo W se diferencia pela presença de um grande bloco heterocromático no braço longo. Além disso, também foi caracterizada a presença de cromossomos supranumerários no genoma desta espécie (Andreatta *et al.*, 1993), sendo que estes podem variar de 0 a 2 nos indivíduos, dependendo da população em análise. Com objetivo de identificar marcadores sexo-específicos no genoma da espécie *H. leucofrenatus*, foi utilizada a

técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), buscando polimorfismos específicos dos genomas de machos e fêmeas destes organismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA

Amostras de DNA total de indivíduos machos e de fêmeas foram extraídas de exemplares da espécie *H. leucofrenatus*, coletados no ribeirão Cavalão, Joinville, SC. O DNA foi extraído a partir de fragmentos de tecidos de fígado, brânquias e músculos fixados em álcool absoluto, utilizando o método fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001). Após a purificação, a qualidade e quantidade do DNA foram analisadas em gel de agarose e por espectrofotometria. O sexo dos indivíduos foi determinado pela análise morfológica das gônadas.

Análises de marcadores de AFLP

Para a análise dos marcadores de AFLP, as amostras de DNA foram separadas em 4 *pools* sendo, 2 de machos e 2 de fêmeas, cada um constituído de DNA genômico (100ng/μl) de 4 indivíduos. A técnica de AFLP foi conduzida como descrito em Vos *et al* (1995). As amostras de DNA obtidas dos *pools* de indivíduos foram inicialmente tratadas com duas diferentes enzimas de restrição (*EcoRI* e *TaqI*) e, posteriormente, os produtos obtidos foram ligados a adaptadores nas extremidades das sequências. Em seguida foram realizadas duas ampliações por PCR, a primeira usando a combinação de 2 *primers* com as sequências dos adaptadores e a segunda utilizando uma combinação de 15 *primers*. Também foram utilizados *primers* marcados para posterior análise dos fragmentos em sequenciador de capilar automático (sequenciador ABI Prism 3100 - Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Para a análise dos fragmentos, foram usados capilares de 36 cm, polímero POP4TM como meio de separação e Gene ScanTM-500 LIZTM como marcador

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os resultados foram analisados com o uso dos programas ABI Prism® Genemapper Software, versão 3.7 e ABI Prism® Genemapper Software, versão 4.0 de AFLPs.

Resultados e Discussão

A técnica de AFLP tem por base o fato de que fragmentos não conhecidos de DNA sejam amplificados por PCR após terem sido originados pela digestão do DNA total da espécie por enzima de restrição. Essa técnica tem a capacidade de detectar vários polimorfismos em regiões diferentes do genoma e vem sendo usada amplamente para os estudos em peixes, visando identificar marcadores de DNA associados ao sexo, sem conhecimento prévio sobre o DNA do organismo em estudo.

Para a realização dessa técnica, foram realizadas extrações de DNA da espécie *H. leucofrenatus* (16 fêmeas e 16 machos). A princípio foi analisada a possibilidade de existência de polimorfismo em 4 *pools* (2 de machos e 2 fêmeas), sendo que para cada *pool* havia DNA de 4 indivíduos. O material genômico dos *pools* foi amplificado utilizando um total de 56 combinações de *primers* (Tabela 1).

Tabela 1: Combinações de *primers* testados na espécie *H. leucofrenatus* pela técnica de AFLP, a fim de se buscar sequências sexo-específicas. Possíveis combinações de *primers* são enumeradas de 1 a 56. Os primeiros 4 *primers* de Taq necessitam de um passo pré-seletivo usando *primers* complementares aos adaptadores e acrescentando de um nucleotídeo de adenina no final 3', enquanto que para os outros quatro *primers* Taq é acrescentado um de citosina.

Eco→ Taq↓	AAC*	AAG*	ACA*	ACG*	ACT*	AGC*	AGT*
AAC	1	9	17	25	33	41	49
AAG	2	10	18	26	34	42	50
ACG	3	11	19	27	35	43	51
ACT	4	12	20	28	36	44	52
CAC	5	13	21	29	37	45	53
CAG	6	14	22	30	38	46	54
CAT	7	15	23	31	39	47	55
CCT	8	16	24	32	40	48	56

* *Primers* marcados

Para que ocorram as combinações mostradas na Tabela 1, foram feitas duas diferentes preparações do DNA, após serem digeridos e ligados os adaptadores. Para isso, foi realizada uma pré-amplificação utilizando dois *primers* construídos a partir das sequências complementares aos adaptadores, adicionado-se no final 3' um nucleotídeo seletivo de adenina ou citosina (+1). Na amplificação seguinte foram utilizados *primers* contendo dois nucleotídeos seletivos adicionais (+3), produzindo assim um número adequado de fragmentos de restrição amplificados para serem analisados pelo sequenciador automático. A amplificação pré-seletiva produziu um *smear* contínuo, com tamanho entre 200 a 900 pb (Figura 1).

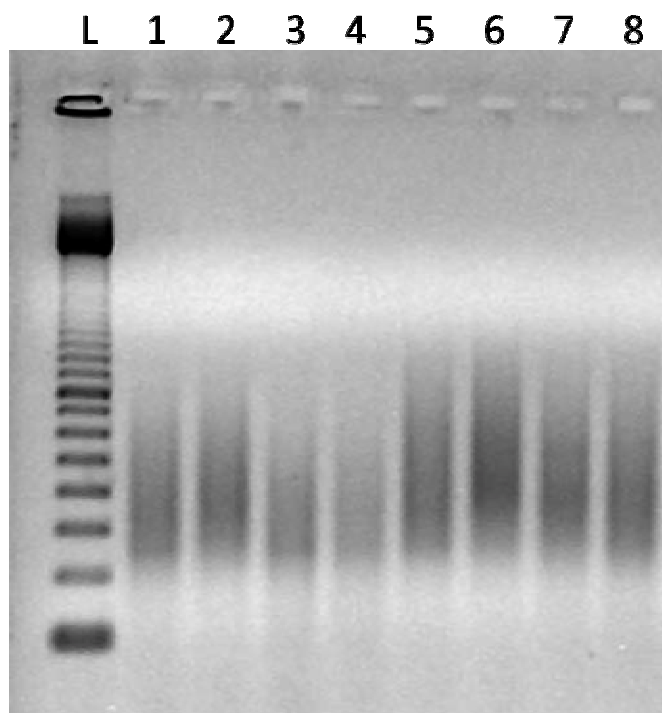


Figura 1: Gel de agarose a 1% evidenciando a pré-amplificação dos *pools* de material genômico da espécie *H. leucofrenatus*. L) Marcador molecular de 100pb; 1-2) *Pools* de fêmeas, com a adição de uma adenina durante a pré-amplificação (final A/A); 3-4) *Pools* de machos com a adição de uma adenina durante a pré-amplificação (final A/A); 5-6) *Pools* de fêmeas, com a adição de citosina durante a pré-amplificação (final AC); 7-8) *Pools* de machos, com a adição de citosina durante a pré-amplificação (final AC).

Após o passo de pré-amplificação, foi realizado um teste para determinação da adequação da quantidade de DNA pré-amplificado para sua utilização nas ampliações seletivas. Para isso, foi escolhida a combinação do *primer* Eco 31 com o *primer* Taq 31 (A/A) e com o *primer* Taq51 (A/C), sendo testadas quantidades de 0.5 μ l e 1 μ l do DNA na pré-amplificação. Verificou-se que o melhor resultado foi obtido com o uso de 1 μ l (Figura 2). Para os demais *primers*, também foi utilizada esta quantidade de DNA nas ampliações realizadas.

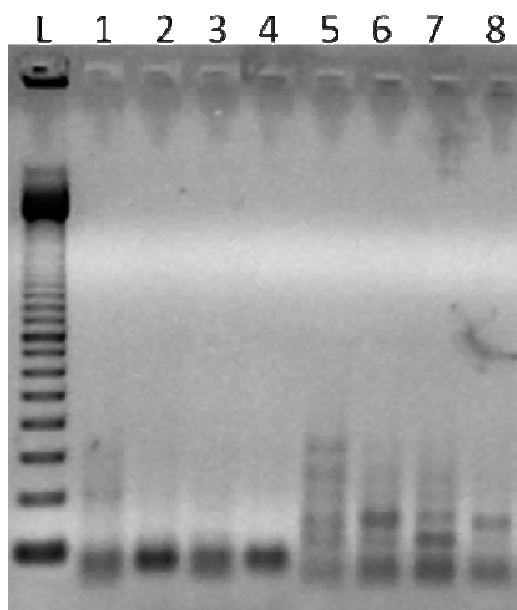


Figura 2: Gel de agarose evidenciando o teste da amplificação seletiva. L) Marcador molecular de 100pb; 1-4) *Primers* Eco 31 – Taq 31, utilizando 0,5µl na amplificação seletiva, 1 e 2 *pools* de fêmeas, 3 e 4 *pools* de machos; 5-8) *Primers* Eco 31 – Taq 31, utilizando 1µl na amplificação seletiva, 5 e 6 *pools* fêmeas, 7 e 8 *pools* de machos.

A amplificação seletiva foi realizada utilizando as 56 combinações de *primers* previstas. Essas combinações foram testadas, a princípio, material provenientes os 2 *pools* de machos e dos 2 *pools* de fêmeas. Após a amplificação, os fragmentos obtidos foram analisados no programa ABI Prism® Genemapper Software versão 3.7 e com o programa Software versão 4.0, buscando ausência ou presença de picos com a finalidade de detectar polimorfismos (Figuras 3 e 4).

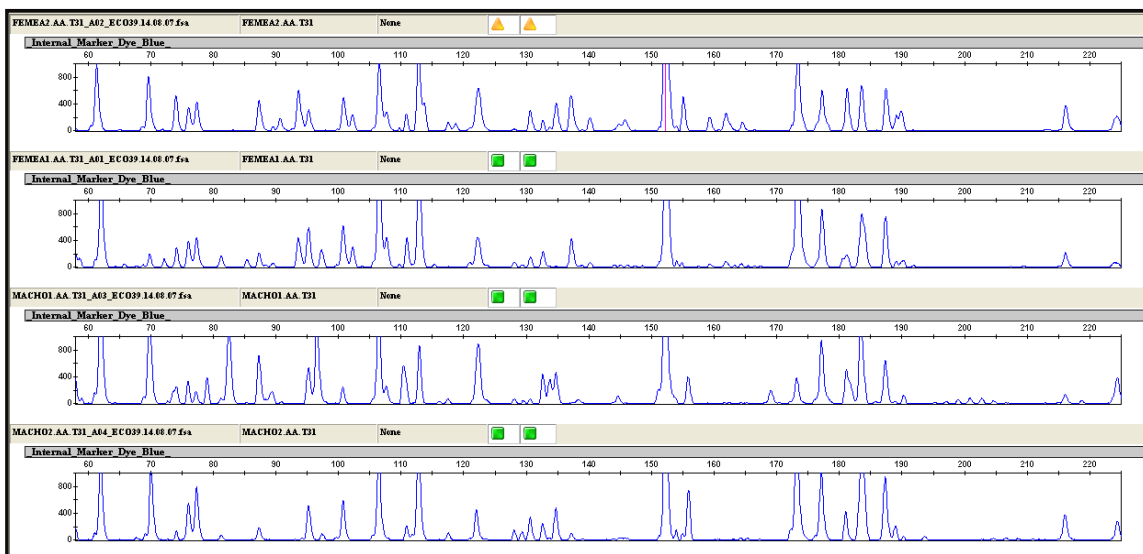


Figura 3: Análise dos *pools* do material genômico de fêmeas e machos com a combinação de *primers* Eco39 – Taq31 na espécie *H. leucofrenatus*.

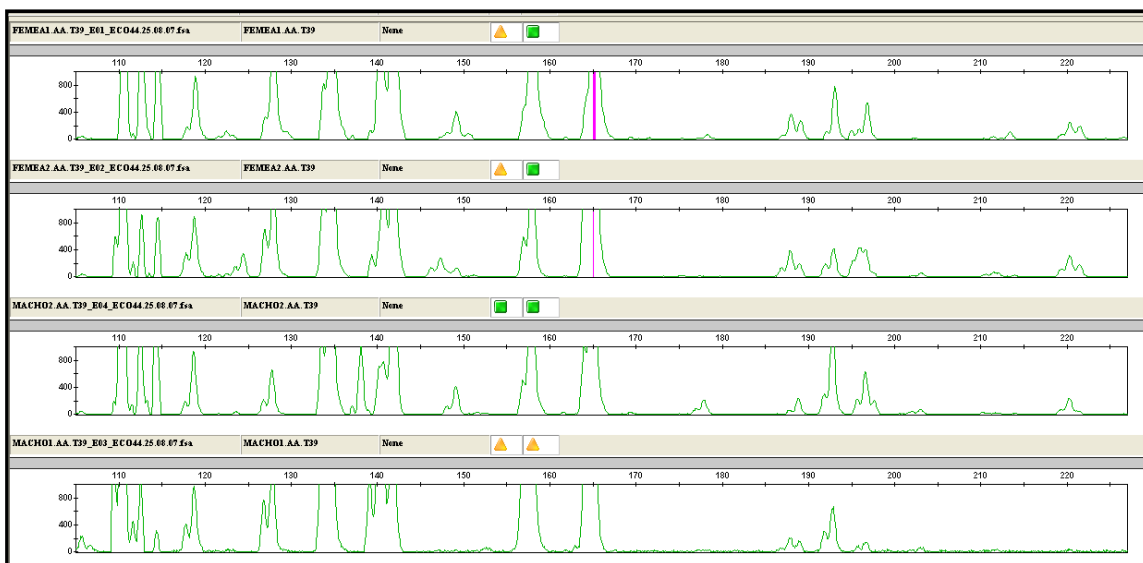


Figura 4: Análise dos *pools* de material genômico de fêmeas e machos e com a combinação de *primers* Eco44 – Taq39 na espécie *H. leucofrenatus*.

As análises comparativas sobre ausência e presença de polimorfismos entre machos e fêmeas permitiram a identificação de algumas diferenças entre os *pools* de machos e fêmeas, conforme apresentados na Tabela 2. Todas as diferenças foram encontradas somente nos *pools* de fêmea (Figuras 5, 6, 7, 8, 9).

Tabela 2: Combinações de *primers* que geraram resultados positivos e suas respectivas bandas encontras nos *pools* de fêmeas de *H. leucofrenatus*.

Combinações dos <i>primers</i>	Tamanho da banda	<i>Pools</i> encontrados
Eco 32 – Taq 62	98 pb	Fêmeas
Eco 34 – Taq 31	84 pb	Fêmeas
Eco 34 – Taq 57	189 pb	Fêmeas
Eco 41 – Taq 36	58 pb e 123 pb	Fêmeas

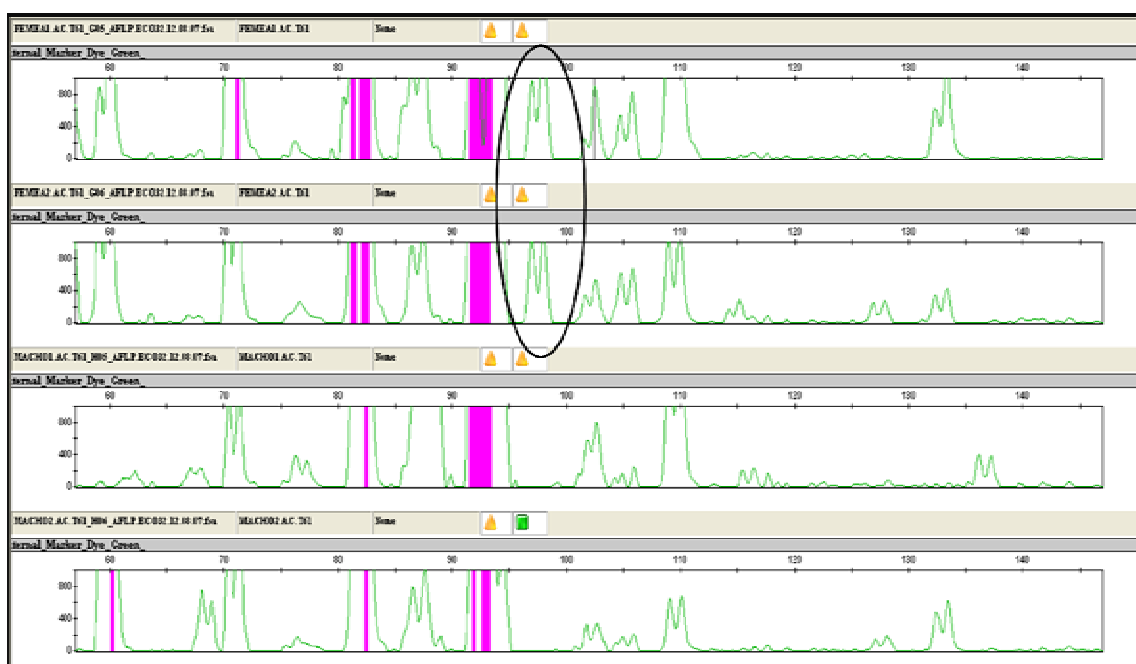


Figura 5: Análise dos *pools* de material genômico de fêmeas e machos com a combinação de *primers* Eco 32 – Taq 62. O círculo evidencia a diferença encontrada no genoma das fêmeas em *H. leucofrenatus*, onde uma banda de 98pb não foi encontrada nos machos.

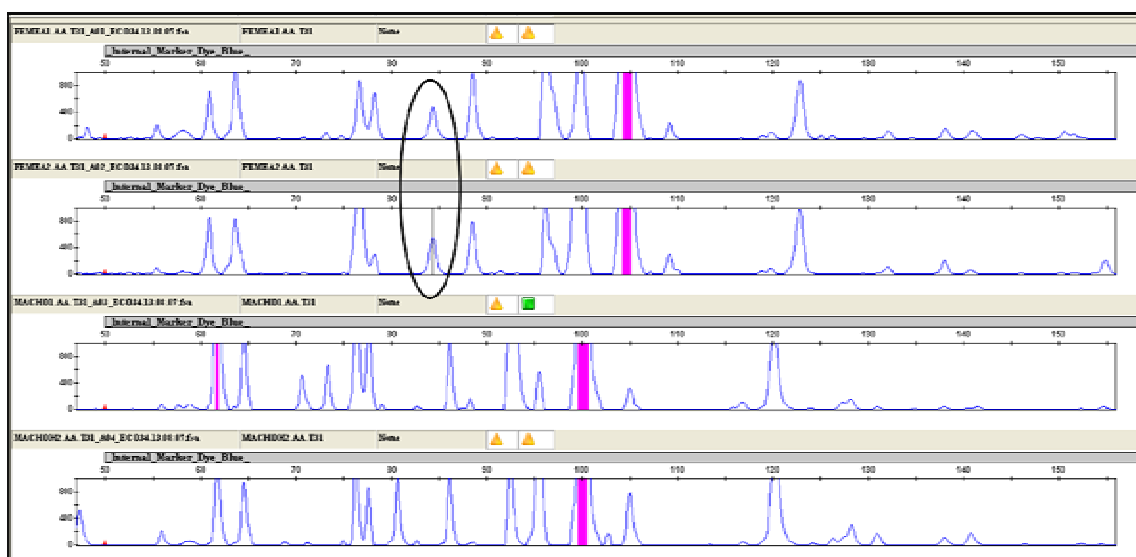


Figura 6: Análise dos *pools* de material genômico de fêmeas e machos com a combinação de *primers* Eco 34 – Taq 31. O círculo evidencia a diferença encontrada no genoma das fêmeas em *H. leucofrenatus*, onde uma banda de 84pb não foi encontrada nos *pools* de machos.

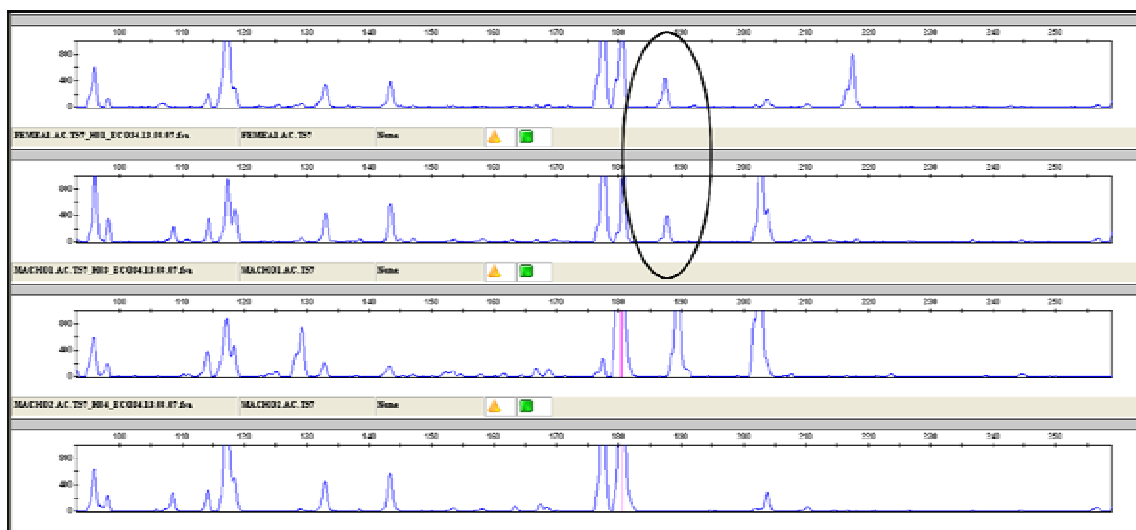


Figura 7: Análise dos *pools* de material genômico de fêmeas e machos com a combinação de *primers* Eco 34 – Taq 57. O círculo evidencia a diferença encontrada no genoma das fêmeas em *H. leucofrenatus*, onde uma banda de 189pb não foi encontrada nos *pools* de machos.

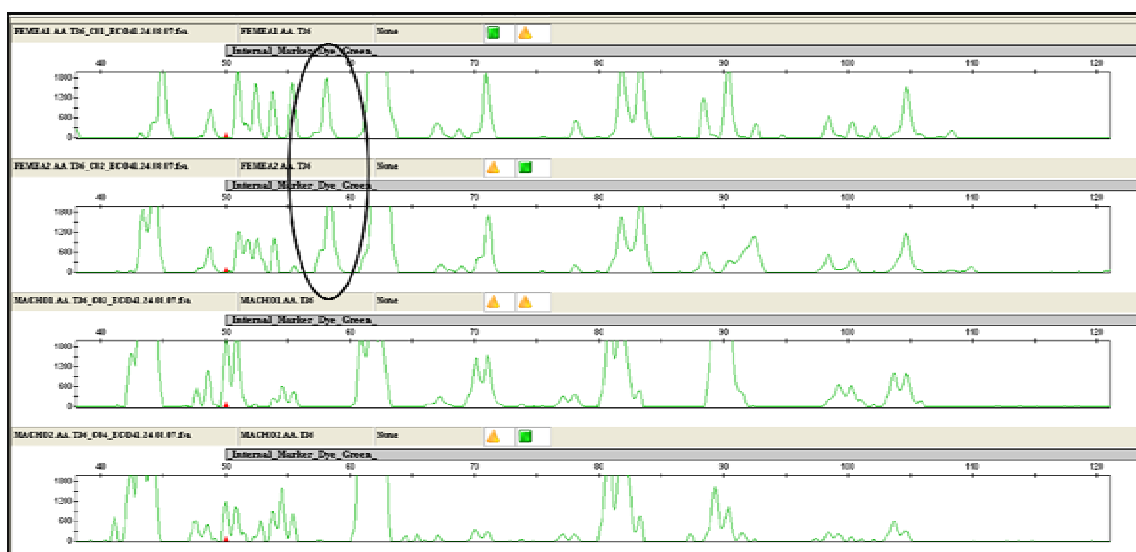


Figura 8: Análise dos *pools* de material genômico de fêmeas e machos com a combinação de *primers* Eco 41 – Taq 36. O círculo evidencia a diferença encontrada no genoma das fêmeas em *H. leucofrenatus*, onde uma banda de 58pb não foi encontrada nos *pools* de machos.

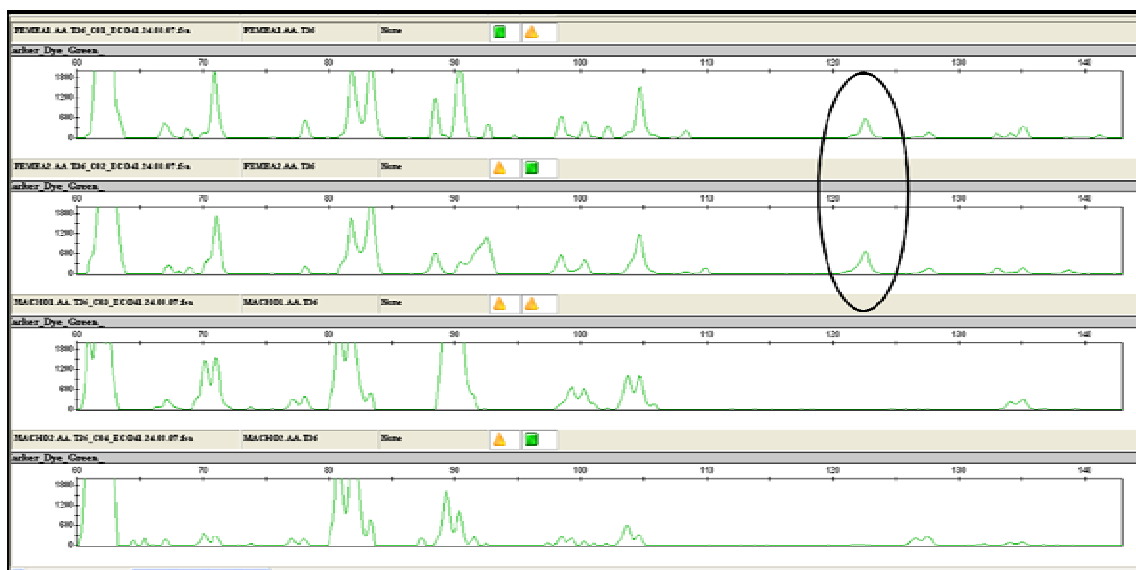


Figura 9: Análise dos *pools* de material genômico de fêmeas e machos com a combinação de *primers* Eco 41 – Taq 36. O círculo evidencia a diferença encontrada no genoma das fêmeas em *H. leucofrenatus*, onde uma banda de 123pb, não foi encontrada nos *pools* de machos.

Para confirmar a identidade das bandas encontradas nos *pool* de fêmeas de *H. leucofrenatus* como bandas sexo-específicas, os indivíduos foram testados separadamente, sendo analisados oito machos e oito fêmeas para cada combinação de *primers*. Os resultados estão apresentados na Tabela 3 onde foram indicadas as combinações dos *primers* utilizados e os indivíduos machos e fêmeas que apresentaram o pico esperado.

Tabela 3: Combinações de *primers* e número de indivíduos fêmeas e machos de *H. leucofrenatus* que apresentaram os picos diferenciais nas combinações testadas.

Combinações de <i>Primers</i>	Fêmeas	Machos
Eco 32- Taq 62	7	0
Eco 34 – Taq 31	7	3
Eco 34 – Taq 57	4	0
Eco 41 – Taq 36 (58pb)	5	3
Eco 41 – Taq 36 (123pb)	5	1

As bandas detectas com as cinco combinações de *primers* (Tabela 2), foram testadas em 16 indivíduos (8 machos e 8 fêmeas). Estes apresentaram resultados bastante incisivos, indicando a existência de um marcador sexual para fêmeas da espécie *H. leucofrenatus*.

A busca por marcadores sexo-específicos vem aumentando nos últimos anos e a técnica de AFLP tem se constituído numa importante ferramenta na identificação destes marcadores sexo-específicos, bem como de polimorfismos nos genomas. Os peixes constituem um grupo promissor para tais estudos, pois nesse grupo de organismos o sistema de determinação sexual não é totalmente determinado, podendo-se encontrar indivíduos que apresentam sistema de determinação do tipo XX/XY e ZZ/ZW no mesmo grupo e ainda indivíduos que não

apresentam sistema de determinação sexual identificado morfológicamente, estando os genes de determinação distribuídos nos cromossomos do lote diplóide.

Muitos trabalhos vêm sendo realizados utilizando a técnica de AFLP e em peixes essa técnica vem sendo usada para o isolamento de sequências específicas ligadas ao sexo, como é o caso do marcador isolado em *Oncorhynchus mykiss* (Felip *et al.*, 2005), em *Takifugu rubripes* (Cui *et al.*, 2006) e em *Cynoglossus semilaevis* (Chen *et al.*, 2007). Também tem sido usada para diferenciar genomas em outros grupos como em plantas (Lebel-Handenack *et al.*, 2002; Peil *et al.*, 2003) e em invertebrados (Tan *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005).

Entre os peixes, foi identificado o primeiro gene de determinação sexual a nível molecular (Matsuda *et al.*, 2002, 2003). Esse gene foi isolado do Medaka (*Oryzias latipes*) e denominado *dmrt1bY*, sendo uma cópia do gene *dmrt1*. As fêmeas apresentam duas cópias alélicas e os machos, além das duas cópias evidenciadas em fêmeas, apresentam uma cópia adicional ligada ao Y (*dmrt1bY*). O gene *dmrt1Y* é comparado ao gene *SRY* presente no cromossomo Y de mamíferos. Porém, segundo Volff *et al.*, 2003a, esse gene não é o primário e universal para determinação sexual em peixes.

Os dados obtidos com a técnica de AFLP para a espécie *H. leucofrenatus*, mostram-se bastante interessantes, visto que os picos específicos foram observados no genoma das fêmeas. Esta espécie apresenta um sistema de determinação cromossômica sexual do tipo ZZ/ZW, onde a fêmea é o sexo heterogamético. Porém, os dados obtidos são ainda preliminares, podendo servir de base para o isolamento de um gene específico do sexo.

Referências

- Andreato A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S. (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220
- Chen, S.L.; Li, J.; Deng, S.P.; Tian, Y.S.; Wang, Q.Y.; Zhuang, Z.M.; Sha, Z.X.; Xu, J.Y. (2007). Isolation of Female-Specific AFLP markers and Molecular Identification of Genetic Sex in Half-Smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology* 9: 273-280.
- Cui, J.Z.; Shen, X.Y.; Gong, Q.L.; Yang, G.P. Gu, G.Q. (2006) Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* 257: 30-36.
- Devlin R.H, Biagi C.A, Smailus, D.E (2001). Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica* 111: 43-58.
- Felip A., Young W.P., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. (2005). An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247, 35-43.
- Klug, W.S. And Cummings, M.R. (2000) Concepts of genetics. 6. ed. New Jersey, Prentice Hall. 816p.
- Lebel-Handenack, S.; Hauser, E.; Law, T.F.; Schmid, J.; Grant, S.R. (2002). Mapping of sex determining loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism. *Genetics* 160: 717-725.
- Li, L.; Xiang, J.; Liu, X.; Zhang, Y.; Dong, B.; Zhang, X. (2005). Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture* 245: 63-73.
- Matsuda, M.; Nagahama, Y.; Shinomiya, A.; Sato, T.; Matsuda, C.; Kobayashi, T.; Morrey, C. E.; Shibata, N. Asakawa, S.; Shimizu, N.; Hori, H.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. (2002). DMY is a specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559-563.

- Matsuda, M.; Sato, T.; Toyazaki, Y.; Nagahama, Y.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias curvinotus* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zool. Sci.* 20:159-161.
- Peil, A.; Flachowsky, H.; Schumann, E.; Weber, W.E. (2003). Sex-linked AFLP marked indicate a pseudotoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor Appl. Genet.* 107: 102-109.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Tan, Y.D.; Wan, C.; Zhu, Y.; Lu, C.; Xiang, Z.; Deng, H.W. (2001). An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics* 157: 1277-1284.
- Volff, J.N., Kondo, M., Schartl, M. (2003a) Medaka *dmY/dmrt1Y* is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet* 19: 196-199.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeay, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407– 4414.

5. Discussão Final

Os estudos moleculares realizados no presente trabalho trouxeram importantes informações acerca da organização genômica das espécies da subfamília Hypoptopomatinae, tendo em vista a escassez de informações existentes, principalmente no que diz respeito à composição da heterocromatina constitutiva que é bastante heterogênea nesse grupo. Do ponto de vista citogenético a subfamília Hypoptopomatinae apresenta um cariótipo bastante conservado, com número diplóide generalizado de $2n=54$ cromossomos (Andreatta *et al.*, 1992, 1993, 1994; Ferreira *et al.*, 2005). Nesta grupo, foram identificadas apenas duas exceções, *Otocinclus aff. vestitus* da bacia Amazônica, que possui $2n=72$ (Andreatta *et al.*, 1993) e *Otocinclus gibbosus*, que mostrou $2n=58$ cromossomos (Andreatta *et al.*, 2000). Nessa subfamília há duas espécies que apresentam cromossomos sexuais, *Hisonotus leucofrenatus* que apresenta um sistema de determinação do tipo ZZ/ZW, além de cromossomos supranumerários e *Pseudotocinclus tientensis*, que apresenta um sistema do tipo XX/XY, tornando assim este grupo bastante interessante para estudos sobre a estrutura e função das sequências repetidas, ligadas a cromossomos sexuais ou polimorfismos gerais no genoma.

Estudos com os elementos repetidos dispersos vêm crescendo nos eucariotos, principalmente nos peixes. Os dados obtidos na literatura até o presente mostram que os transposons e retrotransposons se encontram dispersos no genoma. Porém, tem sido verificado que frequentemente ocorre grande acúmulo desses elementos nas regiões de heterocromatina constitutiva, como nos casos do elemento *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* de *Tetradon nigroviridis* (Dasilva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004), em 13 espécies de peixes da Antártida (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004), em *Astronotus ocellatus* (Mazuckelli e Martins, 2009), no

do transposon *Zebulon* (Bouneau *et al.*, 2003), de *Tc1* (Capriglione *et al.*, 2002; Fischer *et al.* 2004) e como encontrado para *Rex1* e *Rex3* nas espécies da subfamília Hypoptopomatinae (Capítulo 1) e do elemento transponível *LHBam* isolado para *Hisonotus leucofrenatus* (Capítulo 2). Essas aglomerações dos elementos transponíveis também são observadas em outros grupos de organismos, como em plantas, nos casos de *Arabidopsis thaliana* e *Oryzas sativa* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Lenior *et al.*, 2001) e em insetos, como *Drosophila melanogaster* (Bartolomé *et al.*, 2002). Porém, em mamíferos esse elementos são geralmente encontrados em regiões eucromáticas dos cromossomos (Volff *et al.*, 2003).

Os dados obtidos no presente trabalho reforçam os dados da literatura, onde as indicações sugerem que a heterocromatina constitutiva funcione como um reservatório para os elementos transponíveis. Tal fato seria explicado, por existirem poucos genes nestas regiões associadas a uma reduzida taxa de recombinação, levando então ao acúmulo desses elementos dispersos. Além disso, considera-se que esses elementos devem desempenhar papéis fundamentais nas regiões heterocromáticas, como manutenção e estruturação dos centrômeros, contribuindo assim para a evolução dos eucariotos.

Os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* isolados no presente trabalho se encontram conservados no genoma das espécies da subfamília Hypoptopomatinae. Essa conservação não ocorre apenas em nível das espécies desta subfamília, uma vez que esses elementos estão conservados em grupos de peixes distante filogeneticamente da subfamília Hypoptopomatinae, sugerindo que possam ter sido incorporados há muito tempo em seus genomas e vem desempenhando um papel importante na conservação estrutural cromossômica.

Outra classe de elementos repetidos estudada no presente trabalho é constituída pelas sequências satélites. Essas sequências são altamente repetidas *in tandem* no genoma, apresentando-se geralmente organizadas em *clusters* em regiões heterocromáticas. No presente trabalho foi isolada uma sequência satélite do genoma da espécie *Pseudotocinclus tietensis*, denominada *PTHind*. Essa sequência apresenta uma alta concentração de adenina e timina e está organizado em cadeia, caracterizando-se como uma sequência satélite.

Os estudos das sequências satélites em peixes ainda são escassos, quando comparados a grande diversidade de espécies encontrada neste grupo. Dados sobre a organização das sequências satélites estão disponíveis para 52 espécies de peixes e se observa uma maior concentração destas sequências satélite nas regiões centroméricas (Martins, 2007). Porém, o satélite isolado *PTHind*, não apresentou marcações com a técnica de FISH, provavelmente devido à particularidades de sua organização em pequenos *clusters*, o que dificultaria sua visualização com a técnica empregada.

Estudos de DNA satélite indicam que estas sequências podem ter um comportamento espécie-específicos ou então apresentam-se conservadas em espécies intimamente relacionadas. Este parece ser o caso do satélite *PTHind*, isolado para a espécie *P. tietensis*, que se encontra exclusivamente no genoma desta espécie, característica esta que a torna um bom marcador molecular. Essa característica já foi encontrada por Koeher, *et al.* (1997), que isolaram um satélite de 483 pb da espécie *Leporinus obtusidens* e realizaram experimentos de hibridação em membrana com DNA de várias espécies desse gênero. Além da espécie em que se obteve a sonda, esse satélite foi localizado somente em *L. elongatus*, estando presente na região centromérica de um único par de cromossomos em ambas as espécies. Esses estudos demonstraram que esse satélite constituem-se em

importante marcadores citogenéticos para estas espécies pertencentes a uma família de peixes que apresentam características kariótípicas bastante similares entre seus representantes.

Em outro estudo de DNA satélite envolvendo o grau de conservação entre espécies relacionadas, Vinãs *et al.* (2004) isolaram uma sequência repetitiva centromérica denominada *HpaI* na espécie *Salmo salar*. Testaram seu grau de conservação em diferentes espécies da família Salmonidae (*S. trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *O. kisutch*) e demonstraram que esta sequência satélite tinha homologia apenas com *S. trutta*, apresentando inclusive a mesma organização encontrada para *S. salar*. Esta sequência, quando pesquisada no *GenBank/EMBL*, apresentou homologia significativa com a sequência *AluI/RsaI* de *S. namaycush*, uma espécie pertencente a família Salmonidae. A conservação desta família satélite pode indicar que *Salmo* e *Salvelinus* são mais relacionados dentro da família Salmonidae e que esta sequência homóloga estaria presente no ancestral dessas duas espécies.

Em outro estudo de DNA satélite espécie-específico realizados por Azevedo, *et al.*, 2005, foi isolado e caracterizado um segmento de DNA satélite da espécie *Achirus lineatus*, constituído por 204pb e contendo 63% de AT. Experimentos de hibridação em membrana demonstraram que este fragmento estava presente apenas em *A. lineatus* e ausente nas espécies *A. declives*, *Gymnachirus nudus* e *Trinectes paulistanus*, caracterizando-se, portanto, como um marcador molecular específico para a espécie.

Também foi investigada no presente trabalho, o isolamento de uma sequência sexo específica no genoma de *Hisonotus leucofrenatus*. A busca por sequências sexo específicas tem apresentado um crescente interesse, visando compreender o mecanismo de determinação de sexo neste grupo de organismo. A técnica de AFLP mostra-se bastante promissora para o isolamento de regiões do genoma que

possam estar ligadas aos mecanismos de determinação do sexo em peixes. Neste trabalho cinco bandas obtidas pela técnica de AFLP, foram isoladas somente do genoma das fêmeas, podendo se constituir em potenciais sequências responsáveis pela determinação de sexo na espécie *H. leucofrenatus*.

Considera-se, pois, que os estudos com marcadores citogenéticos estruturais e moleculares realizados em peixes, com representantes da subfamília Hypoptopomatinae resultaram em informações de interesse, que podem direcionar esforços no sentido de uma melhor compreensão sobre a estrutura genômica destas espécies e, por conseguinte, do genoma dos peixes.

6. Conclusões

As análises realizadas visando ao melhor conhecimento sobre a organização genômica das sequências repetitivas e de marcadores sexo-específico em espécies de peixes da subfamília Hypoptopomatinae permitiram concluir que:

- 1- As espécies da subfamília Hypoptopomatinae apresentam conservados no seu genoma os elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3*. Estes elementos estão dispersos no genoma das espécies dessa subfamília, e podem formar blocos preferencialmente em regiões heterocromáticas;
- 2- No genoma da espécie *Hisonotus leucofrenatus* um elemento repetido disperso, foi isolado através de digestão enzimática, e este transposon recebeu a denominando *HLBam*;
- 3- *HLBam* apresenta-se rico em A – T e está espalhado no genoma das espécie *H. leucofrenatus*, formando blocos em regiões heterocromáticas;
- 4- Satélite *PTHind* em *Pseudotocinclus tietensis*, foi isolada uma sequência que tem como características a alta concentração de bases A – T e é organizado em *tandem* no genoma. Este elemento não apresentou homologia com sequências de nenhuma espécie da subfamília Hypoptopomatinae;
- 5- O satélite *PTHind* de *P. tietensis* pode ser considerado como um marcador molecular específico, uma vez que apresenta um padrão exclusivo de organização no genoma desta espécie, permitindo a diferenciação de *P. tietensis* das outras espécies analisadas da subfamília Hypoptopomatinae;
- 6- A aplicação da técnica de AFLP permitiu identificar prováveis marcadores sexo-específicos no genoma das fêmeas de *H. leucofrenatus*, tendo sido verificado

que as 4 combinações de *primers* testadas entre 56, apresentaram marcadores consistente;

- 7- O isolamento e caracterização dos marcadores moleculares estudados constituem uma ferramenta importante para o melhor conhecimento do genoma das espécies da subfamília Hypoptopomatinae estudadas e, por conseguinte, dos peixes.

7. Referências

- Abrusán, G. e Krambeck, H. (2006). Competition may determine the diversity of transposable elements. *Theoretical Population Biology* 70: 364-375.
- Alexander, R.M. (1965) Structure and function in catfish. *J. Zool.*, v.148, p.88-152.
- Almeida-Toledo, L.F., F.Foresti, M.F.Z.Daniel e S.A.Toledo-Filho (2000). Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y-chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma* 109: 197-200.
- Almeida-Toledo L.F., Foresti F., Toledo-Filho S.A. (2000a) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *Chrom. Today* 13:169-82.
- Andreatta A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho S.A. (1992) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY Sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57: 369-372
- Andreatta A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S. (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220
- Andreatta A.A., Almeida-Toledo L.F., Oliveira C., Toledo-Filho A.S. (1994) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): III. Analysis of seven species. *Caryologia* 47: 27-37
- Andreatta AA, Alves AL, Foresti F, Oliveira C (2000) *Hisonotus gibbosus* (Teleostei, Loricariidae), segundo hypoptopomatineo com número diplóide diferente de 54 cromossomos. *Genet. Mol. Biol.* 23: 57.
- Andreatta A.A. (2002) Estudos citogenéticos no gênero *Microlepidogaster* (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). Tese (doutorado) – Instituto de Biociência de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Aparicio, S. et al (2002). Whole-Genome shotgun assembly and analyses of the genome *Fugu rubripes*. *Science*, vol: 297.

- Arkhipchuk, V.V (1995) Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. *Hydrobiology* 31: 55-65.
- Armbruster, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141, 1-80. Burgess, W.E. (1989) An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Azevedo, M.F.C., C.Oliveira, C.Martins, A.P.Wasko e F.Foresti (2005) Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). *Genetica* 125: 205-210.
- Bartolome, C.; Maside, X.; Charlesworth, B. (2002) On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 19:926–937
- Baroiller, J-F., Guiguien, Y. and Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910-931.
- Bouneau, L.; Fisher, C.; Ozouf-Costaz, C.; Froschauer, A.; Jaillon, O.; Coutanceau, J.P.; Körting, C., Weissenbach, J.; Bernot, A.; Volff, J.N. (2003). An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research*. v13, p1686-1695.
- Burgess, W.E. (1989). An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Capriglione, T.; Odierna, G.; Caputo, V.; Canapa, A.; Olmo, E. (2002) Characterization of a *Tc1*-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. *Gene*. 295: 193-198.
- Charlesworth, B.; Snlegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Chiachio, M. C.; Oliveira, C.; Montoya-burgos, J. I. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, p. 606.
- Dasilva C.; Hadji H.; Ozouf-Costaz C.; Nicaud S.; Jaillon O.; Weissenbach J.; Crollius H.R. (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and

- pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v99, n21, 1636-1641.
- Devlin R.H, Biagi C.A, Smailus, D.E (2001). Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica* 111: 43-58.
- Devlin RH and Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Ecker, M. A.Fritz e M.Westerfield (1992). Identification of two families of satellite-like repetitive DNA sequences from the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics* 13: 1169-1173.
- Eickbush, T.H. e A.V.Furano (2002). Fruit flies and humans respond differently for retrotransposons. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 669-674.
- Epplen, J.F. and Epplen-Haupt, A. (2002). Aspects of tandemly organized, repetitive sequence in chromosomal DNA. In Some aspects of chromosome structure and functions. Sobti, R.C. Obe, G.; Athwal, R.S. (eds). New Delhi: Narosa Publishing House, cap. 1: 1-10.
- Ezaz, T., R.Stiglec, F.Veyrunes and J.A.M.Graves (2006). Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* 16: 736-743.
- Felip A., Young W.P., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. (2005). An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247, 35-43.
- Ferreira, D.C. (2005) Estudos citogenéticos e caracterização de DNA satélite em espécies da subfamília Hypoptopomatinae (Pisces, Loricariidae). Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociência de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Ferreira, D.C.; Chiachio, M.C.; Takako, A.K.; Andreato, A.A.; Oliveira, O.; Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Cariologia* 58 (4): 387-395.
- Ferreira, I.A. and Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.

- Ferraris, C. J. (1998) Catfishes and knifefishes. In: Paxton, J.R.; Eschmeyer, W.N. (Eds). Encyclopedia of fishes. San Diego: Academic Press, p. 106-12.
- Ferraris, C.J. (1995). Catfishes and Knifefishes. IN: Encyclopedia of fishes, J.R. Paxton & W.N. Eschmeyer eds. Acadmic Press, San Diego, p. 106-112.
- Fischer, C; Bouneau, L.; Coutenceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volf, J.N.; Ozouf-Costaz, C. (2004). Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *tetraodon nigroviridis*. Gene 336: 175-183.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. and Toledo, S.A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogen. Cell Genet. 31: 137-144.
- Garrido-Ramos, M.A.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M. (1994). Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. Cytogenet. Cell. Genet., 65: 233-237.
- Garrido-Ramos, M.A.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Rejon, C.R.; Rejon, M.R. (1995) The EcoRI centromeric satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) contains a sequence motive common to other vertebrate centromeric satellite DNAs. Cytogenet Cell Genet 71: 345-351.
- Garrido-Ramos, M.A.; De La Herran, R.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Rejon, C.R.; Rejon, M.R. (1999) Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). Mol Phylogenet Evol 12: 200-204.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Jesus, C.M.; Galetti Jr, P.M.; Valentini, S.R. and Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. Genética, 118: 25-32.
- Koehler, M.R.; Haaf, T.,Guttenbach, M.; Schartl, M.; Schmid, M. (1997). Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosomo-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. Genetica, 5: 325-331.

- Koga, A.; Lida, A.; Hori, H.; Shimada, A.; Shima, A. (2006). Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: the medaka fish Tol2 element contributes to genetic variation without recognizable traces. *Mol. Biol. Evol.* 23(7):1414-1419.
- Klug, W.S. And Cummings, M.R. (2000) Concepts of genetics. 6. ed. New Jersey, Prentice Hall. 816p.
- Lenoir, A.; Lavie, L.; Prieto, J.L.; Goubely, C.; Cote, J.C.; Pélissier, T.; Deragon, J.M. (2001). The evolutionary origin and genomic organization of SINEs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol* 18:2315–2322
- Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4: 203-221.
- Martin, S.L. (1991). LINEs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 505-508.
- Martins C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.
- Matsuda, M.; Nagahama, Y.; Shinomiya, A.; Sato, T.; Matsuda, C.; Kobayashi, T.; Morrey, C. E.; Shibata, N. Asakawa, S.; Shimizu, N.; Hori, H.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. (2002). DMY is a specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559-563.
- Matsuda, M.; Sato, T.; Toyazaki, Y.; Nagahama, Y.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias curvinotus* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zool. Sci.* 20:159-161.
- Mazzuchelli, J. and Martins, C. (2009). Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, *in press*.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr., P.M.; Valentin, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, v. 85, p. 1-9.
- Morescalchi, A. (1992). Chromosomes, sex determination and environment in teleosts. In: R.Dallai (ed) *Sex Origin and Evolution*. Moderna: UZI, pp137-149.

- Nakayama, I.; Foresti, F.; Tewari, R.; Schartl, M. & Chourrout, D. (1994) Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* 103: 31-39
- Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the World*. New York: John Wiley and Sons, 4th ed.
- Oliveira, C.; Wright, J.M.; Foresti, F. (2002) Chromosome structure in fishes. IN: Some aspects of chromosome structure and functions. RC Sobti, Obe G, Athwal RS eds. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 103-108.
- Okada, N. (1991). SINEs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 498-504.
- Okada, N; Hamada, M.; Ogiwara I & Ohshima K. (1997). SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* 205: 229-243.
- Ozouf-Costaz, C., Brandt, J., Korting, C., Pisano, Eva., Bonillo, C., Coutanceau, J.P., Volff, J.N. (2004). Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16 (1): 51-57.
- Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F.(2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic and Genome Research* 116: 218-223.
- Paxon, J.R. and Eschmeyer, W.N. (1998). *Encyclopedia of fishes*. 2a. ed., Academic Press, San Diego.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (2003) *Check List of freshwater fishes of South America*. Porto Alegre: Edipucrs, 729p.
- Robles, F.; Herrán, R.; Ludwig, A.; Rejón, C.R.; Rejón, M.R.; Garrido-Ramos, M.A. (2004) Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene*, 133-142.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Schaefer, S.A. (1991) Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Siluroidei: Loricariidae), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. *Zool J Linn Soc* 102:1-41.
- Schaefer, S.A. (1998) Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos Siluriformes: Loricariidae. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 375–400.
- Schaefer, S.A. (2003) Subfamily Hypoptopomatinae (Armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferreris Jr, C.L. (Eds) *Cheek List of the freshwater fishes of South America*. Porto Alegre: Edipucrs, p.321-329.
- Singer, M.F. (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76: 67-112.
- Stephan, W.; Cho, S. (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136: 333-341.
- The arabidopsis genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.
- Traut, W.; Sahara, K.; Otto, T.D. and Marec, F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173-180.
- Viñas, A.; Abuín, M.; Pardo, B.G.; Matínez, P. and Sanches, L. (2004) Characterization of a new *HpaI* centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. *Genética*. 121: 81-87.
- Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*. 19:74-678.
- Volff, J.N., Kondo, M., Schartl, M. (2003a) Medaka *dmY/dmrt1Y* is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet* 19: 196-199.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeay, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407– 4414.

- Xia, X. and Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92: 371-373.
- Weiner, A.M.; Deininger, P.L.; Efstratiadis, A. (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information.

8. Anexos

Submitted: Genetica (The Hague)

Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in Hypoptopomatinae species (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae).

Daniela Cristina Ferreira, Claudio Oliveira and Fausto Foresti

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil. Fax: 55 14 3815-3744. Telephone number: 55 14 3811-6264. E-mail ferreira@ibb.unesp.br. Correspondence should be sent to D.C. Ferreira.

Keywords: Fish, Genome, Retrotransposons, Fluorescent *in situ* hybridization, Heterochromatin

Abstract

Transposons and retrotransposons represent a great portion of the eukaryotic genome. These repeated elements can be defined as genetic entities capable of inserting themselves into different positions within the genome, and modify the functions of genes with which they are associated. The purpose of the present work was to isolate, identify, and map the sequences of *Rex1* and *Rex3* transposable elements present in the genomes of subfamily Hypoptopomatinae, fishes that are widely distributed across South America. The retrotransposable elements were identified through amplification with *Rex1* and *Rex3* primers, and the nucleotide composition of the retrotransposons was determined by automatic sequencing. In all species analyzed, it was observed that the retrotransposable element *Rex1* is 520 to 563 bp in size, while *Rex3* is 407 to 454 bp. Comparisons with available literature showed that Hypoptopomatinae retrotransposons *Rex1* and *Rex3* have a high sequence similarity to homologs in different fish orders. The genetic distance analysis revealed that *Rex3* is more divergent than *Rex1*; however, both elements belong to monophyletic groups. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments in *Hisonotus leucofrenatus*, *Pseudotocinclus tietensis*, and *Parotocinclus maculicaudas*, using the retrotransposable elements isolated for each species as probes, revealed that *Rex1* and *Rex3* share a similar dispersion pattern and are both found on all chromosomes of all species tested. The distribution of these retrotransposons in fish chromosomes suggests that *Rex* elements may have been incorporated into these species' genomes over time, and play an important role in the evolution of this group.

Introduction

A great portion of the eukaryotic genome is composed of dispersed, repeated elements that propagate by making copies of themselves that move to different positions in the genome. Retrotransposons are a transpositional sequence class of genome elements that propagate by the use of reverse transcriptase, a common name for an RNA-dependent DNA polymerase capable of forming a strand of DNA from RNA (Charlesworth et al., 1994). Two main classes of retrotransposons can usually be found in eukaryotic genomes: short and long interspersed elements (SINEs and LINEs, respectively), distinguished one from another by length and sequence structure (Singer, 1982; Martin, 1991; Okada, 1991; Charlesworth et al., 1994; Okada et al., 1997). All classes of transposable elements are found in fish genomes (Voff et al., 2003); however, only a few of those elements have been studied and mapped on chromosomes at present.

Transposable elements contribute to genome evolution because their transposition activity causes structural mutations, and their repetitive nature increases the probability of chromosome rearrangements (Koga et al., 2006). Transposition involves chromosome excision and can affect the function of the host genome: if the excision rate is high, certain genes can become genetically unstable. Koga et al. (2006) consider that the impact of transposable elements on vertebrate genomes may be greater than usually thought, demonstrating the contribution of these elements to mutation rates higher than the spontaneous mutation rates determined for the same organism. In medaka (*Oryzias latipes*), the transposable element *To12* contributes to genetic variation, acting as a natural mutant on the host organism. Thus, the history and effects of transposable elements in vertebrate genomic evolution seem more significant than generally asserted (Koga et al., 2006).

Hypoptomatinae is a subfamily of Loricariidae comprising 80 species in 16 genera (Schaefer, 2003), distributed throughout the cis-Andean South American lowlands, from Venezuela to the north of Argentina. In Brazil, where the group is more diverse, these fish are generally referred to as *cascudinhos*. Studies of molecular genetics in representatives of this group are scarce; therefore, the objective of the present investigation was to isolate, characterize, and map in 14 species of the subfamily Hypoptomatinae the retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3*, which have been active during the evolution of different fish ancestries (Volff et al; 1999, 2000, 2001b).

Material and Methods

DNA extraction and sample analysis

Total DNA samples were extracted from specimens of fourteen species of Hypoptomatinae: *Hisonotus insperatus*, *Hisonotus* sp B., and *Corumbataia cuestae*, from Alambari Stream, Botucatu (São Paulo); *C. tocantinensis*, from Vermelho River, Goiás (Goiás); *Otocinclus vitattus*, from the Taquari River, Coxim (Mato Grosso do Sul); *Otocinclus flexilis*, from the Upper Negro River (Amazonas); *Otocinclus gibbosus*, from the Betari River in Iporanga (São Paulo); *Parotocinclus maculicauda*, from the Peixe River in Pedro de Toledo (São Paulo); *Hisonotus leucofrenatus*, from the Canela River, Joinville (Santa Catarina); *Hypoptotoma guentheri*, from the Pirai River in Poconé (Mato Grosso); *Pseudotothyris obtusa*, from the Preto River in Itanhaém (São Paulo); *Otothyris travassossi*, from Rosario Creek, in Canavieras (Bahia); *Hypoptopoma* sp., from Vanico Lake in Carero (Amazonas); and *Pseudotocinclus tietensis*, from the Paraitinga River in Salesópolis (São Paulo). DNA from these species was extracted from liver tissue fragments, gills, and muscles preserved in absolute alcohol, using the phenol/chloroform method (Sambrook et al.,

2001). After purification, the quality and amount of DNA were analyzed on agarose gels and quantified by spectrophotometry.

PCR for the isolation of conserved retrotransposable elements

Partial sequences of retrotransposable elements were amplified by PCR using the following primers: RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3'), RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3'), RTX3-F1 (5'-TACGGAGAAAACCCATTTTCG-3'), RTX3-R1 (5'-AAAGTTCCTCGGTGGCAAGG-3') (Volff et al. 1999, 2000).

Reactions were carried out in a total volume of 25 µl solution containing 100 ng of genomic DNA, each primer described above at 0.2 µM, 0.16 mM dNTPs, 0.02 U/µl of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 1x buffer. The PCR conditions included denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 34 cycles at 95°C for 40 seconds, 55°C for 40 seconds, and 72°C for 2 minutes. The PCR products were visualized on 1% agarose gel.

Fluorescence *in situ* hybridization

Mitotic chromosomes were obtained from a suspension of cells from the anterior kidney region, with *in vivo* colchicine treatment (Foresti et al., 1981), and then subjected to FISH (Pinkel et al., 1986). The retrotransposable elements were amplified by PCR, marked, and used as probes. The probes were marked with Biotine (Biotin- 14-dATP) and 11-Digoxigenine dUTP. The preparations with metaphase chromosomes were incubated with RNase (40 µg/ml) at 37°C for 1 h. After DNA denaturation in formamide 70%/2xSSC at 70°C for 2 minutes, the chromosome preparations were dehydrated in an ethanol series (70, 85, and 100%). After drying, the hybridization mix (100 ng probes, 10 mg/ml dextran sulfate, 2xSSC, and 50% formamide in a 30-µl final volume) was pipetted onto the samples, which

were then incubated overnight at 37°C in a humid chamber. Hybridization was accomplished overnight at 37°C in a humid chamber. After hybridization, the slides were washed 2X in 15% formamide solution/ 0.2xSSC pH 7.0 at 42°C by shaking for 10 minutes each, followed by 3X washes in 0.1xSSC at 60°C for 5 minutes each, with shaking; the mix was then incubated in 5% NFDM/4xSSC buffer for 15 minutes and washed with Tween 0.5%/4xSSC for 5 minutes at room temperature with shaking. Probe detection was done with 0.07% avidin-FITC (Sigma) conjugated with NFDM/4xSSC buffer for 30 minutes, followed by signal amplification using 2.5% avidin-biotin conjugated with NFDM/4xSSC buffer for 30 minutes. Treatments with avidin-FITC and avidin-biotin were accomplished at 37°C in a humid chamber. After each step for signal detection, preparations were washed 3X with 0.5%/4xSSC Tween for 5 minutes at room temperature. Chromosomes were counterstained with propide iodide (PI) (0.2%) diluted in antifade (Vector) for marking with Biotin, and stained with antifade/DAPI for marking with digoxigenine. Chromosomes were analyzed through BX 61 Olympus microscope, and images were captured with a DP70 Olympus digital camera, using Pro MC Image software.

Sequence analyses

Sequencing reactions used DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare). Sequencing of DNA samples was performed in an automatic DNA sequencer (377 ABI PRISM - Applied Biosystems). The sequences were processed and submitted to sequence database analysis (DDBJ, EMBL, GenBank), using the program BLAST/N (Altschul et al. 1990) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. After the analysis, sequences were aligned by using both the *Bioedit* (Hall, 1999) and *Dambe* (Xia and Xie, 2001) programs and submitted to genetic distance analysis by the MEGA 4 program (Tamura et al. 2007).

Results and Discussion

In this study, retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* were studied in 14 species of Hypoptopomatinae. Experiments with *Rex1* resulted in fragments of about 550 bp in 13 of the 14 species studied (Figure 1), while *Rex3* resulted in fragments of about 450 bp (Figure 2) all 14 of the species analyzed. These results are similar to those obtained by Ozouf-Costaz et al. (2004), where the authors identified the transposable elements *Rex1* and *Rex3* in 13 Antarctic fish species.

The identification of partial retrotransposable element sequences was carried out in the following species: *Otocinclus flexilis* (both *Rex1* and *Rex3*), *Hisonotus leucofrenatus* (both), *Pseudotocinclus tietensis* (both) and *Corumbataia cuestae* (*Rex3* only) (Figures 3 and 4). The sequences showed that the retrotransposable element *Rex1* is 563 bp in *O. flexilis*, 553 bp in *H. leucofrenatus*, and 520 bp in *P. tietensis*, whereas the retrotransposable element *Rex3* is 454 bp in *P. tietensis*, 448 bp in *H. leucofrenatus*, 407 bp in *C. cuestae*, and 413 bp in *O. flexilis*. Comparative analysis of these retroelements with the information in the available literature showed that in all sequenced species, retrotransposon *Rex1* is highly similar among the sequences found in some species of the order Perciformes (71-76%), Anguilliformes (75%), Beloniformes (77%), and Cyprinodontiformes (75%), and that the highest similarity between species for *Rex1* was for species of the order Perciformes. Retrotransposon *Rex3* also showed high similarity among the sequences found in species of the orders Tetraodontiformes (77%), Esociformes (78%), Cypriniformes (74-79%), and Perciformes (76-78%). The high similarity found among the different orders indicates that the retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* are strongly conserved in the different groups of fish and in vertebrates in general.

In the phylogenetic analysis using the sequences obtained in the present study and the sequences obtained from the Genbank, the representatives of the

subfamily Hypoptopomatinae formed a monophyletic group for sequences of *Rex1* and *Rex3* (Figures 5 and 6). However, the *Rex3* element is more divergent in the subfamily Hypoptopomatinae than in other fish groups (Figure 6).

To determine the chromosome localization of the isolated elements *Rex1* and *Rex3*, fluorescence *in situ* hybridization was performed in chromosome preparations of the fish species *Parotocinclus maculicaudas*, *Pseudotocinclus tietensis*, and *Hisonotus leucofrenatus* using the retrotransposable elements previously isolated as probes for each species (Figure 7). The probes were hybridized together (double FISH) and separately. For all species analyzed, both retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* presented a similar dispersion pattern, organized in small clusters and dispersed on all the chromosomes of all the species. *Rex3* was found to be more dispersed than *Rex1* in all species analyzed (Figures 7).

Fluorescence *in situ* hybridizations have also been performed using probes of one species in another, besides using the probes isolated from the corresponding species, and both procedures presented similar results, showing that there is a high percentage of identical nucleotides for *Rex1* and *Rex3* at the interspecific level. When double FISH was performed in *Hisonotus leucofrenatus*, it was observed that there are chromosomes whose retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* are located within the same cluster (Figure 8). In hybridization utilizing two probes, it is evident that the element *Rex3* is more dispersed and more abundant than element *Rex1*. Clusters formed by hybridization of elements *Rex1* and *Rex3* in the species analyzed coincide with the heterochromatic regions in the chromosomes (Andreato *et al.*, 1992, 1993; Ferreira *et al.*, 2005).

Among the fishes, there are only a few descriptions of retrotransposons of the *Rex* group. *Rex1* and *Rex3* have been mapped on chromosomes of pufferfish, *Tetradon nigroviridis* (Dasilva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004),

and in 13 species of Antarctic fish (Ozouf-Costaz et al., 2004), in *Astronotus ocellatus* (Mazzuchelli and Martins, 2009). All the experiments showed that *Rex1* and *Rex3* are preferentially accumulated on heterochromatic regions and can also be associated with other transposable elements, as in the case of the retrotransposable element Zebulon, which is present in the pufferfish genome concomitantly with *Rex3* (Bouneau et al., 2003). Fischer et al. (2004) showed that transposable elements and retrotransposons are very frequently co-localized with minisatellites and normally accumulated in heterochromatin regions. Using FISH, the authors demonstrated that *Tc1* and *Rex3* are located in the great majority in the centromeric region, and in some chromosomes in the telomeric region, but are absent on some chromosomes in metaphasic preparations of *Tetraodon nigroviridis*. The authors highlight the diversity of transposable elements observed in the genome of *T. nigroviridis*, which are not found in human beings and rats.

Other isolated transposable elements in fish also coincide with heterochromatic regions; for example, the transposon *Tc1* isolated by Capriglione et al. (2002) in the species *Chionodraco hamatus*. This element showed FISH marks preferentially in pericentromeric or telomeric heterochromatic regions, similar to the findings of Ozouf-Costaz et al. (2004) in studies related to elements *Rex3* and *Tc1* in the same species.

The chromosome distribution pattern of *Rex1* and *Rex3* elements among the species of the subfamily Hypoptopomatinae found in the present work was also observed for other transposable elements. Oliveira et al. (2003) demonstrated with FISH that two sequences called SINE ROn-1 and ROn-2 follow a similar chromosomal distribution in the Nile tilapia. In that study, the authors observed that both SINE sequences were organized in small clusters and distributed over all chromosomes.

The data obtained in the present study corroborate several previous studies that show a high concentration of dispersed, repeated elements in the heterochromatic regions of fish chromosomes. Considering that retrotransposons' transposition activity can cause mutations, and that their repetitive nature increases chromosomal rearrangement rates, their concentration in heterochromatic regions could explain their apparent neutrality or low active interference in fast and deep modification in the carriers, by the lesser amount of genes and other important DNA sequences in these chromosome regions.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support and to Renato Devidé and Dr. Cristiane K. S. Dias for technical assistance.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DA (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-10.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1992) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY Sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57, 369-372.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho AS (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63, 215-220.
- Bouneau L, Fisher C, Ozouf-Costaz C, Froschauer A, Jaillon O, Coutanceau JP, Körting C, Weissenbach J, Bernot A, Volf JN (2003) An active Non-LTR

retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research*. 13, 1686-1695.

Capriglione T, Odierna G, Caputo V, Canapa A, Olmo E (2002) Characterization of a *Tc1*-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. *Gene* 295, 193-198.

Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W(1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.

Dasilva C., Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Crollius HR (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (21), 1636-1641.

Ferreira DC, Chiachio MC, Takako AK, Andreatta AA, Oliveira O, Foresti F (2005) Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Caryologia* 58 (4), 387-395.

Fischer C, Bouneau L, Coutenceau JP, Weissenbach J, Volf JN Ozouf-Costaz C. (2004) Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336, 175-183.

Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogen. Cell Genet*. 31, 137-144.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

- Koga A, Lida A, Hori H, Shimada A, Shima A (2006) Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: The medaka fish Tol2 element contributes to genetic variation without recognizable traces. *Mol. Biol. Evol.*; **23**, 1414–1419.
- Martin SL (1991) LINEs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 505-508.
- Mazzuchelli J, Martins C. (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-008-9346-7.
- Okada N (1991) SINEs. *Curr. Opinion Genet. Dev.* 1, 498-504.
- Okada N, Hamada M, Ogiwara I, Ohshima K. (1997) SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* 205, 229-243.
- Oliveira C; Wang Y, Bryden LJ; Wright JM (2003) Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent *in situ* hybridization. *Caryologia* 56, 177-185.
- Ozouf-Costaz C., Brandt J., Korting C., Pisano E., Bonillo C., Coutanceau JP, Volff, JN (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16 (1), 51-57.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW.; (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2934–2938.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaefer SA (2003) Subfamily Hypoptopomatinae (Armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferreris Jr, C.L. (Eds) *Check List of the freshwater fishes of South America*. Porto Alegre: Edipucrs, p.321-329.
- Singer MF (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76: 67-112
- .Stephan W, Cho S (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136, 333-341.

Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.

Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M, (1999) The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1427–1438.

Volff JN, Körting C, Scharl M (2000) Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1673–1684.

Volff JN, Körting C, Meyer A, Scharl, M (2001b). Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. *Molecular Biology and Evolution* 18, 427–431.

Volff, JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*. 19, 74-678.

Xia X, Xie, Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.

Figure Legends

Fig 1 Gel showing amplified products with primers for retrotransposons *Rex1*. L) Ladder 1Kb plus; 1) *Otothyris travassossi*; 2) *Pseudotothyris obtusa*; 3) *Corumbataia tocantinensis*; 4) *Hypoptopoma guentheri*; 5) *Hypoptopoma* sp.; 6) *O. gibbosus*; 7) *Otocinclus vitattus*; 8) *Hisonotus leucofrenatus*; 9) *Pseudotocinclus tietensis*; 10) *Otocinclus flexilis*; 11) *Hisonotus* sp. B; 12) *Parotocinclus maculicauda*; 13) *Corumbataia cuestae*.

Fig 2 Gel showing amplified products with primers for retrotransposons *Rex3*. L) Ladder 1Kb plus; 1) *Otothyris travassossi*; 2) *Pseudotothyris obtusa*; 3) *Corumbataia tocantinensis*; 4) *Hypoptopoma guentheri*; 5) *Hisonotus insperatus*; 6) *Hypoptopoma* sp.; 7) *Otocinclus gibbosus*; 8) *Otocinclus vitattus*; 9) *Hisonotus* sp B; 10) *Hisonotus leucofrenatus*; 11) *Otocinclus flexilis*; 12) *Corumbataia cuestae*; 13) *Parotocinclus maculicauda*; 14) *Pseudotocinclus tietensis*.

Fig 3 Sequence alignment of the retransposable element *Rex1* for the species *Otocinclus flexilis*, *Hisonotus leucofrenatus*, and *Pseudotocinclus tietensis*.

Fig 4 Sequence alignment of the retransposable element *Rex3* for the species *Pseudotocinclus tietensis*, *Hisonotus leucofrenatus*, *Corumbataia cuestae*, and *Otocinclus flexilis*.

Fig 5 Neighbor-joining tree based on partial *Rex1* sequence data isolated from three species of the subfamily Hypoptopomatinae. Branch length is proportional to genetic evolution distance and bootstraps are indicated.

Fig 6 Neighbor-joining tree based on partial *Rex3* sequence data isolated from three species of the subfamily Hypoptopomatinae. Branch length is proportional to genetic evolution distance and bootstraps are indicated.

Fig 7 Metaphase plates of Hypoptopomatinae species subjected to FISH with probes obtained from the transposable elements *Rex1* and *Rex3*: A) *Parotocinclus maculicaudas* - *Rex1*; B) *Parotocinclus maculicaudas* - *Rex3*; C) *Pseudotocinclus tietensis* - *Rex1*; D) *Pseudotocinclus tietensis* - *Rex3*; E) *Hisonotus leucofrenatus* - *Rex1*; F) *Hisonotus leucofrenatus* - *Rex3*.

Fig 8 A-B) Metaphase plates of *Hisonotus leucofrenatus* submitted to double FISH with probes obtained from the transposable elements *Rex1* (Digoxigenine), in red, and *Rex3* (biotin), in green.

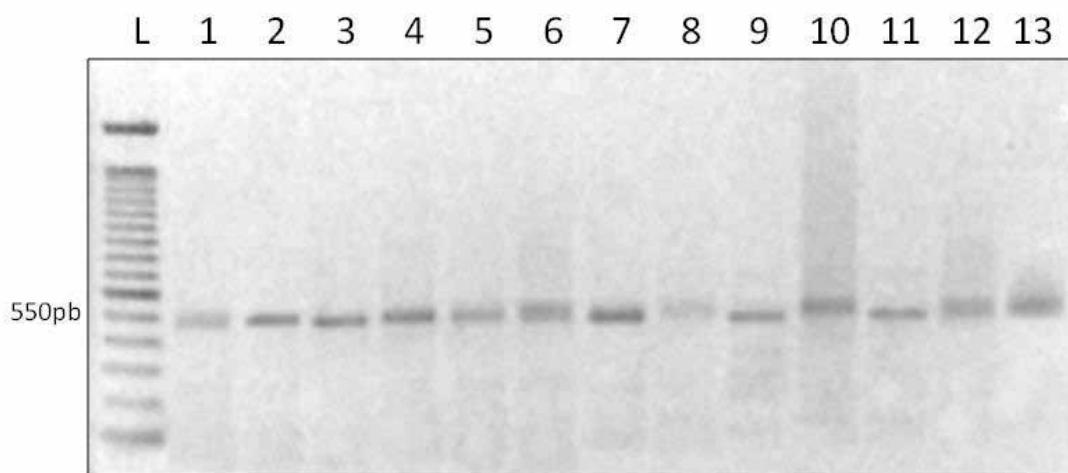


Fig. 1

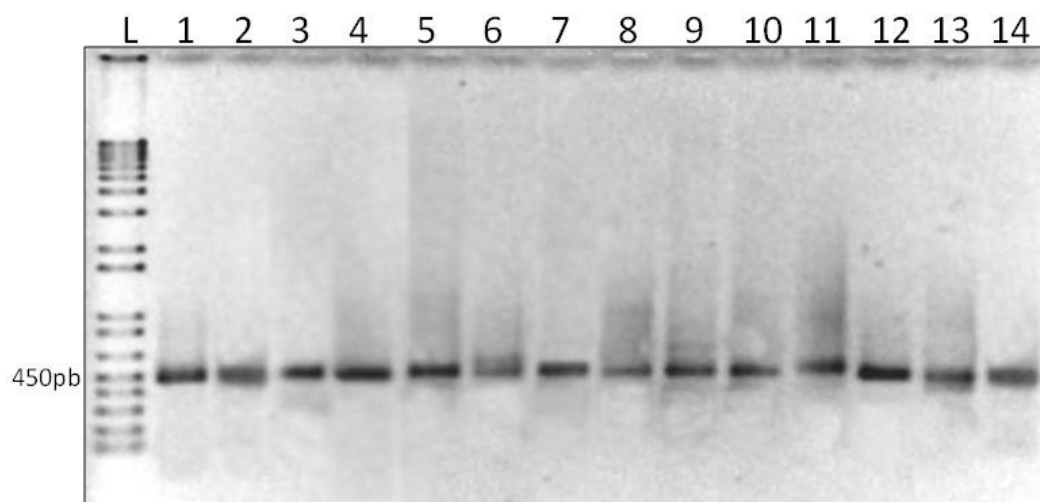


Fig. 2

```

O._flexilis      CCTTCCTTTACAGCCTGACTCTGAAGGACAAGCTGGATTAAT-TGGAGTGGATGCACACATG-ACAAACTGGATCATGGA
H._leucofrenatus ---C...GACT...ACTCT.....A....AC.CAG.....CAGT...C..-T.C.....TC...
P._tietensis     -----...ACTTC-...T....CAGT...C..GT.T.....AC...

O._flexilis      CTACCTCACCCATCGACCTCAATATGTGAGGACACGGGACTGTGTCTGACTTGGTGGTCTGTAGTACAGGAGCCCCGC
H._leucofrenatus .....A.C....A..G.....A.....A.....A.C.AC....G..A..T.
P._tietensis     .....A.C....A.....G.....C.T.A..AA.....A...C..G..G.TG..T.

O._flexilis      AAGGAACCGTCTTGGCGCCATTCCTTTTCCACCTGTACACCGCAGACTTTAAGTACAGCTCACTGAAGTGTACCTACAG
H._leucofrenatus .G....G...C...A.....C.....T.T....C.T.....C.....T...T...
P._tietensis     .....A...C.....--...C....AG.....T.T....C.T.....C..C.....T.AC...

O._flexilis      AAGTTCTCTGATGACTCTGCTGTTGTTGGTCTCATTCTGATGAGGACGACCGGGAATACAGACAGGTGATTCAGAACIT
H._leucofrenatus .....A..GA.C..A..C....AAA.A.....G...A.C..G.....G.AC....A..GTT..
P._tietensis     .....T.....C..GA....C..C..T..AA.CA....A.G...A.TA.G....A.GGAC.A....AG...

O._flexilis      TGTGGACTGGTGCCTATATAACCGCCTCCAGATTAACATTGGGAAAACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTTCGTAGACGGC
H._leucofrenatus .....T..GCGG...A.....T.CA....G....A..A.....C..C..GT..A
P._tietensis     ...A.....T..GC.A....AT..A...T.A...CA..A..G....A..A.....A..C..C...TC.A

O._flexilis      TCACCCTCTTCAACACCGGTGAACATCCAGGGAATGGACATCGACATGGTGGACAGTTACAAGTACCTGGGTGTTACCT
H._leucofrenatus A-G.AT..CC.TC..T.A.....T.....G.GA...T.TC...T.....
P._tietensis     A-.A.AAC.TTC..T.T..A.....A...A...T.CA.GA....TC...TGT.....-..T.

O._flexilis      TAACACAAAAGTGGACTGGTCCGACAACACTGCTGCACCTGTATAAAAAAGGACAGAGCAGACTCTTTTCTGCTGAGGGAA
H._leucofrenatus A..T.AC..G.....A.TT....CA.....C..C.....-..C.....-.....
P._tietensis     A..T.AC...T.....A.TT...T.CT.....T..C.GG.-..C.C.....-.....
    
```

Fig. 3

P._tietensis CCTACGGAGTCACCTCTCACTGGAAACAAGTCTGACTTACTGCCGTCCATGCGAAATAAAGCTCCTGCTCTGCTTGTAC
H._leucofrenatus TGC-...ATTG.....CT.....A..AAGG.....CAC..-...AAA.....AGA...
C._cuestae -----G..G.....CC...-...A...C.....
O._flexilis -----.....G.....CC..G-.....C.....

P._tietensis AGGGACTGAATGGCCCGTGGTAGGGAGCCATGTACCTGTACTACGGAAGCACCTCCCACAAAAATACCTCAAGGAACACA
H._leucofrenatus .A...C.T....T..CC.A..C..T..TG...T..CA.....C..G.....G...CT...GG.....G
C._cuestae A...A.....CA.....G.....CT.....C.G.....
O._flexilis A.....-.....T.....-.....

P._tietensis GTCGAATGCCTTCTCTAATCCACAAAGCACATGTGGACTGTTGGGCAAACCTCATGAACCTGTTGAGGATCCTGGAGA
H._leucofrenatus ...AT.....A.....TG...A..G..GAGTA..G..T..C...CC.CC.CA.TC...TGT..A.
C._cuestae A.G.....A.....G.....C.....CC.CG.....A...
O._flexilis A.....A.....G.....C.....CC.C.....T.-.

P._tietensis GAGTAAA-ATCTGGTCCAGTGTATTATGATCAGGACGAAACCCGCACTGCTCCTCCTGAATCAGAGTTCAACTATTAGC
H._leucofrenatus AG....G.GT.....TA...CC...GC.....T...T..T...AA...CT.....G....CG.A
C._cuestae G.G.....CC.C.C.....T...T..TC...A....C...A..G....C...
O._flexilis G.G.....C-...CC.C.C.....-.....-.....T.....G....CG.T

P._tietensis TGGACTCTCCTCTAGTACCCCTGTGTAGACTTACCAGGGAGGCTGAGGAGTGTGATTCCCCTGTAGTTGAAACACAC
H._leucofrenatus CA..T....T..C..C...TTG.CA.....C.T..C.....T..A....A..G..A.GA..A...GC.G..TT
C._cuestae C.....T...C.....CA.....A....A.....T...A...G.....
O._flexilis C.....-T...C.....-...-...G-...-...G-...-...-...AGG.G-.....

P._tietensis CGTCCCAGGGGGGACCCCTTCTTAAAAAGAGGCACCACCACCCAGTCTGCCAA-
H._leucofrenatus TC...-----..TC.....T..G...TG..A.....T.....-
C._cuestae .C...-----..TC.....-.....G...A
O._flexilis .CC..-----..C..T..-----..A...C..C..C...-T.G..A----

Fig. 4

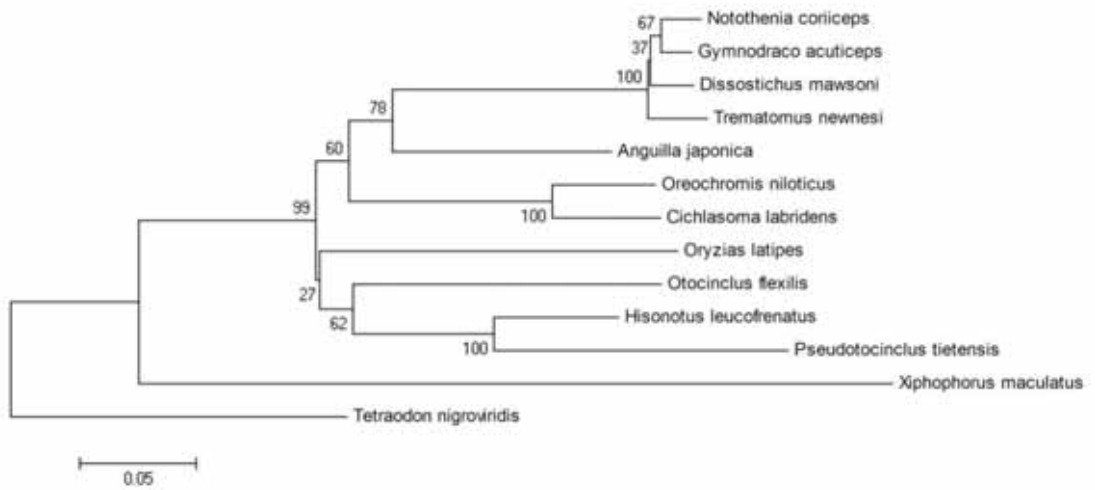


Fig. 5

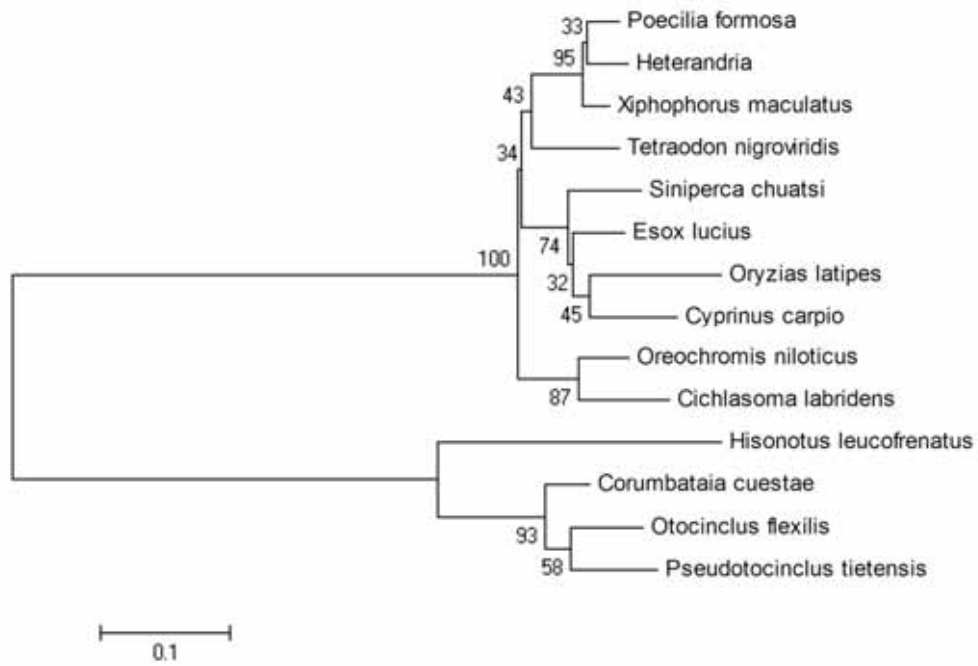


Fig. 6

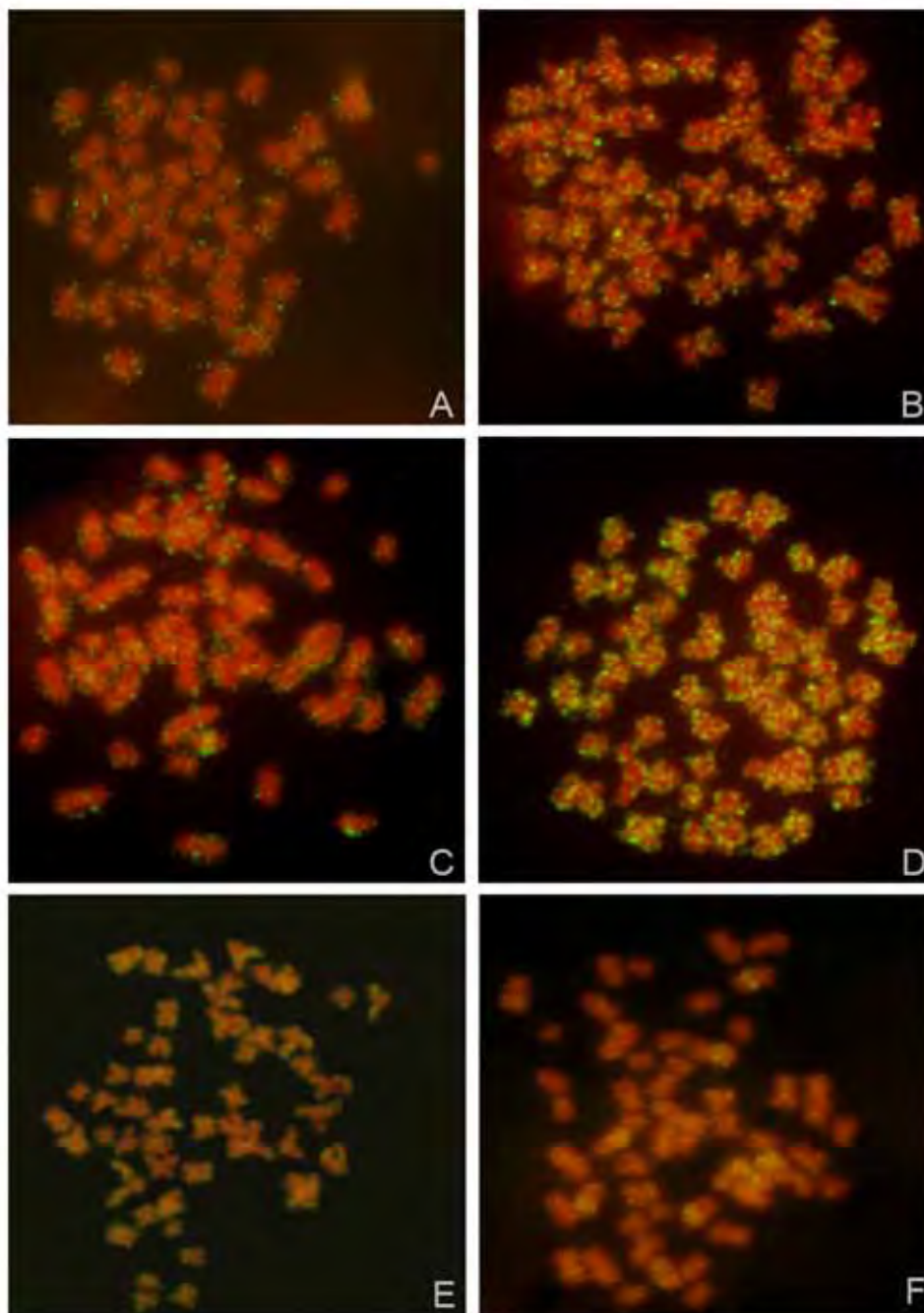


Fig. 7

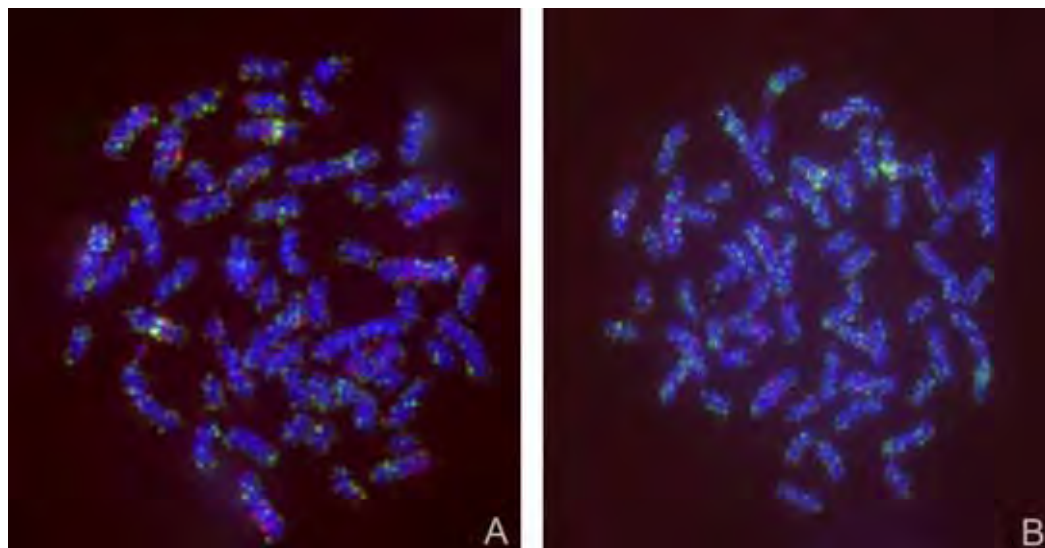


Fig. 8